

Aus dem Institut für Anatomie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp

CPI-17 als Marker spätreifer Oligodendrozyten und seine Rolle in einem toxischen Multiple Sklerose Tiermodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

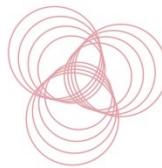
Vorgelegt von

Julia Sylvia Elke Frenz | geb. am 01.09.1997 in Rostock

wohnhaft in Rostock

Rostock | 2023

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004867



Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Universitätsmedizin Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, Universität Rostock, Institut für Anatomie

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Uwe Zettl, Universität Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurologie

3. Gutachterin: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten, Universität Bonn, Anatomisches Institut

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Multiple Sklerose.....	1
1.1.1	Klinische Aspekte	1
1.1.2	Histopathologie der Läsionen.....	2
1.2	Die Oligodendrozyten	3
1.2.1	Entwicklung.....	3
1.2.2	Funktion	4
1.3	Das Protein CPI-17	5
1.3.1	Vorkommen und Proteinstruktur	5
1.3.2	Funktion	7
1.4	Das Cuprizone-Modell	9
2.	Fragestellungen	12
3.	Material und Methoden.....	13
3.1	Materialien und Chemikalien	13
3.2	Puffer, Blockseren und Färbelösungen.....	14
3.3	Versuchstiere	16
3.4	Versuchsaufbau	16
3.5	Durchführung des Versuches.....	17
3.6	Transkardiale Perfusion	17
3.7	Entwässerung, Einbettung und Schnitt	18
3.8	Histologische Färbungen	19
3.8.1	„Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“ (LFB/PAS)-Färbung	19
3.8.1.1	Prinzip einer „Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“ (LFB/PAS)-Färbung	19
3.8.1.2	Durchführung einer „Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“ (LFB/PAS)-Färbung ...	19
3.9	Immunhistochemie	22
3.9.1	Prinzip immunhistochemischer Markierungen	22
3.9.2	Durchführung immunhistochemischer Markierungen	23
3.10	Immunfluoreszenz	27
3.10.1	Prinzip von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen	27
3.10.2	Durchführung von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen	28

3.11	Auswertung.....	30
3.11.1	Untersuchte Hirnareale	30
3.11.1.1	Immunfluoreszenz	30
3.11.1.2	Immunhistochemie.....	30
3.11.2	Auswertung der LFB/PAS-Färbung	32
3.11.3	Quantifizierung der optischen Dichte.....	32
3.11.4	Quantifizierung von Zell- und Partikeldichten.....	34
3.11.4.1	Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen	34
3.11.4.2	Immunhistochemie.....	34
3.11.5	Graphische Darstellung und statistische Auswertung.....	35
4.	Ergebnisse	36
4.1	Expression von CPI-17 in Oligodendrozyten.....	36
4.1.1	Expression von CPI-17 in allen Oligodendrozyten-Reifestufen	36
4.1.2	Expression von CPI-17 in reifen Oligodendrozyten	40
4.2	Ausmaß Cuprizone-induzierter Schädigungen in WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen	44
5.	Diskussion	53
5.1	Diskussion der Methoden.....	53
5.1.1	Das Cuprizone-Modell	53
5.1.2	Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und histochemische Färbungen	56
5.1.3	Quantifizierung von Zell-, Partikel- und optischer Dichte	56
5.2	Diskussion der Ergebnisse	57
5.2.1	Die Expression von CPI-17	57
5.2.2	Die Rolle von CPI-17 im toxischen Cuprizone-Mausmodell	60
5.3	Abschließende Bemerkungen.....	61
6.	Zusammenfassung.....	62
7.	Thesen	63
8.	Literaturverzeichnis	VI
9.	Abbildungsverzeichnis	XVI
10.	Tabellenverzeichnis	XVIII
11.	Anhang.....	XIX
11.1	Überblick Tierexperiment München.....	XIX
	Danksagungen	XX

Lebenslauf	XXI
-------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Adenomatous polyposis coli
APP	Amyloid Precursor Protein
ASCL-1	Achaete-Scute-Homolog-1
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CNF	Ciliary neurotrophic factor
CNPase	2',3'-Cyclic-nucleotide-3'-phosphodiesterase
CPI-17	C-kinase potentiated protein phosphatase-1 Inhibitor
CPI-17 ^{+/}	CPI-17-Wildtyp (Mäuse)
CPI-17 ^{-/-}	CPI-17-Knockout (Mäuse)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin, Radixin und Moesin
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
GC	Guanylazylklase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H	Hämalaun
HES-1/5	Hairy and enhancer of split-1/5
HIER	Demaskierung (engl. heat induced epitope retrieval)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
IBA-1	Ionized calcium binding adapter molecule-1
Ig	Immunglobulin
IGF-1/2	Insulin-like growth factor-1/2
ILK	Integrin-linked kinase
kDa	Kilodalton
ICC	laterales Corpus callosum
LFB	Luxol-Fast-Blue
mCC	mediales Corpus callosum
min	Minute/n
MLKK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
MLKP	Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase
MRT	Magnetresonanztomographie

MS	Multiple Sklerose
NG2	Neural/glial antigen 2
Nkx-2.2	Homeobox protein Nkx-2.2
NOTCH-1	Neurogenic locus notch homolog protein-1
NT3	Neurotrophin 3
OLIG-1	Oligodendrocyte Transcription Factor-1
OLIG-2	Oligodendrocyte Transcription Factor-2
OPZ	Oligodendrozyt-Progenitorzellen
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PBS	Phosphatpufferlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	primär-progressive Multiple Sklerose
PPP1R14A	Protein phosphatase regulatory subunit 14A
Ras	Rat sarcoma
ROCK	Rho-associated kinase
ROI	Region of interest
RRMS	akute, schubförmig-remittierende Multiple Sklerose (engl. relapsing-remitting multiple sclerosis)
sec	Sekunde/n
SOS	Son of sevenless
SOX-9/10	Sex determining region Y-box-9/10
SPMS	sekundär-progressive Multiple Sklerose
TG	Transgen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine erworbene, chronisch-entzündliche, neurodegenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Die Entstehung von entzündlichen Läsionen, sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz des ZNS, ist ein pathologisches Kennzeichen der Erkrankung.

1.1.1 Klinische Aspekte

Je nach Lokalisation der Läsionen kann bei der MS nahezu jedes neurologische Symptom auftreten. Typische Symptome sind zum Beispiel (z.B.) Optikusneuritis, sensorische und/oder motorische Defizite sowie ein Hirnstammsyndrom (Übersichtsartikel in: Katz Sand, 2015; Tsang & Macdonell, 2011). Bei 85% der Patienten, die später eine manifeste MS entwickeln, äußert sich die Erkrankung zunächst in Form des „klinisch isolierten Syndroms“ (Tsang & Macdonell, 2011). In diesem Zustand zeigt ein Patient zwar die klassische, klinische Symptomatik eines demyelinisierenden Ereignisses (siehe oben), erfüllt jedoch nicht vollständig die Kriterien der MS in der Magnetresonanztomographie (MRT) (Übersichtsartikel in: Katz Sand, 2015). Die Diagnose „Multiple Sklerose“ wird gestellt, wenn zeitlich und örtlich disseminierte Läsionen in einer T₂-gewichteten MRT-Bildgebung nachweisbar sind. Diese können entweder isoliert oder in Kombination mit der klinischen Symptomatik auftreten (Keegan & Noseworthy, 2002; Thompson et al., 2018).

Grundsätzlich lassen sich bei der MS, wie in Abbildung 1 dargestellt, klinisch drei Verlaufsformen unterscheiden: die akute, schubförmig-remittierende Form (RRMS), die sekundär-progressive Form (SPMS) und die primär-progressive Form (PPMS).

Bei den meisten Patienten tritt zunächst die RRMS auf (Übersichtsartikel in: Katz Sand, 2015; Tsang & Macdonell, 2011). Diese Verlaufsform ist durch akut auftretende Episoden mit neurologischer Symptomatik, sogenannte Schübe, gekennzeichnet. Auf diese Schübe folgt dann eine Phase, in der sich die Symptome teilweise oder vollständig zurückbilden (Remission). Bei einem Großteil der Patienten geht die RRMS etwa 10-15 Jahre nach Krankheitsbeginn in die SPMS über (Solari et al., 2019).

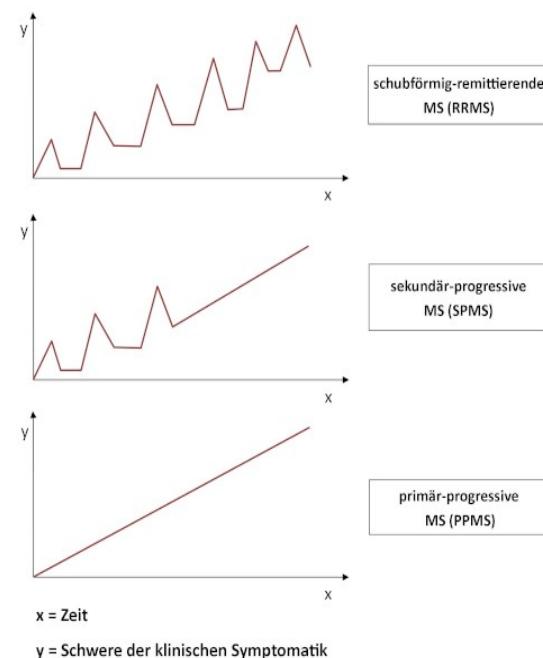


Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei unterscheidbaren MS-Verlaufsformen

Diese ist durch ein kontinuierliches Voranschreiten der klinischen Symptomatik gekennzeichnet. Gleichzeitig bleiben bei dieser Verlaufsform die Phasen der Remission aus. Bei etwa 15% der Patienten wird die PPMS diagnostiziert. Bei dieser Verlaufsform treten keine Schübe auf, sondern es kommt von Krankheitsbeginn an zu einer kontinuierlichen Zunahme der klinischen Symptomatik (Keegan & Noseworthy, 2002).

Die Ätiologie der MS ist bis heute nicht geklärt. Als auslösende Faktoren werden sowohl genetische Prädispositionen (Übersichtsartikel in: Sawcer et al., 2014) als auch bestimmte Umwelteinflüsse wie z.B. das Rauchen oder eine infektiöse Mononukleose diskutiert (Übersichtsartikel in: Belbasis et al., 2015).

1.1.2 Histopathologie der Läsionen

Die grundlegenden Merkmale einer MS-Läsion sind Demyelinisierung, Inflammation, der Untergang von Axonen und reaktive Gliose (Höflich et al., 2016; T. Kuhlmann et al., 2008). Das sonstige histopathologische Erscheinungsbild von MS-Läsionen ist allerdings sehr heterogen. Für die Klassifizierung von Läsionen gibt es verschiedene Systeme (Übersichtsartikel in: Tanja Kuhlmann et al., 2017). Bei dem Klassifizierungssystem nach Lucchinetti et al. werden die Läsionen anhand der Demyelinisierung, der Lokalisation und Ausdehnung der demyelinisierten Plaques, des Musters der Degeneration von Oligodendrozyten und der Nachweisbarkeit von Immunglobulinen (Ig) sowie Komplementablagerungen in vier verschiedene Typen eingeteilt.

Läsionen vom Typ-I und Typ-II sind durch eine T-Lymphozyten und Makrophagen vermittelte Inflammation gekennzeichnet. Die Läsionen weisen außerdem zentral liegende kleine Venen und Venolen auf und haben scharf abgegrenzte Läsionsränder (Kipp et al., 2009; Lucchinetti et al., 2000). In Typ-II Läsionen lassen sich zusätzlich noch eine ausgeprägte Ig-Reaktivität sowie Ig- und Komplementfaktor-Ablagerungen an Stellen der aktiven Myelindestruktion nachweisen (Lucchinetti et al., 2000).

Läsionen vom Typ-III weisen ebenfalls inflammatorische Infiltrate auf, welche hauptsächlich aus T-Lymphozyten und Makrophagen bestehen. Im Gegensatz zu Typ-I und Typ-II Läsionen gibt es bei diesem Läsionstyp keine zentral liegenden kleinen Venen und Venolen und auch keine Ig- oder Komplementfaktor-Ablagerungen. Die Ränder von Typ-III-Läsionen sind eher unscharf begrenzt und die Demyelinisierung breitet sich diffus in die umgebende weiße Substanz aus (Lucchinetti et al., 2000). Die Besonderheit dieses Läsionstyps ist der vermutlich primäre Untergang von Oligodendrozyten. Besonders am Rand der demyelinisierenden Plaques ist dieser stark ausgeprägt, während im inaktiven Zentrum der Läsionen nahezu keine Oligodendrozyten mehr nachweisbar sind (Kipp et al., 2009; Lucchinetti et al., 2000).

Läsionen vom Typ-IV entsprechen im Wesentlichen Läsionen vom Typ-III. Der einzige Unterschied ist, dass der Untergang von Oligodendrozyten sich auf eine schmale Zone in der weißen Substanz begrenzt, die direkt an die demyelinisierenden Plaques angrenzt (Kipp et al., 2009; Lucchinetti et al., 2000).

1.2 Die Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind ein Typ von Gliazellen im ZNS, die vor allem in der weißen Substanz und in geringerer Zahl auch in der grauen Substanz vorkommen. Die Entwicklung der Oligodendrozyten ist ein komplexer Vorgang, der durch unterschiedliche Signalkaskaden reguliert wird (Übersichtsartikel in: Elbaz & Popko, 2019; Übersichtsartikel in: Tiane et al., 2019). Während ihrer Entwicklung durchlaufen sie verschiedene Stadien, von der Progenitorzelle bis hin zum ausdifferenzierten Oligodendrozyten. Diese Stadien sind durch morphologische Besonderheiten und die Expression bestimmter Markermoleküle gekennzeichnet und können dahingehend voneinander unterschieden werden (vergleiche (vgl.) Abbildung 2).

1.2.1 Entwicklung

Der Ursprung von Oligodendrozyten liegt in neuroepithelialen, multipotenten Stammzellen der subventrikulären Zone (Doetsch et al., 1997). Aus diesen Stammzellen entstehen Oligodendrozyten-Progenitorzellen (OPZ), welche durch das Gehirn zu ihren Zielgebieten migrieren. Typische Marker, die von OPZ exprimiert werden, sind der Platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptor, Oligodendrocyte Transcription Factor-2 (OLIG-2) (Doucette et al., 2010), Neural/glial antigen 2 (NG2), A2B5 Gangliosid und O4 Sulfatid (Übersichtsartikel in: Olsen & Akirav, 2015). Das Überleben der OPZ im Zielgebiet hängt von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF, Insulin-like growth factor-1/2 (IGF-1/2), Neurotrophin 3 (NT3) oder Ciliary neurotrophic factor (CNF), ab (Barres et al., 1993). Bevor OPZ zu reifen Oligodendrozyten differenzieren, proliferieren sie. Die Proliferationskapazität der einzelnen OPZ ist dabei sehr variabel (Temple & Raff, 1986). Für die Förderung der Proliferation sind mitogene Signale wie PDGF, NT3 (Barres et al., 1993) oder auch OLIG-2 (Übersichtsartikel in: Tiane et al., 2019) entscheidend. Das Ausmaß der Proliferation korreliert außerdem positiv mit der elektrischen Aktivität der benachbarten Axone (Barres & Raff, 1993). Der nächste Schritt in der Entwicklung der Oligodendrozyten ist die Differenzierung der OPZ. Der genaue Mechanismus, der dazu führt, dass eine Progenitorzelle die Proliferation stoppt und mit der Differenzierung beginnt, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Laut Temple und Raff scheint es einen intrinsischen Zählmechanismus innerhalb der OPZ zu geben. Dieser Mechanismus sorgt nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen dafür, dass die OPZ unempfindlich gegenüber Wachstumsfaktoren werden, ihre Proliferation stoppen und zu adulten Oligodendrozyten differenzieren. Dabei haben alle OPZ eine ähnliche Zellzyklusdauer von 1-2 Tagen (Temple & Raff, 1986). Dieser Zählmechanismus wird hauptsächlich aus Mitogenen gebildet, die Rezeptoren auf der Zelloberfläche aktivieren (Barres et al., 1994). Der intrinsische Mechanismus wird durch eine externe Effektorkomponente ergänzt, die aus hydrophoben Signalen wie z.B. Schilddrüsenhormonen, Retinoidsäure oder Glukokortikoiden besteht (Barres et al., 1994). Das Fehlen dieser hydrophoben Signale führt in Anwesenheit von

Mitogenen dazu, dass sich OPZ unendlich teilen und so eine Differenzierung ausbleibt (Barres et al., 1994). Die Differenzierung selbst wird anschließend durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert. Zu den Aktivatoren der Differenzierung gehören z.B. Oligodendrocyte Transcription Factor-1 (OLIG-1), OLIG-2 (Li et al., 2009) und die Proteine Sex determining region Y-box 9 und 10 (SOX 9/10) (Elisabeth Sock & Michael Wegner, 2019). Negative Regulatoren der Differenzierung sind z.B. die Proteine Hairy and enhancer of split-1 und 5 (HES-1/5) (Übersichtsartikel in: Tiane et al., 2019) oder Neurogenic locus notch homolog protein 1 (NOTCH-1) (Li et al., 2009). Auch epigenetische Mechanismen, wie die Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Methylierung (Übersichtsartikel in: Tiane et al., 2019) oder die Deacetylierung von Histonen (Li et al., 2009), sind für die Differenzierung zum reifen Oligodendrozyten von Bedeutung. Typische Marker, die von noch nicht vollständig differenzierten, unreifen Oligodendrozyten exprimiert werden, sind unter anderem PDGF-Rezeptor (Doucette et al., 2010), OLIG-2 (Elisabeth Sock & Michael Wegner, 2019), O4 Sulfatid, Galactocerebroside (Übersichtsartikel in: Olsen & Akirav, 2015) und die 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) (Othman et al., 2011). Diese Marker werden, bis auf den PDGF-Rezeptor, ebenfalls von ausdifferenzierten Oligodendrozyten exprimiert. Zusätzlich exprimieren reife, myelinisierende Oligodendrozyten Adenomatous polyposis coli (APC) (Salinas Tejedor et al., 2015) und verschiedene Myelinproteine wie das Proteolipidprotein (PLP), das Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG), das basische Myelinprotein (MBP) oder das Myelin-assozierte Glykoprotein (MAG) (Übersichtsartikel in: Olsen & Akirav, 2015).

1.2.2 Funktion

Die Funktion von Oligodendrozyten ist die Myelinisierung von Axonen. Dies ist die Grundlage für die elektrische Isolierung der Axone gegenüber ihrer Umgebung und ermöglicht die schnelle Weiterleitung von Aktionspotenzialen (Suminaite et al., 2019). Die Oligodendrozyten bilden außerdem eine metabolische Unterstützung für die Axone und erhalten ihre Integrität (Fünfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012).

Die Myelinisierung hängt wie die Differenzierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren ab. Während Achaete-Scute-Homolog 1 (ASCL-1) in Kombination mit OLIG-2 oder Homeobox protein Nkx-2.2 (Nkx2.2) (Li et al., 2009) ebenso wie eine Hyperthyreose (Adamo et al., 1990) fördernd auf die Myelinisierung wirken, wird sie beispielsweise durch HES-5 inhibiert (Li et al., 2009). Die elektrische Aktivität benachbarter Axone wirkt ebenfalls fördernd auf die Myelinisierung (Demerens et al., 1996).

Die Oligodendrozyten myelinisieren Axone, indem sie diese mit ihren Zellfortsätzen mehrfach umwickeln (vgl. Abbildung 2). Durch diesen Vorgang entsteht eine multilamellare Myelinschicht, die durch das Verdrängen von Zytoplasma kompaktiert wird. Zwischen den Fortsätzen der Oligodendrozyten liegen axonale Bereiche, die nicht myelinisiert sind, die Ranvier'schen Schnürringe. Auf diese Weise kann ein Oligodendrozyt bis zu 60 verschiedene Axone myelinisieren (McDonald & Belegu, 2006), wobei neue Myelinscheiden laut Czopka et al. nur in einer sehr kurzen Zeitperiode von etwa 5 Stunden nach Beginn der Myelinisierung von Oligodendrozyten erzeugt werden.

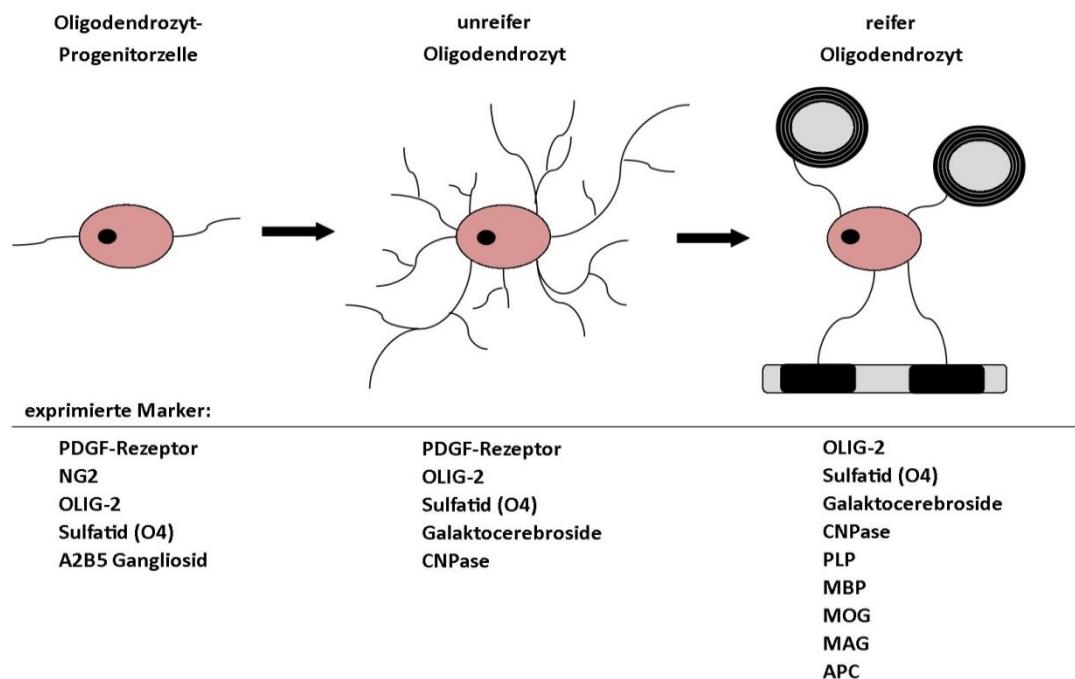


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklungsphasen von Oligodendrozyten

In der oberen Reihe sind die morphologischen Besonderheiten der einzelnen Entwicklungstufen schematisch dargestellt. Mit zunehmender Reifestufe bildet die Progenitorzelle zunächst zahlreiche längere Fortsätze aus und beginnt dann nach der Differenzierung mit der Myelinisierung von Axonen. In der unteren Reihe findet sich für jede Entwicklungsstufe eine Auswahl an typischen, exprimierten Markern. Quelle: Abbildung in Anlehnung an Dornblut, 2018, S. 12

1.3 Das Protein CPI-17

1.3.1 Vorkommen und Proteinstruktur

Das Protein C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor (CPI-17) oder Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14a (PPP1R14A) ist ein 17 Kilodalton (kDa) schweres Protein. Es wird vom *ppp1r14a*-Gen kodiert, welches sich beim Menschen auf Chromosom 19 befindet.

Die Expression von CPI-17 beschränkt sich unter Normalbedingungen auf wenige Zelltypen. Dazu gehören z.B. glatte Muskelzellen (Eto et al., 1997; Woodsome et al., 2001), Endothel- und Epithelzellen (Eto, 2009). Innerhalb des ZNS wird CPI-17 nach heutigem Kenntnisstand von Oligodendrozyten (Dornblut, 2018; Takada & Appel, 2010) exprimiert. Laut Dornblut, 2018 ist das Protein sowohl im Zellkern als auch im Zellkörper und der Zellmembran lokalisiert. Frühere Studien konnten außerdem eine Expression von CPI-17 in verschiedenen Tumorzelllinien wie z.B. Schwannomen oder Melanomen (Hagel et al., 2016; Riecken et al., 2016) und in Purkinje-Zellen der Maus (Eto et al., 2002) nachweisen.

Die dreidimensionale Struktur von CPI-17 wird durch 4 Helices gebildet, die sich in Form von zwei antiparallelen Paaren V-förmig überkreuzen (vgl. Abbildung 3). Das erste Helix-Paar (B/C-Helices) liegt zentral innerhalb des Proteins und wird von zwei großen Spiralschleifen flankiert, die durch den N- und den C-Terminus entstehen. Diese beiden Termini sind einzigartig für das Protein (Eto, 2009) und werden durch das zweite Helix-Paar (A/D-Helices) zusammengehalten. Helix B ist mit Helix C und Helix C ist wiederum mit Helix D jeweils über eine kurze Schleife verbunden. Helix D und Helix A sind über hydrophobe Wechselwirkungen aneinander fixiert (Ohki et al., 2001)

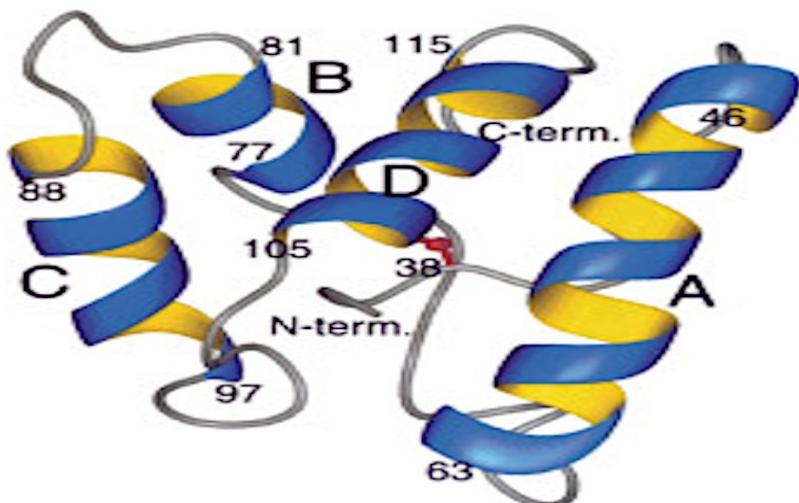


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur von CPI-17

Die dreidimensionale Struktur von CPI-17 besteht aus vier Helices, die in zwei antiparallelen Paaren angeordnet sind. Die Helices sind mit Großbuchstaben gekennzeichnet. Der Beginn und das Ende jeder Helix ist mit der Nummer des jeweiligen Restes bezeichnet.

Quelle: Ohki et al., 2001

Das Protein CPI-17 existiert außerdem in einer phosphorylierten Form. Diese Form ist die aktive Form von CPI-17, da eine Phosphorylierung die inhibitorische Potenz um das bis zu 1000-fache steigern kann (Ohki et al., 2001). Die Phosphorylierungsstelle von CPI-17, Threonin 38, liegt innerhalb einer Schleifenstruktur am N-Terminus zwischen den Helices (Eto et al., 2007). Diese Schleifenstruktur wird P-Loop genannt. Phosphorylierende Enzyme sind z.B. die Proteinkinase C (PKC) und einige ihrer Isoformen, die Rho-associated protein kinase (ROCK) und die Integrin-linked kinase (ILK) (Eto, 2009). Der wichtigste strukturelle Unterschied zwischen der dephosphorylierten und der phosphorylierten Form von CPI-17 ist ein Positionswechsel von Threonin 38. Nach der Phosphorylierung kommt es zur Freilegung der Seitenkette von Threonin 38 (Eto et al., 2007). Diese Freilegung erzeugt eine schwingende Bewegung des P-Loops um die A-Helix, wodurch diese sich um 29° nach rechts dreht. Durch diese Bewegung werden neue Bindungsstellen an der A-Helix freigesetzt, welche dann für die Myosin-Phosphatase zugänglich sind (Eto et al., 2007; Ohki et al., 2001). Die aus diesen Vorgängen resultierende Kompaktierung der vier Helices, mit Bildung eines hydrophoben Kerns, sorgt im Folgenden für die Stabilisierung dieser aktiven Form (Eto et al., 2007).

1.3.2 Funktion

Die Funktion von CPI-17 ist die Inhibition der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLKP). Für die Erfüllung dieser Funktion sind dabei vor allem die Proteinreste 35-120 erforderlich (Ohki et al., 2001). Die Inhibition selbst erfolgt dann wahrscheinlich durch die Bindung des P-Loops an das aktive Zentrum der MLKP (Eto et al., 2007). Die MLKP und damit auch CPI-17 sind in mehrere Signalwege involviert. Je nach Signalweg und betrachtetem Gewebe erzeugt CPI-17 also unterschiedliche Effekte.

Der bis heute am besten untersuchte Signalweg, in welchen die MLKP und CPI-17 involviert sind, ist jener in glatten Muskelzellen. Diese Signalkaskade reguliert das Ausmaß der muskulären Kontraktion, welches von der Anzahl der phosphorylierten leichten Ketten des Myosins abhängig ist. Diese Anzahl wird von zwei Enzymen beeinflusst. Zum einen von der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLKK), welche die leichten Ketten des Myosins phosphoryliert. Zum anderen von der MLKP, welche die leichten Ketten dephosphoryliert. Das Aktivitätsverhältnis dieser beiden Enzyme ist somit ein entscheidender Faktor in der Regulation der Kontraktion. Die Inhibition der MLKP durch CPI-17 führt zu einer verminderten Dephosphorylierung der leichten Ketten und damit zu einem erhöhten Kontraktionsgrad der Muskulatur (Eto et al., 2007). Die Aktivität der MLKP und auch die der MLKK können zusätzlich durch weitere Faktoren beeinflusst werden. Dazu gehören unter anderem die zytoplasmatische Calcium (Ca^{2+})-Konzentration, ROCK oder G-Proteine (Übersichtsartikel in: Kuo & Ehrlich, 2015). Diese Faktoren und ihr Zusammenwirken innerhalb des Signalweges sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

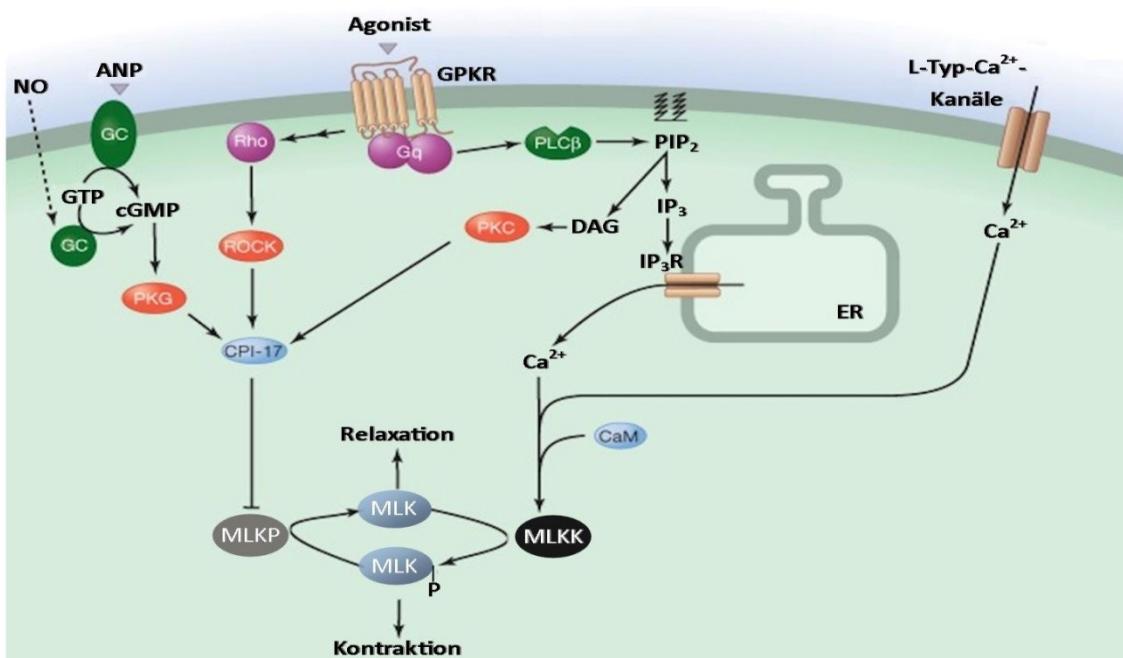


Abbildung 4: Kontraktionsregulierung im glatten Muskel

Die MLKK wird durch einen Calcium-Calmodulin (CaM)-Komplex aktiviert. Das Calcium stammt aus dem Extrazellulärraum oder dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Verschiedene Effektormoleküle können über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und nachgeschaltete Enzyme (z.B. Guanylatzyklase (GC) oder ROCK) die Aktivität der MLKP und der MLKK darüber hinaus beeinflussen. Quelle: modifiziert und übersetzt nach: Kuo & Ehrlich, 2015

Einleitung

Frühere Studien konnten zusätzlich zeigen, dass CPI-17 nicht nur über diese direkte Beeinflussung der MLKP-Aktivität einen Einfluss auf die Kontraktion hat. Gleichzeitig scheint CPI-17 auch die Kinetik der Ca^{2+} -Sensitivierung zu beeinflussen (Sakai et al., 2017).

Ein weiterer Signalweg, in welchen die MLKP und CPI-17 involviert sind, ist der sogenannte Merlin-Signalweg (vgl. Abbildung 5). Dieser Signalweg reguliert die Aktivität der kleinen Guanosintriphosphat

(GTP)ase Rat sarcoma (Ras).

Dieses Protein ist an der Kontrolle verschiedener zellulärer Prozesse wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Migration, beteiligt (Riecken et al., 2016).

Die aktive-GTP-gebundene Form von Ras steht mit der inaktiven, Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen Form im Gleichgewicht. Zur vollständigen Aktivierung von Ras ist also ein Austausch von GDP gegen

GTP nötig (Übersichtsartikel in: Vetter & Wittinghofer, 2001), für den der Nukleotidaustauschfaktor Son of sevenless (SOS) und die Proteine Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) benötigt werden. Die ERM-Proteine bilden einen Komplex, welcher die Annäherung von SOS und GTP-Ras ermöglicht (Geissler et al., 2013). Der Austausch von GDP gegen GTP und damit die Bildung der aktiven Form von Ras werden erleichtert. Die beschriebenen Funktionen der ERM-Proteine werden von dem strukturell verwandten Tumorsuppressor Merlin antagonisiert (Geissler et al., 2013). Die Aktivität der ERM-Proteine und Merlin wird durch Phosphorylierung beeinflusst. Während eine Phosphorylierung die Aktivität der ERM-Proteine erhöht (Pearson et al., 2000; Shaw et al., 2001; Yonemura et al., 2002), inhibiert sie die tumorsuppressive Funktion von Merlin (Shaw et al., 2001). Das einzige bekannte Enzym für die Dephosphorylierung der ERM-Proteine und Merlin ist die MLKP (Fukata et al., 1998; Jin et al., 2006). Eine hohe Expression von CPI-17 und die damit verbundene Inhibition der MLKP bewirken eine verminderte Dephosphorylierung der ERM-Proteine und Merlin. Folglich wird Merlin in geringerem Ausmaß aktiviert und die Ras-Aktivität steigt, was zu Proliferation und Tumorgenese führt (Jin et al., 2006; Riecken et al., 2016).

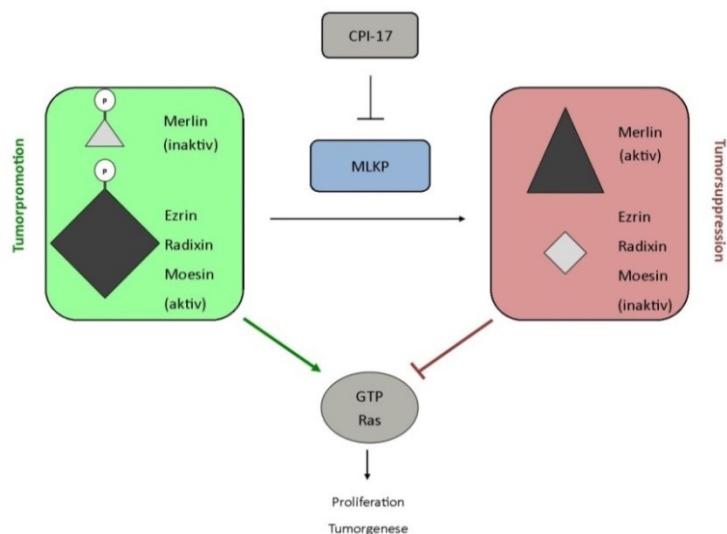


Abbildung 5: Der Merlin-Signalweg

CPI-17 beeinflusst über die Hemmung der MLKP direkt die Aktivität der ERM-Proteine und Merlin. Die wiederum beeinflussen die Aktivität von GTP-Ras. Quelle: Abbildung in Anlehnung an Riecken et al., 2016

Das Protein CPI-17 scheint zusätzlich zu den bereits genannten Funktionen auch einen Einfluss auf die Differenzierung von Oligodendrozyten zu haben. Diese Annahme beruht auf Untersuchungen des Expressionsmusters in reifen Oligodendrozyten beziehungsweise (bzw.) dessen Veränderungen im Zuge ihrer Differenzierung.

In zwei unabhängigen Studien konnte mithilfe der RNA-Sequenzierung und des Microarrays sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* nachgewiesen werden, dass das für CPI-17 kodierende *ppp1r14a*-Gen zu den 40 am stärksten exprimierten Genen in reifen Oligodendrozyten gehört (Cahoy et al., 2008; Zhang et al., 2014). Des Weiteren wurde das *ppp1r14a*-Gen als eines der 60 Gene identifiziert, die während der Differenzierung zu adulten Oligodendrozyten am stärksten reguliert werden (Cahoy et al., 2008; Dugas et al., 2006).

Im Zuge von späten Remyelinisierungsvorgängen gehört das *ppp1r14a*-Gen ebenfalls zu den, in diesem Fall 10, am stärksten regulierten Genen, was zu der Annahme führt, dass CPI-17 auch im Zuge der Remyelinisierung eine wichtige Rolle einnimmt (Huang et al., 2011).

1.4 Das Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Modell ist ein Beispiel für ein toxisches, zytodegeneratives Tiermodell. Es eignet sich besonders zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsvorgängen (Übersichtsartikel in: Kipp et al., 2009;

Praet et al., 2014). Die erste chemische Beschreibung von Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazone) erfolgte 1950 durch Gustav Nilsson. Dieser charakterisierte den Kupferchelator als ein Kondensationsprodukt aus Oxalylhydraziden und Cyclohexanonen (vgl.

Abbildung 6). In den 1960er Jahren wurde Cuprizone erstmalig von William

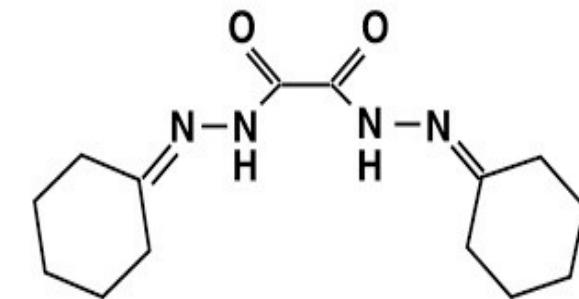


Abbildung 6: Strukturformel von Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazone)

W. Carlton in einem Tierexperiment angewandt. Im Verlauf dieses Experiments konnte er verschiedene Veränderungen im ZNS behandelter Tiere beobachten. Neben einer zentralen Demyelinisierung wiesen die Tiere weitere Begleitsymptome wie einen Hydrocephalus oder zerebelläre Ödeme auf (Carlton, 1967). In den darauffolgenden Jahren wurden zahlreiche weitere Experimente unter Verwendung von Cuprizone durchgeführt. Als Ergebnis dieser Experimente zeigte sich, dass die Wirkung von Cuprizone auf den Organismus von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Zu diesen Faktoren sind zum einen die Dauer der Applikation und die applizierte Dosis zu zählen (Übersichtsartikel in: Gudi et al., 2014). Zum anderen sind auch der verwendete Mausstamm (Yu et al., 2017) sowie das Alter (Doucette et al., 2010), das Geschlecht und das Gewicht der Tiere (Übersichtsartikel in: Gudi et al., 2014) von Bedeutung. Mittlerweile hat sich eine Cuprizone-Konzentration von 0,2-0,25% etabliert. Die Intoxikation von C57BL/6-Mäusen mit Cuprizone in dieser Konzentration und über einen Zeitraum von fünf bis sechs Wochen führt zu einer symmetrischen, reproduzierbaren und nahezu vollständigen Demyelinisierung des medialen Corpus callosum, ohne dass die Versuchstiere Zeichen einer Hepatotoxizität aufweisen (Hiremath et al., 1998).

Die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung beschränkt sich jedoch nicht nur auf das Corpus callosum, sondern lässt sich auch in anderen Regionen des ZNS nachweisen. Dabei sind sowohl weitere Regionen der weißen Substanz als auch Regionen der grauen Substanz betroffen. Zu diesen Regionen gehören z.B. der primär somatosensorische und der primär somatomotorische Cortex (Gudi et al., 2009; Skripuletz et al., 2008), der Pedunculus cerebellaris superior (Blakemore, 1973a), der Hippocampus (Hoffmann et al., 2008) oder, wenngleich weniger stark ausgeprägt, das Cerebellum (Skripuletz et al., 2010).

In Bezug auf die Dauer der Cuprizone-Applikation und dem Auftreten einer spontanen Remyelinisierung wird im Cuprizone-Modell zwischen einer akuten und einer chronischen Demyelinisierung unterschieden.

Eine akute Demyelinisierung tritt auf, wenn die Cuprizone-Applikation über fünf bis sechs Wochen erfolgt. Das mediale Corpus callosum ist nach dieser Dauer fast vollständig demyelinisiert (Übersichtsartikel in: Kipp et al., 2009). Nach anschließendem Absetzen des Cuprizones lässt sich eine spontane Remyelinisierung beobachten (Blakemore, 1973b). Von einer chronischen Demyelinisierung spricht man, wenn das Cuprizone für 12 Wochen oder länger appliziert wird. Nach dieser Applikationsdauer lässt sich nach Absetzen des Cuprizones nur sehr verzögert eine spontane Remyelinisierung nachweisen (Übersichtsartikel in: Kipp et al., 2009).

Neben der Demyelinisierung sind die Apoptose von reifen Oligodendrozyten (Goldberg et al., 2013; Hesse et al., 2010; Matsushima & Morell, 2001) und die Proliferation von OPZ (Gudi et al., 2009; Islam et al., 2009) weitere Merkmale dieses Tiermodells. Insbesondere reife, myelinisierende Oligodendrozyten sind dabei gegenüber Cuprizone vulnerabel. (Bénardais et al., 2013; Matsushima & Morell, 2001). Der hohe Energiebedarf dieser Zellen wird als möglicher Grund angesehen. (Übersichtsartikel in: Praet et al., 2014). Die ersten Oligodendrozyten mit einem apoptotischen Phänotyp lassen sich bereits 2 Tage nach Beginn der Cuprizone-Intoxikation nachweisen (Hesse et al., 2010). Bei dem Großteil der reifen Oligodendrozyten kommt es innerhalb der ersten drei Wochen der Cuprizone-Intoxikation zur Apoptose (Hesse et al., 2010) und nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation lassen sich nahezu keine reifen Oligodendrozyten mehr nachweisen (Matsushima & Morell, 2001).

Die bereits beschriebenen Prozesse werden von einer ausgeprägten Mikrogliaaktivierung (Hiremath et al., 1998; Remington et al., 2007), einer Astrogliose (Doucette et al., 2010; Hiremath et al., 1998) und akutem, axonalen Schaden (Höflich et al., 2016) begleitet. Die Blut-Hirn-Schranke ist in diesem Tiermodell hingegen weitgehend intakt (Bakker & Ludwin, 1987; Matsushima & Morell, 2001).

Im Gegensatz zu anderen Tiermodellen ist das Cuprizone-Modell nicht primär durch eine autoimmune Komponente gekennzeichnet. Den aktivierte Mikrogliazellen und reaktiven Astrozyten wird aber aufgrund ihrer Fähigkeit, Chemokine und proinflammatorische Zytokine zu produzieren, eine Rolle bei der Progression der Demyelinisierung zugeschrieben (Pasquini et al., 2007).

Außerdem konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich nachweisen, dass es im Cuprizone-Modell zu einer Rekrutierung von T-Zellen in das ZNS kommt (Kaddatz et al., 2020).

Der genaue Wirkmechanismus von Cuprizone ist nicht vollständig geklärt. Als Kupferchelator senkt Cuprizone die Kupfer-Spiegel im Gehirn behandelter Tiere (Matsushima & Morell, 2001) und stört so die Kupfer-Homöostase (Benetti et al., 2010). Kupfer ist ein essenzieller Bestandteil verschiedener mitochondrialer Enzyme, wie z.B. der Monoaminoxidase oder der Cytochromoxidase. Die Aktivität dieser Enzyme ist nach Cuprizone-Intoxikation vermindert (Goldberg et al., 2013; Venturini, 1973). Gleichzeitig führt Cuprizone zur Bildung von sogenannten „Riesenmitochondrien“ in der Leber behandelter Tiere (Kipp et al., 2009; Matsushima & Morell, 2001; Venturini, 1973). Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass die apoptotische Wirkung von Cuprizone auf metabolischen (Hemm et al., 1971) bzw. oxidativen Stress (Fischbach et al., 2018) zurückzuführen ist.

2. Fragestellungen

Die genauere Erforschung der Einflussfaktoren auf die Demyelinisierung ist von essenzieller Bedeutung für das bessere Verständnis der Pathogenese der MS und der Läsionsentstehung. Gleichzeitig könnte die Identifizierung eines Einflussfaktors zur Entstehung neuer Ansatzpunkte für Präventionsmaßnahmen und MS-Therapeutika führen.

Das Protein CPI-17 wird von Zellen des ZNS exprimiert. Frühere Studien konnten zeigen, dass Oligodendrozyten CPI-17 exprimieren und dass CPI-17 möglicherweise einen Einfluss auf die Differenzierung von Oligodendrozyten hat (Cahoy et al., 2008; Dugas et al., 2006; Zhang et al., 2014). Es ist jedoch nicht geklärt, ab wann im Verlauf des Reifeprozesses der Oligodendrozyten die Expression von CPI-17 erfolgt. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Frage beantwortet werden:

- **Wann im Verlauf ihres Reifeprozesses beginnen Oligodendrozyten das Protein CPI-17 zu exprimieren?**

Das Protein CPI-17 könnte auf funktioneller Ebene eine wichtige Rolle im Zuge der Remyelinisierung einnehmen (vgl. Kapitel 1.3.2). Dies führt zu der Annahme, dass die Expression von CPI-17 auch für die allgemeine Myelininstabilität in einem toxischen MS-Mausmodell von Bedeutung ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss eines CPI-17-Knockouts ($CPI-17^{-/-}$) im Cuprizone-Modell untersucht. Die konkrete Fragestellung lautete:

- **Weisen $CPI-17^{-/-}$ -Mäuse ein erhöhtes Ausmaß Cuprizone-induzierter Schädigungen im Vergleich zu Tieren mit einem $CPI-17^{+/+}$ -Genotyp auf?**

3. Material und Methoden**3.1 Materialien und Chemikalien****Tabelle 1: Verwendete Materialien und Chemikalien**

Material/Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
3,3-Diaminobenzidin + Chromogen	Dako	K3468
3,3-Diaminobenzidin + Substrat	Dako	K3468
4',6-Diamidin-2-phenylindol	Roth	6335.1
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazone)	Sigma-Aldrich	C9012
Deckgläser (24x50mm)	Menzel-Gläser	19 00 02450
Depex	Serva	18243.02
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth	T877.1
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	1.06580.1000
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth	X986.2
Elite ABC-Kit	VECTASTAIN	PK-6100
Essigsäure (Eisessig)	J.T.Baker	6052
Ethanol 100%	Walter-CMP	WAL642 6025
Ethanol 50%, 70%, 90%, 96%	Walter-CMP	WAL641 6025
Formaldehydlösung 37%	Merck	1.03999. 1000
Formaldehydlösung 37%	Roth	7398.4
Futtermehl	Ssniff	V1530-000
Haltungsfutter	Ssniff	V1534-000
Immu-Mount™ – Shandon	Thermo Scientific	9990402
Intermedium: Xylene Ersatz	Sigma-Aldrich	A5597
Kaliumchlorid	Roth	6781.3
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	P018.2
Ketamin 10%	HFW	Zul.-Nr. 27015.00.00
Lithiumcarbonat	Merck	1.05680.0250
Luxol Fast Blue	Sigma	S3382-25G
Mayers Hämalaunlösung	Merck	1.09249.0500
Natriumchlorid	Roth	0962.2

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	1.06346.1000
Natronlauge	Merck	1.06469.1000
Normales Eselserum	Sigma Aldrich	D9663
Normales Ziegenserum	Vector	S-1000
Paraffin, 57-60°C	Merck	1.07158.9025
Periodsäure	Merck	1.00524.0100
Salzsäure 37%	Merck	1.00317.1000
Schiff'sche Reagenz	Merck	1.09033.0500
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific	J1800AMNZ
Tris (PUFFERAN®)	Roth	AE15.2
Wasserstoffperoxid 35% (H ₂ O ₂)	Merck	1.08600.1000
Xylazin (Rompun® 2%)	Bayer	Zul.-Nr. 6293841.00.00
Xylol	J.T.Baker	8118.25

3.2 Puffer, Blockseren und Färbelösungen

- 1. Phosphatpufferlösung (PBS) (10x Lösung):** 400g Natriumchlorid
10g Kaliumchlorid
84g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
13,5g Kaliumdihydrogenphosphat
5000ml destilliertes Wasser
pH-Wert auf 7,4 eingestellt
- 2. PBS (1x Lösung):** 500ml PBS (10x Lösung)
4500ml destilliertes Wasser
pH-Wert auf 7,4 eingestellt
- 3. Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)- Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer:**
6,05g Tris
1,85g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat
5000ml destilliertes Wasser
pH-Wert auf 9,0 eingestellt
- 4. Blockserum (1):** Verdünnung 1:20
2,5ml Normales Ziegenserum
47,5ml PBS (1x)

5. Blockserum (2):	Verdünnung 1:20 2,5ml Normales Eselserum 47,5ml PBS (1x)
6. 0,35% H₂O₂:	Verdünnung 1:100 1ml H ₂ O ₂ (35%) 99ml PBS
7. 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Komplex:	Verdünnung 1:50 2µl DAB-Chromogen 98µl DAB-Substrat
8. Fixierlösung:	4.6g Natriumdihydrogenphosphat-Mono- hydrat 8.0g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 100ml Formaldehydlösung (37%) 900ml destilliertes Wasser pH-Wert auf 7,4 eingestellt
9. Hämatoxylin-Farblösung:	250ml Mayers Hämalaunlösung filtriert
10. Luxol-Fast-Blue-Farblösung:	0,1g Luxol-Fast-Blue 0,5ml Essigsäure (100%) 100ml Ethanol (96%)
11. Lithiumcarbonat-Lösung:	0,05g Lithiumcarbonat 1000ml destilliertes Wasser
12. Lithiumcarbonat-Lösung (Verdünnung 1):	Verdünnung 1:5 50ml Lithiumcarbonat-Lösung 200ml destilliertes Wasser
13. Lithiumcarbonat-Lösung (Verdünnung 2):	Verdünnung 1:10 25ml Lithiumcarbonat-Lösung 225ml destilliertes Wasser
14. Periodsäure-Lösung (0,5%):	0,5g Periodsäure 100ml destilliertes Wasser

3.3 Versuchstiere

Für das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Tierexperiment wurden 18-21g schwere, 5-7 Wochen alte Mäuse verwendet, die aus einer Eigenzucht stammten. Diese Mäuse wiesen entweder einen homozygoten Wildtyp (CPI-17^{+/+}) oder einen homozygoten Knockout (CPI-17^{-/-}) des für CPI-17 kodierenden *ppp1r14a*-Gens auf. Die Knockout-Mäuse wurden ursprünglich von der Firma TaconicArtemis GmbH (Köln, Deutschland) aus Mäusen vom Stamm C57BL/6J generiert (vgl. Dornblut, 2018, S. 22). Die Abkömmlinge dieser Mäuse wurden dann für die Eigenzucht verwendet.

Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)“ in gut belüfteten Polycarbonat-Käfigen mit mindestens 100cm² Grundfläche pro Tier. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gewechselt und waren standardmäßig mit Einstreu, Versteckmöglichkeit, Nestbaumaterial, Kauholz, Standard-Haltungsfutter und frischem Wasser ausgestattet. Die Tiere wurden bei einem festgelegten Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden und einer standardisierten Raumtemperatur von 23 ± 2°C gehalten. Eine regelmäßige Luftzirkulation war ebenfalls gewährleistet. Bei der jährlichen Kontrolle des Tierhygienestatus nach FELASA-Richtlinien wurden in Sentinelieren in der Tierhaltung Helicobacter, Murines Norovirus, Oxyuren (Syphacia spp.) und Flagellen nachgewiesen.

Bei allen Versuchstieren wurden die aktuell geltenden Tierschutzbestimmungen eingehalten. Eine Genehmigung für die Durchführung des Tierexperimentes gemäß §8 Tierschutzgesetz lag von den Landesbehörden vor (Referenznummer .7221.3-1-001/19).

3.4 Versuchsaufbau

Das Ziel des Experimentes war es zu untersuchen, ob Tiere mit einem CPI-17^{-/-}-Genotyp ein höheres Ausmaß Cuprizone-induzierter Schädigungen aufweisen als Tiere mit einem CPI-17^{+/+}-Genotyp. Die Versuchstiere wurden daher anhand ihres Gewichtes und ihres Genotyps in drei Versuchsgruppen eingeteilt (vgl. Abbildung 7). Neben dem Demyelinisierungsgrad wurden auch die Mikrogliaaktivität und das Ausmaß des akuten axonalen Schadens immunhistochemisch untersucht.

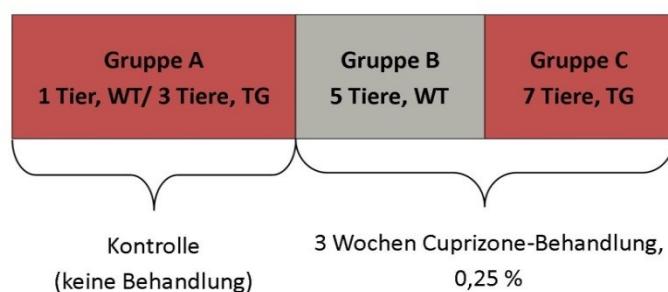


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen
WT= Wildtyp (CPI-17^{+/+}), TG= Transgen (CPI-17^{-/-})

3.5 Durchführung des Versuches

Die Versuchstiere wurden jeweils für 3 Wochen mit Cuprizone behandelt. Gemahlenes Standardfutter (Futtermehl) wurde mit 0,25% Cuprizone versetzt. Dieses Cuprizone-Futtermehl-Gemisch wurde jeden Tag frisch mit einem handelsüblichen Küchenmixer (Kult X, WMF, Geislingen an der Steige, Deutschland) hergestellt. Die Kontrollgruppen wurden über den gesamten Zeitraum des Tierexperimentes mit normalem Haltungsfutter gefüttert und zusammen mit den Tieren der Behandlungsgruppen transkardial perfundiert. Die Gesundheit der Tiere wurde täglich nach den Kriterien Aktivität, Atmung, Bewegung, Fell, Konstitution und Dehydrierung kontrolliert. Die Tiere wurden einmal wöchentlich gewogen.

Alle Käfige wurden dreimal wöchentlich gewechselt. Die Käfige der Kontrolltiere waren standardmäßig ausgestattet. Die Käfige der Cuprizone-behandelten Tiere waren ebenfalls, mit Ausnahme des Standard-Haltungsfutters, standardmäßig ausgestattet. Das Cuprizone-Futtermehl-Gemisch wurde auf zwei getrennte Petrischalen innerhalb des Käfigs aufgeteilt. Zusätzlich zu dem in Rostock durchgeführten Tierexperiment wurde Material von einem anderen Tierexperiment untersucht. Dieser Versuch wurde von anderen Experimentatoren (Dr. med. M. sc. U. Splietker, Ludwig-Maximilian-Universität München) unabhängig betreut, aber, abgesehen von einigen Abweichungen im Versuchsaufbau (z. B. die Dauer der Cuprizone-Gabe), nach demselben Protokoll durchgeführt. An dem Material des in München durchgeführten Tierexperimentes wurden die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen in Hirnregion 265 vorgenommen. Eine Tabelle mit ausführlicheren Informationen zu diesem Versuch findet sich im Anhang (siehe 11.1).

3.6 Transkardiale Perfusion

Den Mäusen wurde zur Einleitung einer tiefen Narkose ein Ketamin/Xylazin-Gemisch (3 Volumenanteile Ketamin/1 Volumenanteil Xylazin) mit einer Dosis von 0,1ml/10g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Reflexe wurden anschließend, beginnend bei den Hinterläufen durch Kneifen mit einer Pinzette bis zum Auftröpfen von 70%igem-Ethanol auf das Auge, überprüft. Nach vollständiger Reflexlosigkeit wurden die Haut und das Peritoneum der Maus mit einer Schere am unteren Teil des Abdomens eröffnet. Das Peritoneum wurde bis zum Zwerchfell hinauf entfernt. Das Zwerchfell wurde eröffnet, der Brustkorb seitlich an den Rippen abgetrennt und hochgeklappt. Anschließend wurde ein kleiner Schnitt im rechten Vorhof gesetzt und eine stumpfe Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Manuell wurde dann zunächst mit 20ml PBS (1x) und anschließend mit 30ml Fixierlösung gespült. Danach wurde die Maus an einer Schlauchpumpe (IPC-4, IsmaTec, Wertheim, Deutschland) mit einer Geschwindigkeitseinstellung von 40 (entspricht etwa 22ml/min) weitere 7 Minuten perfundiert. Der Kopf wurde anschließend mit einer scharfen Schere abgetrennt und die Kalotte vorsichtig sagittal eröffnet. Der gesamte Kopf mit eröffneter Kalotte und Hirn wurde über Nacht bei 4°C in Fixierlösung belassen. Am Folgetag wurde das Hirn herauspräpariert und in Einbettkassetten überführt.

3.7 Entwässerung, Einbettung und Schnitt

Die Einbettkassetten wurden für mindestens 6 Stunden unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Anschließend erfolgten eine manuelle Dehydrierung unter Schütteln bei Raumtemperatur und die Einbettung in Paraffinblöcke (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Manuelle Entwässerung und Einbettung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	70% Ethanol	2 Tage
2	80% Ethanol	4 h
3	90% Ethanol	über Nacht
4	96% Ethanol	4 h
5	100% Ethanol	über Nacht
6	Intermedium (Xylene Ersatz) 1	60 min
7	Intermedium (Xylene Ersatz) 2	60 min
8	Paraffin 1	1 Tag
9	Paraffin 2	1 Tag
10	Paraffin 3	3 Tage

Nach vollständiger Aushärtung der Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte wurden 5µm dicke Paraffinschnitte mithilfe eines Rotationsmikrotoms (RM 2255, Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Die Paraffinblöcke wurden bis zu definierten Hirnregionen angeschnitten und das dabei entstehende Material verworfen. Als Orientierung zum Auffinden der definierten Hirnregionen diente der Maus-Hirn-Atlas von Sidman et al., 1971. Es wurden die Regionen 215 (Zusammenschluss der Commissura anterior) und 265 (rostraler Hippocampus) identifiziert (vgl. Abbildung 8). Auf diese folgend wurden jeweils zwei Hirnschnitte pro Objektträger aus dem warmen Wasserbad (43-45°C) auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank.

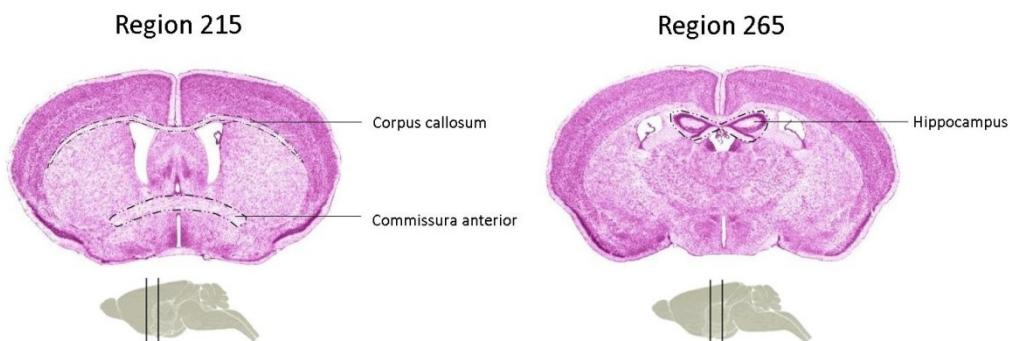


Abbildung 8: Regionen 215 und 265 (Maus-Hirn-Atlas von Sidman et al.)

Region 215 ist durch den Zusammenschluss der Commissura anterior gekennzeichnet. Region 265 liegt auf Höhe des rostralen Endes des Hippocampus. Quelle: modifiziert nach Sidman et al., 1971

3.8 Histologische Färbungen

3.8.1 „Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“ (LFB/PAS)-Färbung

3.8.1.1 Prinzip einer „Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“ (LFB/PAS)-Färbung

„Luxol-Fast-Blue“ (LFB) ist ein basischer Kupferphthalocyanin-Farbstoff. Dieser geht in saurer, ethanolischer Lösung starke Verbindungen mit dem Lipoproteingerüst der Myelinscheiden ein (Humphrey et al., 2008, S. 681). Dadurch erscheinen die Myelinscheiden nach der Färbung blau.

„Periodic-Acid-Schiff“ (PAS) ist eine Kombination aus Periodsäure und Schiff`scher Reagenz. Die Periodsäure bewirkt eine Oxidation von OH-Gruppen und damit die Entstehung von Aldehydgruppen. Diese Aldehydgruppen reagieren mit dem Schiff`schen Reagenz, welches dadurch in einen purpurroten Farbstoff umgesetzt wird. Alle kohlenhydratreichen Makromoleküle (z.B. Glykogene oder Muzine) erscheinen daher nach der Färbung rosa/rot.

Die Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaunlösung beruht auf den elektrostatischen Eigenschaften des enthaltenen Hämatoxylins. Da es sich um einen kationischen Farbstoff handelt, erfolgt die Bindung an anionische Zellkomponenten wie z.B. die DNS. Die Zellkerne erscheinen aufgrund ihres hohen Gehalts an DNS daher nach der Färbung blau.

Ein optimales Färbeergebnis ist erreicht, wenn die myelinisierte weiße Substanz kräftig blau angefärbt ist und die graue Substanz rosa/rot erscheint (vgl. Abbildung 9). Der Grad der Demyelinisierung kann dann beurteilt werden.

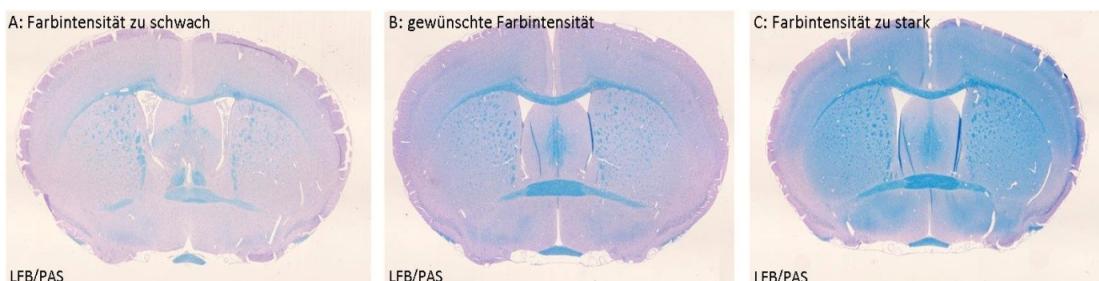


Abbildung 9: Ergebnisse einer LFB/PAS-Färbung am Hirn

(A) Zu schwache Farbintensität bei übermäßiger Differenzierung. **(B)** Optimales Färbeergebnis. Die weiße Substanz ist kräftig blau angefärbt und lässt sich deutlich von der rosa/rot erscheinenden grauen Substanz abgrenzen. **(C)** Zu starke Farbintensität bei ungenügender Differenzierung. Die graue Substanz ist noch deutlich blau angefärbt.

3.8.1.2 Durchführung einer „Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“ (LFB/PAS)-Färbung

Die Färbung aller Objektträger einer Färbereihe wurde zur selben Zeit und nach demselben Arbeitsprotokoll durchgeführt. Dies gewährleistet einheitliche, vergleichbare Färbeergebnisse.

Da LFB in Ethanol gelöst ist, ist eine vollständige Rehydrierung der Gewebe nicht notwendig. Zu Beginn der Färbung erfolgte daher eine Entparaffinierung mit Beginn in Xylool und eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe mit Ende in 96%igem Ethanol (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Entparaffinierung und Rehydrierung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Xylol 1	10 min
2	Xylol 2	10 min
3	Xylol 3	10 min
4	Xylol 50%/Ethanol 50%	5 min
5	100% Ethanol	3 min
6	100% Ethanol	3 min
7	96% Ethanol	3 min
8	96% Ethanol	3 min

Danach wurden die Objektträger in LFB-Farblösung inkubiert. Dies erfolgte über Nacht bei 56°C in einem Wärmeschrank.

Am nächsten Tag wurde die überschüssige Farblösung durch kurzes Eintauchen, zuerst in 96%igen Ethanol und dann in destilliertes Wasser, von den Objektträgern abgespült. Anschließend erfolgte die Differenzierung in verschiedenen Verdünnungen einer Lithiumcarbonat-Lösung (vgl. Tabelle 4). Die wiederholte mikroskopische Beurteilung der Schnitte war dabei notwendig, um zu entscheiden, wie oft die einzelnen Schritte durchgeführt werden müssen. Nach erfolgreicher Differenzierung war die graue Substanz farblos und die weiße Substanz kräftig blau angefärbt.

Tabelle 4: Differenzierung von LFB

Chemikalie	Zeit	Bemerkung
Lithiumcarbonat-Lösung Verdünnung 1	10 sec	Grob differenzierung
70% Ethanol	10 min	Auswaschen der Farbe
destilliertes Wasser		mikroskopische Beurteilung
Lithiumcarbonat-Lösung Verdünnung 2	10 sec	Feindifferenzierung
70% Ethanol	10 min	Auswaschen der Farbe
destilliertes Wasser		mikroskopische Beurteilung

Vor der Durchführung der PAS-Reaktion und der Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaunlösung wurden die benötigten Färbezeiten mit einem Objektträger getestet, da sie abhängig vom Alter der Färbelösungen von Färbung zu Färbung variieren können. Die einzelnen Schritte der jeweiligen Färbungen sind nachfolgend in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: PAS-Färbung und Kerngegenfärbung

Chemikalie	Zeit	Bemerkung
Periodsäure-Lösung (0,5%)	2 min	
destilliertes Wasser	kurz eintauchen	Spülen
Schiff'sche Reagenz	45 sec – 10 min	farblos
fließendes Leitungswasser	5 min	Schiff'sche Reagenz färbt sich pink
destilliertes Wasser	kurz eintauchen	
Mayers Hämalaunlösung	5-20 sec	Kerngegenfärbung
HCl-Alkohol	kurz eintauchen	
fließendes Leitungswasser	5 min	„Bläuen“
destilliertes Wasser		

Als letztes erfolgten die Entwässerung ab 80%igem Ethanol (vgl. Tabelle 6) und das Eindecken mit Depex.

Tabelle 6: Entwässerung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	80% Ethanol	3 min
2	96% Ethanol	3 min
3	100% Ethanol	3 min
4	100% Ethanol	3 min
5	Xylol 50%/Ethanol 50%	5 min
6	Xylol 1	10 min
7	Xylol 2	10 min
8	Xylol 3	10 min

3.9 Immunhistochemie

3.9.1 Prinzip immunhistochemischer Markierungen

Zur spezifischen Darstellung verschiedener Proteine bzw. verschiedener Antigene im Gewebe wurde die immunhistochemische Markierung nach der ABC-Methode angewandt. Dabei handelt es sich um ein indirektes Markierungsverfahren von Antigenen:

1. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Antigen im Gewebe.
2. Der sekundäre Antikörper (AK), welcher mit Biotin gekoppelt ist, bindet an den Primärantikörper (auch mehrfach möglich, daher Amplifikation des Signals).
3. Der zugesetzte Avidin-Biotin-Enzym-Komplex bindet aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin an den biotinylierten sekundären AK.
4. Bei Vorhandensein von H_2O_2 katalysiert die im Komplex enthaltene Meerrettichperoxidase (HRP) die Umsetzung des phenolischen DAB-Substrates in dessen unlösliche Form. Dabei entsteht ein bräunliches Präzipitat.
5. Je mehr Antigen im Gewebe vorhanden ist, desto mehr Primärantikörper können binden, desto mehr sekundäre AK können binden, desto mehr Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe können binden, desto stärker ist das Signal.

Das gesamte Prinzip ist in Abbildung 10 noch einmal dargestellt.

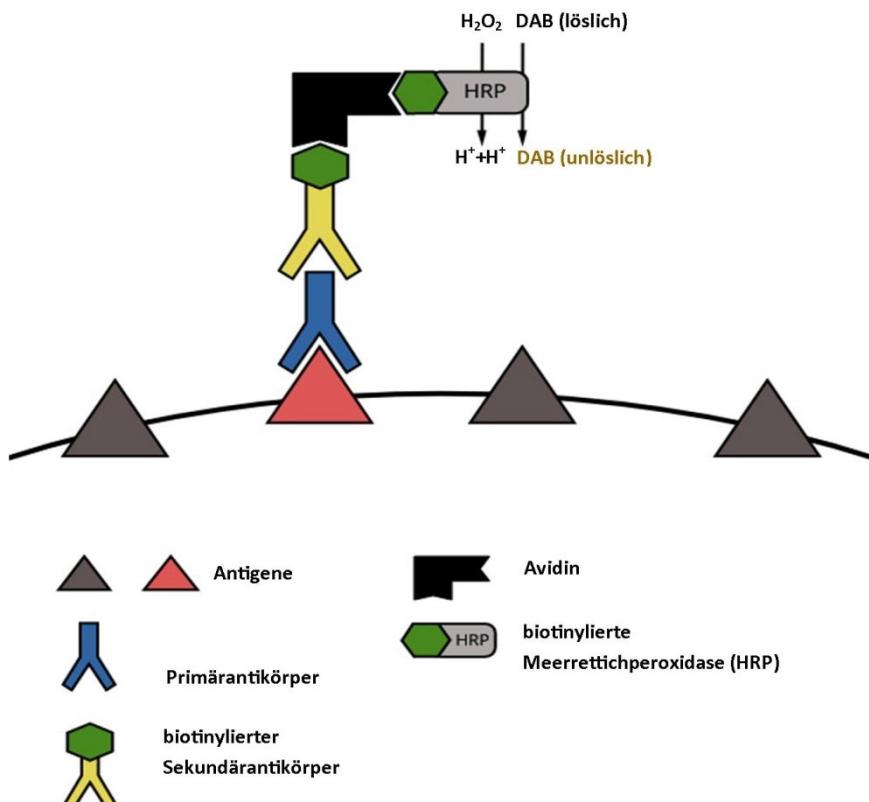


Abbildung 10: Prinzip einer immunhistochemischen Markierung nach der ABC-Methode

Im Verlauf einer immunhistochemischen Markierung kann es aus verschiedenen Gründen zu unspezifischen Anfärbungen kommen. Ein Grund sind unspezifische Bindungen, die sowohl vom primären als auch vom sekundären AK eingegangen werden können. Dafür sind unter anderem Ig-ähnliche Proteine im untersuchten Gewebe verantwortlich, die vom sekundären AK fälschlicherweise gebunden werden und somit ein unspezifisches Signal erzeugen. Um diesem Phänomen vorzubeugen, wird das sogenannte „Blocken“ vor der Zugabe des primären und des sekundären AK durchgeführt. Dazu wird ein Normalserum aus der Spezies verwendet, aus der auch der sekundäre AK stammt. Die Bindungsstellen an Ig-ähnliche Proteine werden von den AK aus dem Normalserum blockiert. Der sekundäre AK kann somit dort nicht mehr binden und das unspezifische Signal wird vermindert. Des Weiteren wurden mögliche unspezifische Bindungen des sekundären AK durch mitgeführte Negativkontrollen überprüft, auf die nur der sekundäre AK, ohne vorherige Zugabe des primären AK, aufgetragen wurde.

Ein weiterer Grund für ein unspezifisches Signal ist die endogene Peroxidase. Dieses gewebsintrinsische Enzym ist in der Lage, die Umwandlung von löslichem DAB-Substrat in dessen unlösliches, braunes Präzipitat zu katalysieren. Da diese Reaktion unabhängig von einer vorherigen Bindung der AK verläuft, kann sie zu einem unspezifischen Signal führen. Um dieser Reaktion entgegenzuwirken, werden die Schnitte für 30 Minuten in 0,35% H₂O₂ in PBS (1x) inkubiert. Die endogene Peroxidase wird gesättigt, wodurch ihre Aktivität und damit auch das unspezifische Signal vermindert werden.

3.9.2 Durchführung immunhistochemischer Markierungen

Die Markierung aller Objektträger einer immunhistochemischen Markierungsreihe wurde zur selben Zeit und nach demselben Arbeitsprotokoll durchgeführt. Dies gewährleistet einheitliche, vergleichbare Ergebnisse.

Zu Beginn der Markierung erfolgten eine Entparaffinierung mit Beginn in Xylol und eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Entparaffinierung und Rehydrierung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Xylol 1	10 min
2	Xylol 2	10 min
3	Xylol 3	10 min
4	Xylol 50%/Ethanol 50%	5 min
5	100% Ethanol	3 min
6	100% Ethanol	3 min
7	96% Ethanol	3 min
8	96% Ethanol	3 min
9	70% Ethanol	3 min
10	50% Ethanol	3 min
11	destilliertes Wasser	3 min

Material und Methoden

Bei der Fixierung und Einbettung der Gewebe kann es zur Bildung von sogenannten Maskierungen („crosslinks“) kommen. Diese Maskierungen blockieren freie Antigene und beeinträchtigen das Ergebnis der immunhistochemischen Markierung. Damit diese maskierten Antigene wieder für den AK zugänglich sind, wurde nach der Entparaffinierung und Rehydrierung gegebenenfalls ein „HIER“ („heat induced epitope retrieval“) durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte für 10 Minuten in Tris/EDTA-Puffer zum Kochen gebracht, was zur Demaskierung der Antigene führt. Dafür wurde eine handelsübliche Mikrowelle verwendet. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt.

Dann wurden die Schnitte unter leichtem Schütteln dreimal für 5 Minuten in mit PBS (1x) gefüllten Küvetten gewaschen. Dies wurde zwischen allen weiteren Schritten, außer zwischen dem „Blocken“ und der Applikation des primären AK, wiederholt.

Als nächstes erfolgte das „Blocken“ mit Blockserum (1). Die Objektträger wurden dazu in eine feuchte Kammer überführt und es wurden jeweils 50µl des Serums pro Schnitt tropfenweise aufgetragen. Dies wurde so für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Serum wurde abgekippt und der primäre AK in entsprechender Verdünnung in Blockserum (1) (vgl. Tabelle 8) tropfenweise aufgetragen. Dabei wurden ebenfalls 50µl pro Schnitt verwendet. Auf die mitgeführten Negativkontrollen wurden hingegen 50µl des Blockserum (1) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper bei immunhistochemischen Markierungen

Antigen	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Demaskierung	Wirt
PLP	BioRad	MCA839G	1:5000	Keine	Maus
APP	Millipore	MAB348	1:5000	Tris/EDTA	Maus
IBA-1	Wako	019-19741	1:5000	Tris/EDTA	Kaninchen
CPI-17	Abcam	ab32213	1:3000	Tris/EDTA	Kaninchen

Am nächsten Tag wurde der primäre AK bzw. das Blockserum (1) abgekippt. Die Schnitte wurden gewaschen und anschließend für 30 Minuten in 0,35% H₂O₂ inkubiert. Dieser Schritt fand unter leichtem Schütteln und unter möglichst geringem Lichteinfall statt.

Danach wurde der sekundäre AK in Blockserum (1) verdünnt (vgl. Tabelle 9) und es wurden jeweils 50µl pro Schnitt tropfenweise aufgetragen. Der sekundäre AK inkubierte für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper bei immunhistochemischen Markierungen

Antikörper	Kopplung	Wirt	Firma	Bestellnummer	Verdünnung
Ziege-Anti-Maus	Biotin	Ziege	Vector	BA 9200	1:200
Ziege-Anti-Kaninchen	Biotin	Ziege	Vector	BA 1000	1:200

Der Avidin-Biotin-Enzym-Komplex wurde mindestens 30 Minuten vor der Applikation aus Reagenz A (Avidin) und Reagenz B (biotinylierte HRP) angesetzt. Dafür wurden beide Reagenzien gemischt und jeweils 1:50 in PBS (1x) verdünnt. Dann wurden pro Schnitt 50µl tropfenweise auf die Objektträger pipettiert und so bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für eine Stunde belassen.

Anschließend wurde der DAB-Komplex mit je 50µl pro Schnitt tropfenweise aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Danach wurde der Komplex durch kurzes Eintauchen in Leitungswasser und anschließende Überführung der Schnitte in destilliertes Wasser abgewaschen.

Als letztes erfolgten eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe mit Beginn in 50% Ethanol (vgl. Tabelle 10) und das Eindecken mit Depex.

Tabelle 10: Entwässerung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	50% Ethanol	3 min
2	70% Ethanol	3 min
3	96% Ethanol	3 min
4	96% Ethanol	3 min
5	100% Ethanol	3 min
6	100% Ethanol	3 min
7	Xylol 50%/Ethanol 50%	5 min
8	Xylol 1	10 min
9	Xylol 2	10 min
10	Xylol 3	10 min

Tabelle 11: Arbeitsprotokoll einer immunhistochemischen Markierung

Schritt	Ablauf
1	Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (vgl. Tabelle 7)
2	Demaskierung („HIER“): zehnminütiges Kochen der Schnitte in Tris/EDTA-Puffer
3	Abkühlung der Objektträger auf Raumtemperatur in einem kalten Wasserbad
4	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
5	„Blocken“ mit 5% Normalserum für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
6	Normalserum abkippen
7	Applikation des Primärantikörpers bzw. des Blockserum (1) und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
8	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
9	30 Minuten Inkubation in 0,35% H ₂ O ₂ unter leichtem Schütteln im Dunkeln
10	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
11	Applikation des Sekundärantikörpers und Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
12	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
13	Applikation des Avidin-Biotin-Enzym-Komplexes und Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
14	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
15	Applikation des DAB-Komplexes zur Visualisierung und Inkubation für 10 Minuten unter einem Abzug
16	10 Sekunden Spülen in Leitungswasser
17	5 Minuten Spülen in destilliertem Wasser
17.1	Je nach Hintergrundsignal: Hämatoxylin (H)-Färbung, 15 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung und anschließend fünf Sekunden in HCl-Alkohol eintauchen
17.2	5 Minuten unter fließendem Leitungswasser inkubieren („bläuen“)
18	Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (vgl. Tabelle 10)
19	Eindecken der Objektträger mit Depex und Deckgläsern unter dem Abzug
20	Trocknen der eingedeckten Schnitte unter dem Abzug

= fakultative Arbeitsschritte

3.10 Immunfluoreszenz

3.10.1 Prinzip von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Zur spezifischen Darstellung von mehr als nur einem Protein bzw. mehr als nur einem Antigen im Gewebe wurden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen angewandt. Die Immunfluoreszenz ist, wie die bereits beschriebene Immunhistochemie, eine indirekte Nachweismethode für Antigene und beruht auf dem nachfolgenden Prinzip:

1. Die unterschiedlichen Primärantikörper aus verschiedenen Spezies binden spezifisch an die gesuchten Antigene im Gewebe.
2. Die unterschiedlichen sekundären AK, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) gekoppelt sind, binden an die Primärantikörper (auch mehrfach möglich, daher Amplifikation des Signals).
3. Die Kerne der Zellen werden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) markiert (ebenfalls fluoreszierend).
4. Die Anregung der Farbstoffe erfolgt am Epifluoreszenzmikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) über Einstrahlung von Licht in der Anregungswellenlänge des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes.
5. Nur dort, wo der sekundäre AK an den gebundenen Primärantikörper binden konnte, ergibt sich ein Signal in Form von emittiertem Licht in der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes.
6. Je mehr Antigen im Gewebe vorhanden ist, desto mehr Primärantikörper können binden, desto mehr sekundäre AK können binden, desto stärker ist das Signal.

Das gesamte Prinzip ist in Abbildung 11 noch einmal dargestellt.

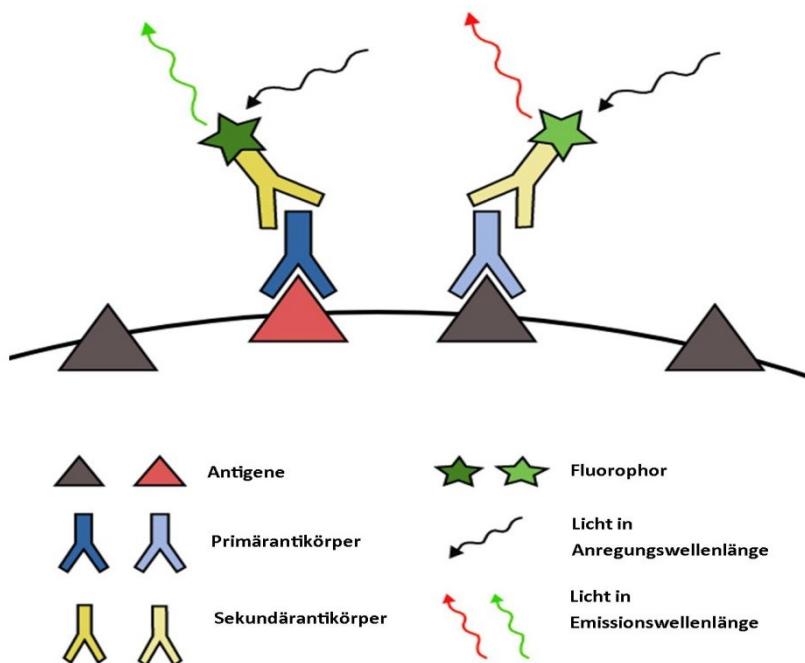


Abbildung 11: Prinzip einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

3.10.2 Durchführung von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Die Markierung aller Objektträger einer Immunfluoreszenz-Markierungsreihe wurde zur selben Zeit und nach demselben Arbeitsprotokoll durchgeführt. Dies gewährleistet einheitliche, vergleichbare Färbeergebnisse.

Bis zur Applikation des primären AK entsprechen die Schritte bei einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung denen einer immunhistochemischen Markierung (vgl. Tabelle 11, Schritt 1-6). Statt dem Blockserum (1) wurde zum „Blocken“ das Blockserum (2) verwendet. Nach dem „Blocken“ wurden die Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in Blockserum (2) (vgl. Tabelle 12) tropfenweise aufgetragen. Dabei wurden 50µl pro Schnitt verwendet. Die Inkubation erfolgte für beide Primärantikörper simultan bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht.

Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper bei Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Antigen	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Demaskierung	Wirt
APC	Millipore	OP80-100UG	1:200	Tris/EDTA	Maus
OLIG-2	Millipore	MABN50	1:100	Tris/EDTA	Maus
CPI-17	Abcam	ab32213	1:3000	Tris/EDTA	Kaninchen

Am nächsten Tag wurden die sekundären AK in Blockserum (2) verdünnt (vgl. Tabelle 13) und es wurden jeweils 50µl pro Schnitt tropfenweise aufgetragen. Die sekundären AK inkubierten simultan für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper bei Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Antikörper	Kopplung	Wirt	Firma	Bestellnummer	Verdünnung
Esel-Anti-Maus	AlexaFluor 594	Esel	Invitrogen	A21203	1:250
Esel-Anti-Kaninchen	AlexaFluor 488	Esel	Abcam	ab150065	1:250

Alle weiteren Schritte wurden unter möglichst geringem Lichteinfall durchgeführt, um ein „Ausbleichen“ des Fluorophors zu verhindern.

Für die Kernmarkierung wurde eine DAPI-Arbeitslösung (5µg/ml) aufgetropft (50µl pro Schnitt). Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten.

Nach dreimaliger Waschung in mit PBS (1x) gefüllten Küvetten und Überführung der Schnitte in destilliertes Wasser wurden sie mit Immu-Mount™ eingedeckt. Danach wurden die Schnitte dauerhaft bei 4°C und im Dunkeln gelagert.

Tabelle 14: Arbeitsprotokoll einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

Schritt	Ablauf
1	Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (vgl. Tabelle 7)
2	Demaskierung („HIER“): zehnminütiges Kochen der Schnitte in Tris/EDTA-Puffer
3	Abkühlung der Objektträger auf Raumtemperatur in einem kalten Wasserbad
4	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
5	„Blocken“ mit 5% Normalserum für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
6	Normalserum abkippen
7	Applikation der Primärantikörper und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
8	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
9	Applikation der Sekundärantikörper und Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
10	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
11	Applikation der DAPI Lösung (5µg/ml) und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
12	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
13	1 Minute Spülen in destilliertem Wasser
14	Eindecken der Schnitte mit Immu-Mount™
15	Lagerung bei 4°C in dunkler Umgebung

= Arbeitsschritte unter minimalem Lichteinfall

3.11 Auswertung

3.11.1 Untersuchte Hirnareale

3.11.1.1 Immunfluoreszenz

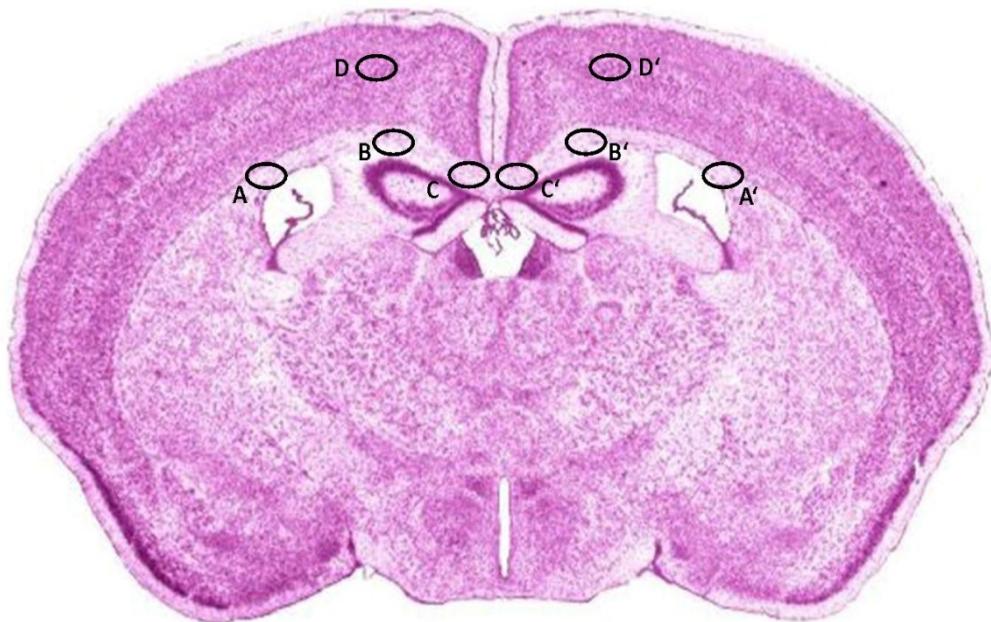


Abbildung 12: Darstellung der in der Immunfluoreszenz untersuchten ROIs auf Höhe des rostralen Hippocampus, R265

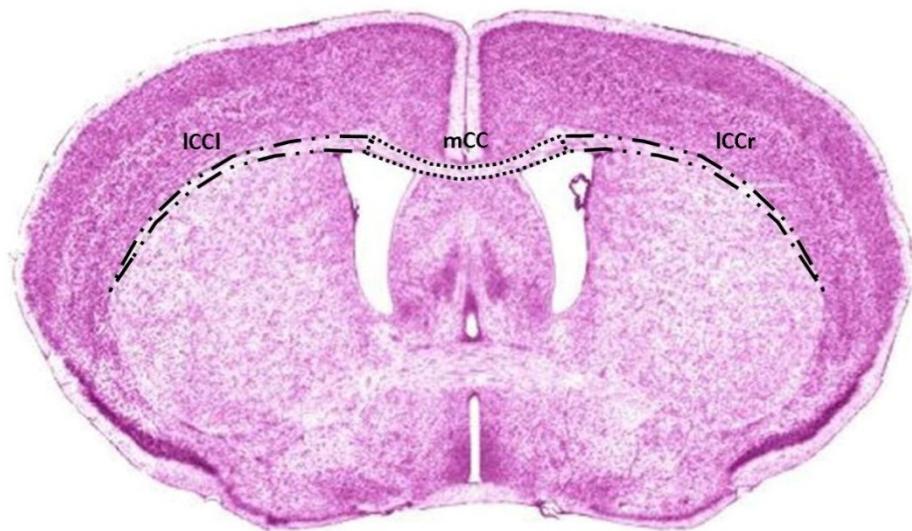
A und A': ICC= laterales Corpus callosum, B und B': CCC= Corpus callosum unter dem Cingulum, C und C': mCC= mediales Corpus callosum, D und D': MCx= motorischer Cortex. Quelle des Hirnschnittes: modifiziert nach Sidman et al., 1971

Bei den Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen wurden Hirnschnitte der Hirnregion 265 untersucht, die sich auf Höhe des rostralen Endes des Hippocampus befindet. Um möglichst unterschiedliche Anteile des Corpus callosum und des motorischen Cortex untersuchen zu können, wurden verschiedene „regions of interest“ (ROIs) definiert, welche in Abbildung 12 dargestellt sind.

3.11.1.2 Immunhistochemie

Bei den immunhistochemischen Markierungen wurden Hirnschnitte der Hirnregionen 215 und 265 untersucht (vgl. Abbildung 8). Um unterschiedliche Anteile des Corpus callosum beurteilen zu können, wurden erneut verschiedene ROIs definiert. Es wurden sowohl das mediale als auch das laterale Corpus callosum untersucht (vgl. Abbildung 13). Als Abgrenzung zwischen dem medialen und dem lateralen Corpus callosum wurde ein Lot von der höchsten Stelle des Cingulums auf das Corpus callosum gefällt.

A



B

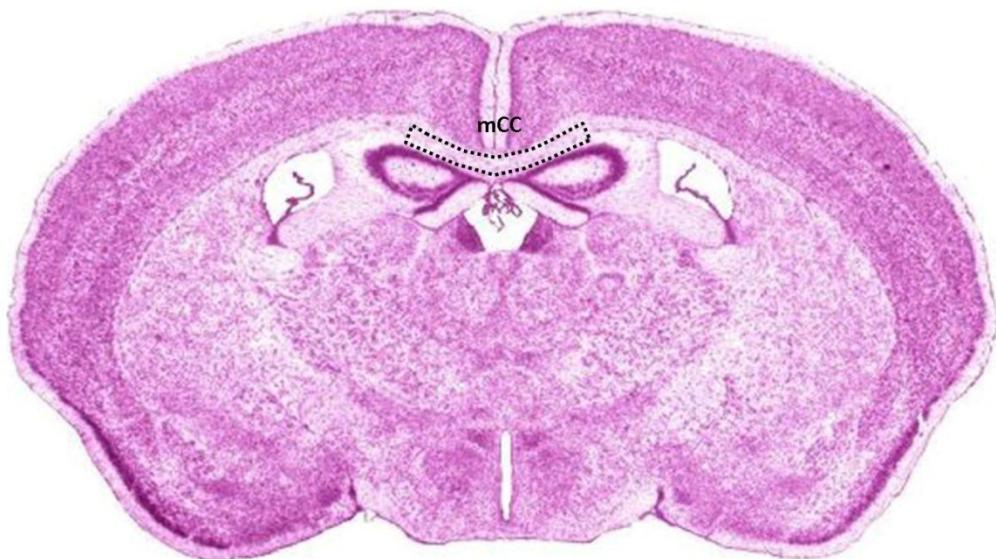


Abbildung 13: Darstellung der in der Immunhistochemie untersuchten ROIs auf Höhe des Zusammenschlusses der Commissura anterior und des rostralen Hippocampus, R215 und R265.
(A) Übersicht der untersuchten ROIs auf Höhe des Zusammenschlusses der Commissura anterior (R215).
(B) Übersicht der untersuchten ROI auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265). (Abkürzungen: ICCI/ICCr= laterales Corpus callosum links/rechts, mCC= mediales Corpus callosum). Quelle der Hirnschnitte: modifiziert nach Sidman et al., 1971

3.11.2 Auswertung der LFB/PAS-Färbung

In einer LFB/PAS-Färbung stellt sich die weiße Substanz kräftig blau dar. Demyelinisierte Anteile des Corpus callosum sind daher nicht mehr blau angefärbt, sondern erscheinen wie die graue Substanz rosa/rot. Die Beurteilung des Ausmaßes der Demyelinisierung erfolgte an einem Mikroskop (Eclipse E200, Nikon, Minato, Japan) in R215 und R265. Jedem Schnitt wurde nach mikroskopischer Betrachtung anhand der sichtbaren, blau-angefärbten Menge an weißer Substanz ein Prozentwert zugeordnet. Dieser Wert gibt an, wie viel Prozent der ursprünglichen Myelinmenge nach subjektiver Einschätzung noch vorhanden sind. Die Einschätzung erfolgte verblindet. In R265 wurde die Zuordnung des Prozentwertes zusätzlich verblindet durch den Arbeitsgruppenleiter (Kipp M., Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock) durchgeführt.

3.11.3 Quantifizierung der optischen Dichte

Zunächst wurden von allen Hirnschnitten mit einem am Mikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) installierten Kamerasystem (DMC 6200, Leica, Wetzlar, Deutschland) Bilder der vorher festgelegten ROIs (vgl. Abbildung 13) in R215 und R265 aufgenommen. Dazu wurden an einem Hirnschnitt die Einstellungen optimiert und dann bei allen weiteren Hirnschnitten so beibehalten, um eine Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten.

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte anschließend mithilfe der Software „ImageJ“ (Version 1.52n für Windows, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

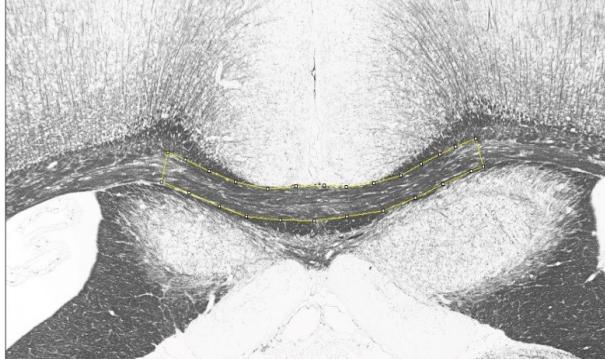
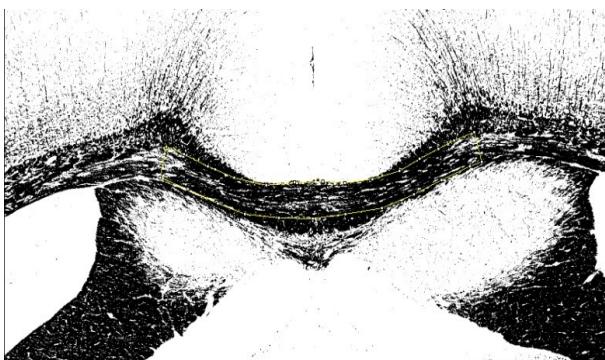
In einem ersten Schritt wurden die Bilder in die Softwareumgebung „ImageJ“ importiert und die exakte ROI mithilfe der „polygonalen Auswahl“ umrandet. Anschließend wurde der Bildtyp in „8-bit-greyscale“ (8-Bit-Graustufen) geändert, wodurch die farbigen Bilder in ein Grau-Format umgewandelt wurden.

Zur Vereinheitlichung der Analyse aller Bilder wurde ein Grenzwert für die densitometrische Messung festgelegt, der sogenannte „Threshold“. Abhängig von diesem Threshold wird ein Pixel des Bildes von „ImageJ“ während der optischen Dichtemessung als „schwarz“ oder „weiß“ definiert. Die Auswertung der anti-PLP-Markierung erfolgte mit dem Threshold „MaxEntropy“, die Auswertung der anti-Ionized calcium binding adapter molecule 1 (IBA-1)-Markierung mit dem Threshold „Default“.

In einem letzten Schritt erfolgte die Umwandlung der Bilder in ein Schwarz-Weiß-Format (binäres Format) und die automatische Bestimmung der relativen Dichte („Area fraction“).

Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 15 noch einmal dargestellt.

Tabelle 15: Arbeitsschritte einer Dichtemessung mittels ImageJ

ImageJ-Funktion	Abbildung	Beschreibung
„polygonale Auswahl“		Die zu untersuchende Region wurde bei jedem Schnitt manuell markiert (gelbe Umrandung).
„Image“ „Type“ „8-bit“		Das Bild wird in ein Grau-Format umgewandelt.
„Image“ „Adjust“ „Threshold“		Nach Umwandlung des Bildes in ein binäres Format anhand des ausgewählten Thresholds wurde die relative Dichte schwarzer Pixel in der ROI gemessen. Die Angabe erfolgte in % der ROI.

3.11.4 Quantifizierung von Zell- und Partikeldichten

3.11.4.1 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Zur Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen wurden am Epifluoreszenzmikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) von jedem Hirnschnitt in allen Kanälen (blau: DAPI, rot: OLIG-2 oder APC, grün: CPI-17) Aufnahmen der vorher festgelegten ROIs in R265 (vgl. Abbildung 12) angefertigt und gespeichert. Dazu wurden zunächst an einem Hirnschnitt die Einstellungen in allen Kanälen optimiert und dann bei allen weiteren Hirnschnitten beibehalten. Alle Bilder von Hirnschnitten einer Markierung wurden am selben Tag aufgenommen. Dadurch wird ein „Ausbleichen“ des Fluoreszenzfarbstoffes verhindert und die Vergleichbarkeit der Bilder gewährleistet.

Die entstandenen Bilder wurden dann manuell mithilfe der Software „ViewPoint Light“ (Version: 1.0.0.9628) von PreciPoint (Freising, Deutschland) quantifiziert. Es erfolgte eine Verblindung der Bilder gegenüber dem auswertenden Experimentator und eine Markierung der exakten ROI. Dann wurden innerhalb der ROI die Anzahl der OLIG-2⁺CPI-17⁺-Zellen sowie die Anzahl der OLIG-2⁺CPI-17⁻-Zellen und die Anzahl der CPI-17⁺OLIG-2⁻-Zellen gezählt. Eine Zelle wurde dann als OLIG-2⁺CPI-17⁺ gewertet, wenn sie im roten Kanal ein Signal zeigte und gleichzeitig im grünen Kanal ein kolokalisiertes (doppelpositives) Signal aufwies. Als letztes wurde ein Quotient aus der Zellzahl und der Fläche der ROI gebildet, um eine Zellzahl pro mm² zu erhalten. Nach demselben Prinzip erfolgte auch die Quantifizierung der APC/CPI-17-Doppelmarkierung.

Pro Objektträger wurden zwei Hirnschnitte desselben Tieres ausgewertet. Aus den jeweiligen Zelldichten jedes Hirnschnittes wurde ein Mittelwert_{Tier} errechnet. Aus allen Mittelwerten_{Tier} einer Gruppe wurde dann ein Mittelwert_{Gruppe} gebildet und mit anderen Mittelwerten_{Gruppe} verglichen.

3.11.4.2 Immunhistochemie

Durch axonalen Schaden und einen daraus resultierenden gestörten axonalen Transport kann es zur Akkumulation des Amyloid Precursor Proteins (APP) kommen (T. Kuhlmann, 2002). Diese Akkumulation ist in Form von APP-Sphäroiden in APP-markierten Hirnschnitten sichtbar (vgl. Abbildung 14).

Zur Auswertung der immunhistochemischen APP-Markierung wurden mithilfe eines an Mikroskop (Eclipse E200, Nikon, Minato, Japan) gekoppelten Kamerasytems (acA1920-40uc, Basler, Ahrensburg, Deutschland) und der Software „Manual WSI 2019“ (Version 2019b) von Microvisioneer (Esslingen am Neckar, Deutschland) von jedem Hirnschnitt Bilder der vorher festgelegten ROI (vgl. Abbildung 13) in R215 und R265 aufgenommen. Bei dieser Markierung wurde in beiden Regionen nur das mediale Corpus callosum (mCC) untersucht. Die Bilder wurden angefertigt, indem die ROI jedes Hirnschnittes mit dem Mikroskop eingescannt wurde.

Anschließend wurde mithilfe der Software am Computer ein zusammenhängendes Bild erstellt. Dabei wurden alle Bilder mit denselben Einstellungen generiert, um eine Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten.

Die Quantifizierung der so entstandenen Aufnahmen wurde ebenfalls mit der Software „ViewPoint Light“ (Version: 1.0.0.9628) von PreciPoint (Freising, Deutschland) durchgeführt. Dazu erfolgten zunächst eine Verblindung der Bilder gegenüber dem auswertenden Experimentator und eine exakte Umrandung der ROI. Anschließend wurden innerhalb der ROI die APP-Sphäroide (Zielstrukturen) manuell mithilfe eines Markierungs-Werkzeuges gezählt. Als letztes wurde ein Quotient aus der Zahl der APP-Sphäroide und der Fläche der ROI gebildet, um eine Sphäroid-Dichte pro mm^2 zu erhalten.



Abbildung 14: Quantifizierung von APP-Sphäroiden

Dargestellt ist ein Ausschnitt des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265). Die Pfeile markieren einige ausgewählte APP-Sphäroide. Quelle der Hirnübersicht: Sidman et al., 1971

Pro Objektträger wurden auf diese Weise zwei Hirnschnitte desselben Tieres ausgewertet. Analog zu den Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen wurden auch bei dieser immunhistochemischen Markierung Mittelwerte_{Tier} und Mittelwerte_{Gruppe} gebildet. Die Mittelwerte_{Gruppe} wurden dann untereinander verglichen.

3.11.5 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Sowohl die graphische Darstellung als auch die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mithilfe der Software „GraphPad Prism“ (Version 8.0.2, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Aufgrund der zu geringen Gruppengröße wurden keine Tests auf Normalverteilung durchgeführt. Stattdessen wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mit nicht-parametrischen Tests auf Signifikanz geprüft. Bei den Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen erfolgte dies mithilfe des Mann-Whitney-Tests, bei den immunhistochemischen Markierungen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests in Kombination mit einem Dunn's Post-Hoc-Test. Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als Sterne gekennzeichnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

4. Ergebnisse

4.1 Expression von CPI-17 in Oligodendrozyten

4.1.1 Expression von CPI-17 in allen Oligodendrozyten-Reifestufen

Hintergrund: Wie in Kapitel 2 beschrieben, ist nicht vollständig geklärt, ab wann im Verlauf des Reifeprozesses der Oligodendrozyten die Expression von CPI-17 erfolgt. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass CPI-17 von spätreifen Oligodendrozyten exprimiert wird.

OLIG-2 ist ein typischerweise nuklear lokalisierter (Doucette et al., 2010), etablierter Marker für alle Reifestufen von Oligodendrozyten. Folglich exprimieren auch Progenitorzellen und unreife Oligodendrozyten OLIG-2. Frühreife Oligodendrozyten sollten, entsprechend meiner Hypothese, kein CPI-17 exprimieren (vgl. Abbildung 15).



Abbildung 15: Schematische Darstellung des Expressionszeitraumes von OLIG-2 und CPI-17 während des Reifeprozesses von Oligodendrozyten entsprechend der Arbeitshypothese

Die Hirnschnitte von 5 Wochen mit Cuprizone behandelten Tieren zeichnen sich durch eine hohe Zahl an OPZ und eine sehr geringe Zahl an reifen Oligodendrozyten aus. Das Expressionsmuster von OLIG-2 und CPI-17 wurde in gesunden Tieren sowie nach Cuprizone-Intoxikation untersucht.

Arbeitshypothese: Die übergeordnete Arbeitshypothese lautet: CPI-17 ist ein Marker für spätreife Oligodendrozyten. Wenn diese Hypothese zutrifft, dann:

- sollte unter Kontrollbedingungen ein großer Anteil der OLIG-2⁺-Zellen auch CPI-17 exprimieren
- sollte sich die Zahl der CPI-17⁺-Zellen nach Cuprizone-Intoxikation vermindern
- sollten nach Cuprizone-Intoxikation vermehrt OLIG-2⁺-Zellen zu finden sein, die kein CPI-17 exprimieren

Methoden: Das Corpus callosum und der motorische Cortex von Kontrolltieren und 5 Wochen mit Cuprizone behandelten Mäusen wurden in definierten ROIs untersucht (vgl. Abbildung 12).

Ergebnisse

Ergebnisse: Das Markierungsmuster der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung entsprach den Erwartungen. OLIG-2, dargestellt im roten Kanal, ist in allen Reifestufen von Oligodendrozyten nuklear exprimiert und erzeugte dementsprechend ein nuklear lokalisiertes Fluoreszenzsignal.

Das Protein CPI-17 kann nuklear oder zytoplasmatisch lokalisiert sein. Daher ergab die Markierung von CPI-17 im grünen Kanal ein variables Markierungsmuster mit teils zytoplasmatisch und teils nuklear lokalisierten Fluoreszenzsignalen (vgl. Abbildung 17).

Veränderungen der absoluten Zellzahlen:

Nach Cuprizone-Intoxikation nahm die Anzahl der CPI-17⁺-Zellen im Vergleich zu Kontrollbedingungen ab. Im lateralen Anteil des Corpus callosum (ICC) reduzierte sich die Anzahl von $423,27 \pm 97,17$ auf $205,06 \pm 30,38$ Zellen/mm². Im Corpus callosum unter dem Cingulum (CCC) reduzierte sie sich von $539,08 \pm 123,50$ auf $86,41 \pm 31,61$ Zellen/mm². Im medialen Anteil des Corpus callosum (mCC) reduzierte sich die Anzahl von $558,05 \pm 131,40$ auf $13,46 \pm 5,76$ Zellen/mm² und im motorischen Cortex (MCx) von $93,25 \pm 24,93$ auf $9,27 \pm 5,88$ Zellen/mm² (vgl. Abbildung 16 A). Die Anzahl der OLIG-2⁺-Zellen nahm nach Cuprizone-Intoxikation im Vergleich zu Kontrollbedingungen ebenfalls ab. Im lateralen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich die Anzahl der OLIG-2⁺-Zellen von $516,61 \pm 87,61$ auf $448,42 \pm 114,80$ Zellen/mm². Im Corpus callosum unter dem Cingulum reduzierte sie sich von $638,32 \pm 150,20$ auf $363,13 \pm 54,24$ Zellen/mm². Im medialen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich die Anzahl von $670,70 \pm 112,80$ auf $512,85 \pm 149,80$ Zellen/mm² und im motorischen Cortex von $125,40 \pm 25,24$ auf $54,74 \pm 21,42$ Zellen/mm² (vgl. Abbildung 16 B).

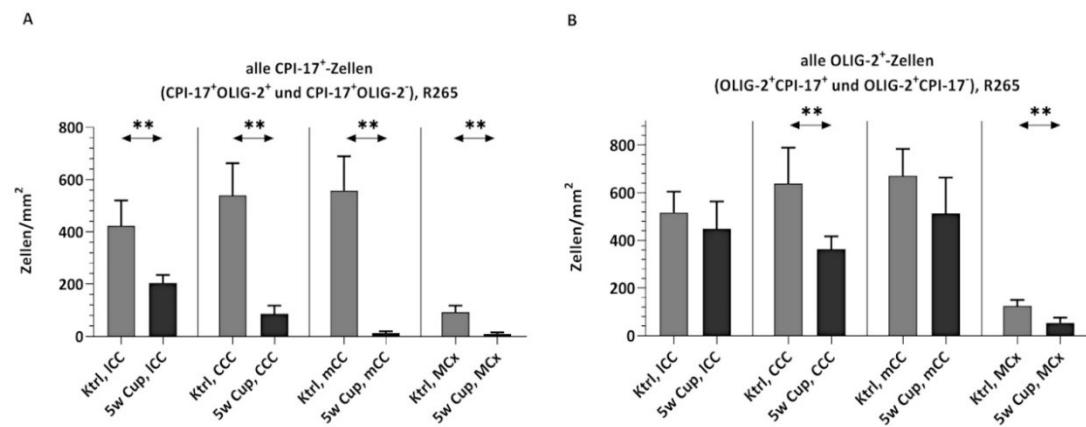


Abbildung 16: Absolute Zahlen von CPI-17⁺- und OLIG-2⁺-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation in verschiedenen Regionen des Corpus callosum und des motorischen Cortex auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265)

(A) Darstellung der Anzahl von CPI-17⁺OLIG-2⁺- und CPI-17⁺OLIG-2⁻-Zellen auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265). (B) Darstellung der Anzahl von OLIG-2⁺CPI-17⁺- und OLIG-2⁺CPI-17⁻-Zellen auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265). (Abkürzungen: ICC= laterales Corpus callosum, CCC= Corpus callosum unter dem Cingulum, mCC= mediales Corpus callosum, MCx= motorischer Cortex)

Ergebnisse

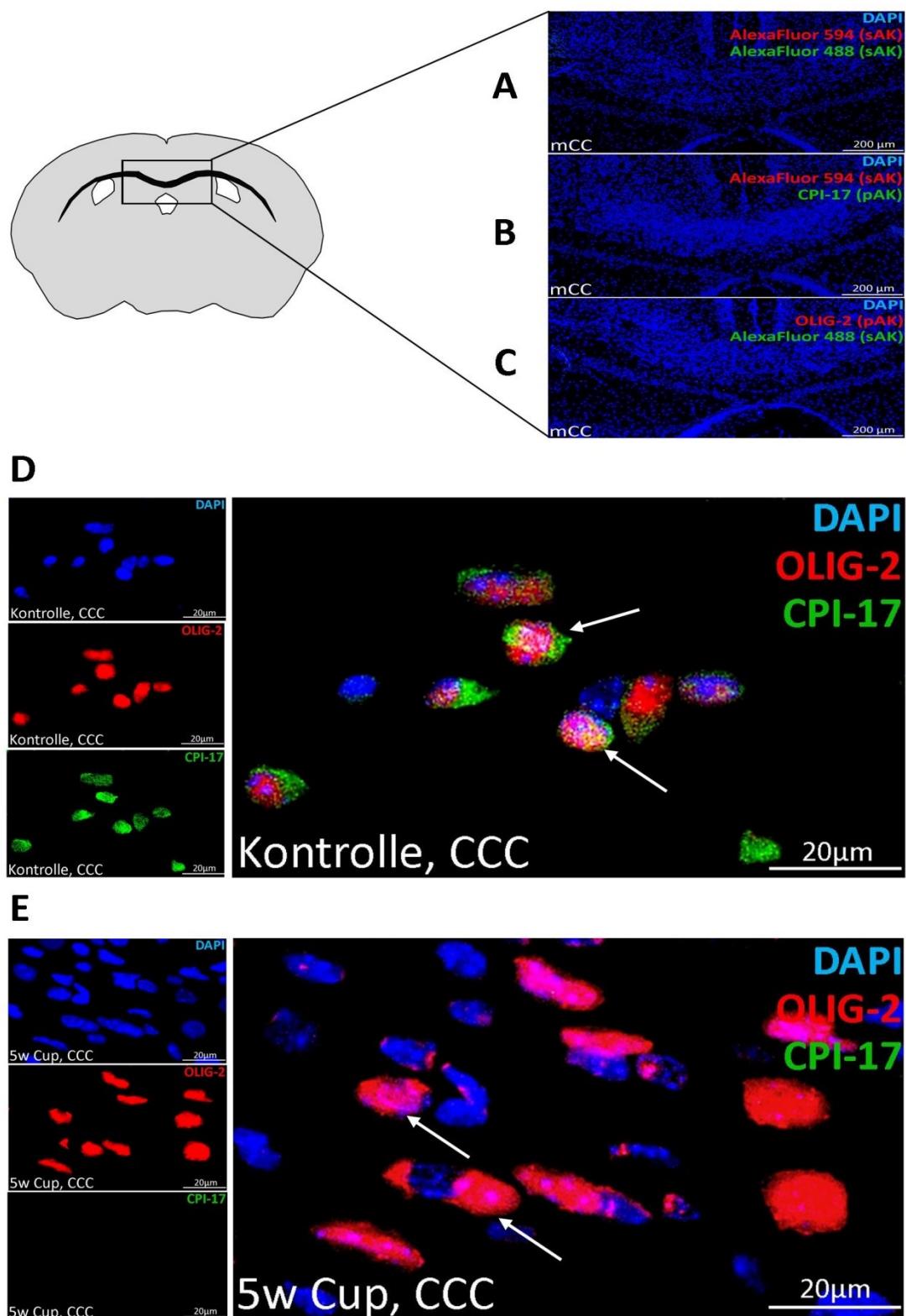


Abbildung 17: Fluoreszenzaufnahmen einer DAPI/OLIG-2/CPI-17-Markierung unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation im Corpus callosum unter dem Cingulum auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265)

(A) zeigt die Negativkontrolle ohne Primärantikörper. (B) und (C) zeigen die Kreuzkontrollen jeweils eines Primärantikörpers mit dem nicht zugehörigen Sekundärantikörper. (D) zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der DAPI/OLIG-2/CPI-17-Markierung unter Kontrollbedingungen im Corpus callosum unterhalb des Cingulum (CCC). Die Pfeile markieren ausgewählte OLIG-2⁺CPI-17⁺-Zellen. (E) zeigt die gleiche Region mit gleicher Markierung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. Die Pfeile markieren ausgewählte OLIG-2⁺CPI-17⁺-Zellen.

Ergebnisse

Veränderung des prozentualen Anteils OLIG-2⁺CPI-17⁺-Zellen:

Unter Kontrollbedingungen exprimierten im lateralen Anteil des Corpus callosum $73,65 \pm 9,24\%$ aller OLIG-2⁺-Zellen auch CPI-17. Im Corpus callosum unter dem Cingulum exprimierten $81,06 \pm 4,19\%$ aller OLIG-2⁺-Zellen auch CPI-17. Im medialen Anteil des Corpus callosum exprimierten $79,69 \pm 7,62\%$ aller OLIG-2⁺-Zellen auch CPI-17 und im motorischen Cortex waren es $71,03 \pm 8,51\%$ aller OLIG-2⁺-Zellen. Nach Cuprizone-Intoxikation verminderte sich der Prozentsatz der OLIG-2⁺-Zellen, die auch CPI-17 exprimieren. Im lateralen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich der Prozentsatz auf $43,49 \pm 12,40\%$. Im Corpus callosum unter dem Cingulum reduzierte er sich auf $20,27 \pm 8,67\%$. Im medialen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich der Prozentsatz auf $2,34 \pm 0,81\%$ und im motorischen Cortex exprimierten nur noch $8,09 \pm 4,88\%$ der OLIG-2⁺-Zellen auch CPI-17 (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18).

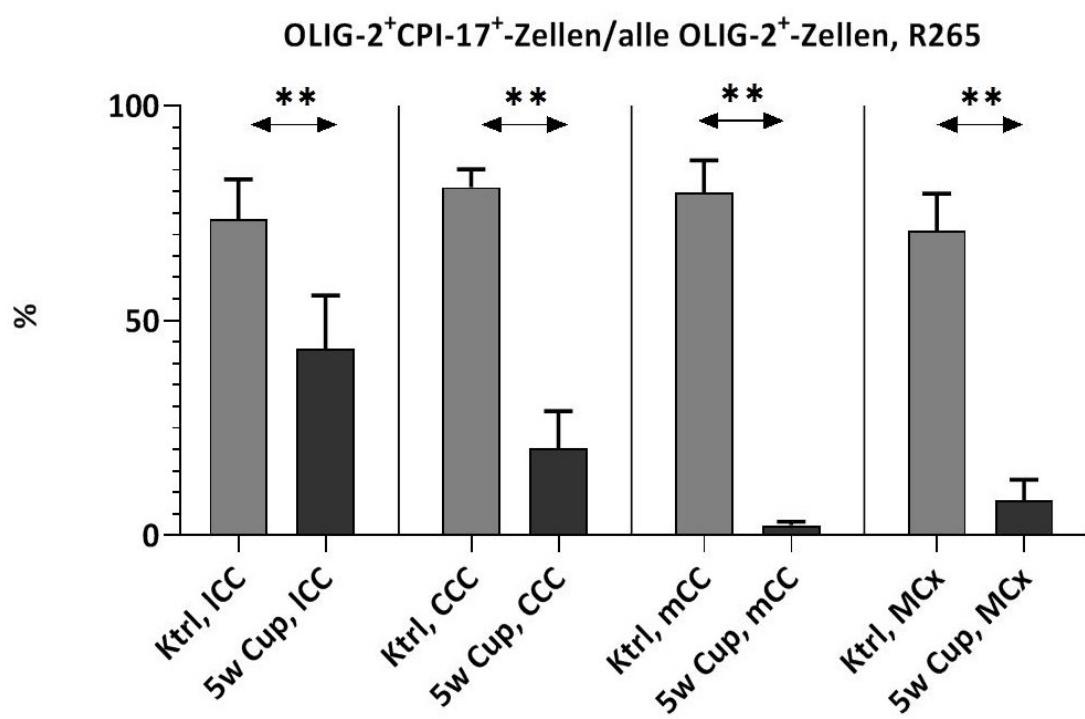


Abbildung 18: Anteil der OLIG-2⁺-Zellen, die auch CPI-17 exprimieren unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation

Quantifizierung in verschiedenen Regionen des Corpus callosum und des motorischen Cortex. (Abkürzungen: ICC= laterales Corpus callosum, CCC= Corpus callosum unter dem Cingulum, mCC= mediales Corpus callosum, MCx= motorischer Cortex)

4.1.2 Expression von CPI-17 in reifen Oligodendrozyten

Hintergrund: Die Ergebnisse der CPI-17/OLIG-2-Doppelmarkierung lassen vermuten, dass CPI-17 in OLIG-2⁺-Progenitorzellen und unausgereiften OLIG-2⁺-Oligodendrozyten nicht exprimiert wird. Die Expression von CPI-17 scheint somit selektiv für reife bzw., gemäß meiner Hypothese, spätreife Oligodendrozyten zu sein. APC ist ein vorwiegend zytoplasmatisch exprimierter (Midgley et al., 1997), etablierter Marker für reife Oligodendrozyten. Ob CPI-17 während der Reifung der Oligodendrozyten zum gleichen Zeitpunkt wie APC exprimiert wird, ist nicht bekannt. Ich vermute, dass im Rahmen der Oligodendrozyten-Differenzierung zuerst APC und später CPI-17 exprimiert wird (vgl. Abbildung 19).



Abbildung 19: Schematische Darstellung des Expressionszeitraumes von APC und CPI-17 im Verlauf des Reifeprozesses von Oligodendrozyten entsprechend der Arbeitshypothese

Arbeitshypothese: Erneut lautet die übergeordnete Arbeitshypothese: CPI-17 ist ein Marker für spätreife Oligodendrozyten. Wenn diese Hypothese zutrifft, dann:

- sollte unter Kontrollbedingungen der weitaus größte Teil der APC⁺-Zellen auch CPI-17 exprimieren
- sollte sich die Zahl der CPI-17⁺-Zellen nach Cuprizone-Intoxikation vermindern
- sollten nach Cuprizone-Intoxikation vermehrt APC⁺-Zellen zu finden sein, die kein CPI-17 exprimieren

Methoden: Um die Arbeitshypothese zu überprüfen, wurde eine CPI-17/APC-Doppelmarkierung an Hirnschnitten von unbehandelten Kontrolltieren durchgeführt. Zur Untersuchung des Expressionsmusters von APC und CPI-17 in jüngeren Oligodendrozyten wurden auch Hirnschnitte von 5 Wochen mit Cuprizone behandelten Tieren untersucht

Ergebnisse

Ergebnisse: Das Markierungsmuster der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung entsprach den Erwartungen. APC, dargestellt im roten Kanal, ist in Oligodendrozyten vorwiegend zytoplasmatisch exprimiert und erzeugte dementsprechend ein zytoplasmatisch lokalisiertes Fluoreszenzsignal.

Die Markierung von CPI-17 ergab erneut ein variables Markierungsmuster mit teils zytoplasmatisch und teils nuklear lokalisierten Fluoreszenzsignalen. Dieses Muster spiegelt die unterschiedlichen möglichen zellulären Lokalisationen von CPI-17 wider (vgl. Abbildung 21).

Veränderung der absoluten Zellzahlen:

Nach Cuprizone-Intoxikation nahm die Anzahl der CPI-17⁺-Zellen im Vergleich zu Kontrollbedingungen ab. Im lateralen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich die Anzahl von $526,16 \pm 72,83$ auf $195,70 \pm 60,95$ Zellen/mm². Im Corpus callosum unter dem Cingulum reduzierte sie sich von $569,31 \pm 95,36$ auf $81,29 \pm 36,35$ Zellen/mm². Im medialen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich die Anzahl von $639,53 \pm 101,70$ auf $29,23 \pm 17,01$ Zellen/mm² und im motorischen Cortex von $103,08 \pm 18,38$ auf $14,19 \pm 4,03$ Zellen/mm² (vgl. Abbildung 20 A). Die Anzahl der APC⁺-Zellen nahm nach Cuprizone-Intoxikation im Vergleich zu Kontrollbedingungen ebenfalls ab. Im lateralen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich die Anzahl von $551,65 \pm 78,30$ auf $215,49 \pm 54,48$ Zellen/mm². Im Corpus callosum unter dem Cingulum reduzierte sie sich von $588,64 \pm 101,90$ auf $235,41 \pm 29,38$ Zellen/mm². Im medialen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich die Anzahl von $673,89 \pm 111,00$ auf $262,42 \pm 62,61$ Zellen/mm² und im motorischen Cortex von $109,47 \pm 21,67$ auf $27,51 \pm 10,51$ Zellen/mm² (vgl. Abbildung 20 B).

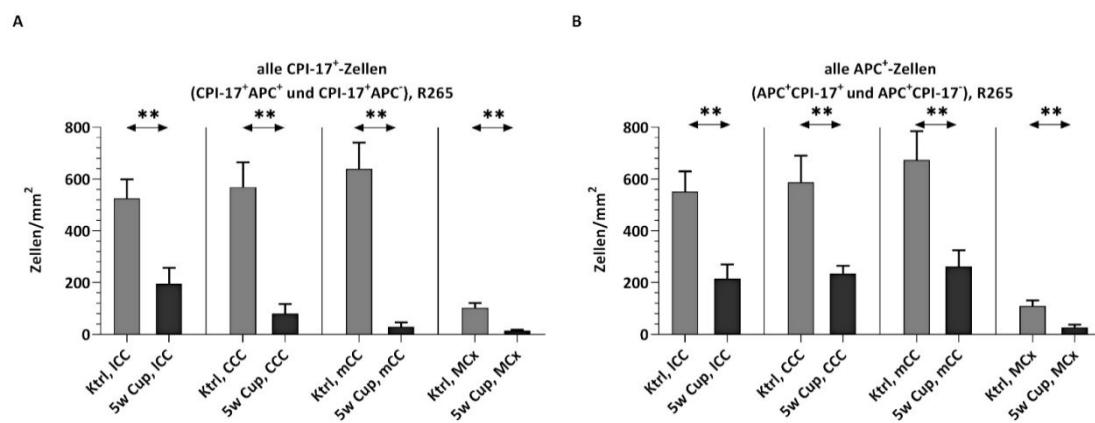


Abbildung 20: Absolute Zahlen von CPI-17⁺- und APC⁺-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation in verschiedenen Regionen des Corpus callosum und des motorischen Cortex auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265)

(A) Darstellung der Anzahl von CPI-17⁺APC⁺- und CPI-17⁺APC⁻-Zellen auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265). (B) Darstellung der Anzahl von APC⁺CPI-17⁺- und APC⁺CPI-17⁻-Zellen auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265). (Abkürzungen: ICC= laterales Corpus callosum, CCC= Corpus callosum unter dem Cingulum, mCC= mediales Corpus callosum, MCx= motorischer Cortex)

Ergebnisse

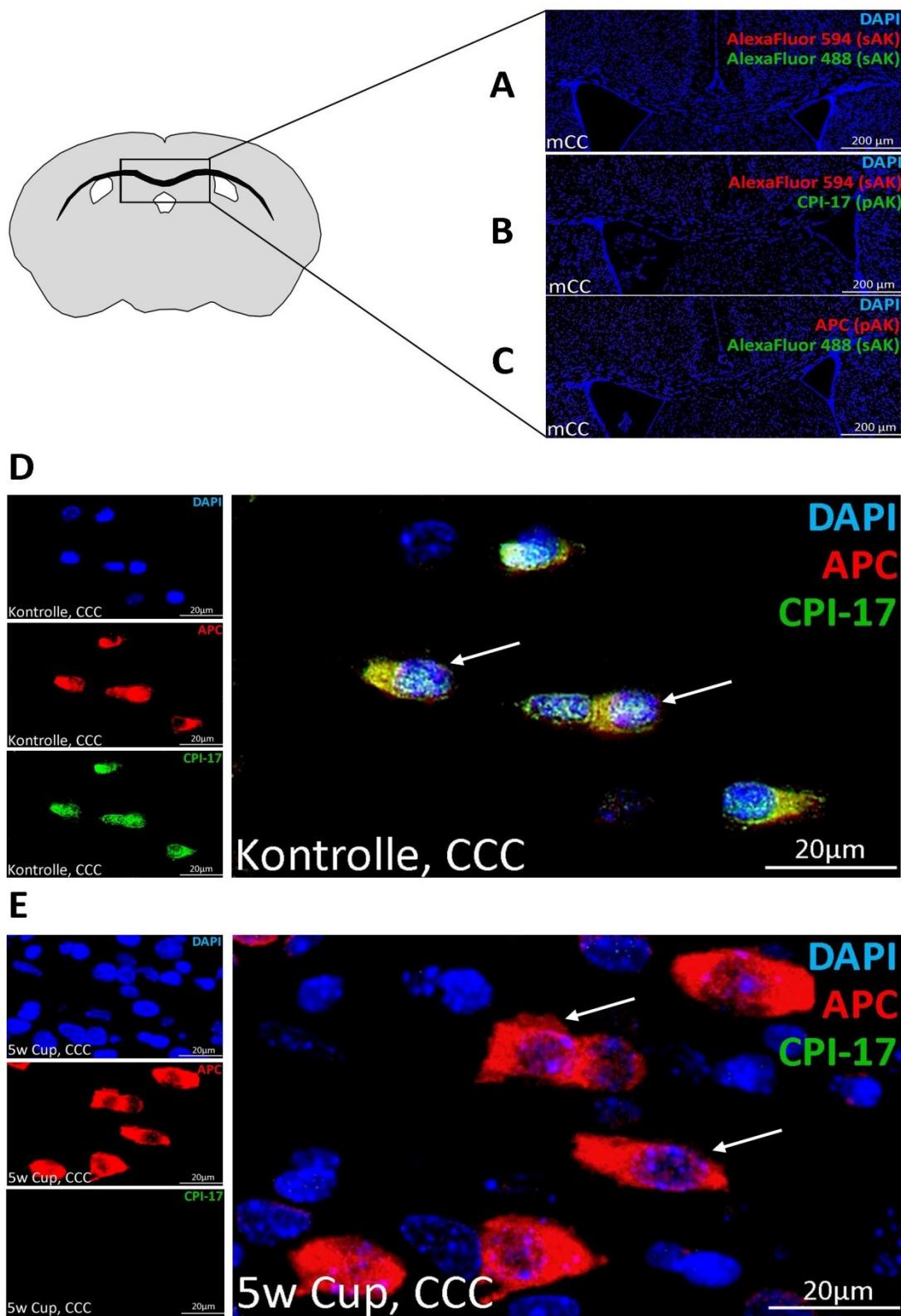


Abbildung 21: Fluoreszenzaufnahmen einer DAPI/APC/CPI-17-Markierung unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation im Corpus callosum unter dem Cingulum auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265)

(A) zeigt die Negativkontrolle ohne Primärantikörper. (B) und (C) zeigen die Kreuzkontrollen jeweils eines Primärantikörpers mit dem nicht zugehörigen Sekundärantikörper. (D) zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der DAPI/APC/CPI-17-Markierung unter Kontrollbedingungen im Corpus callosum unterhalb des Cingulum (CCC). Die Pfeile markieren ausgewählte $APC^+CPI-17^+$ -Zellen. (E) zeigt die gleiche Region mit gleicher Markierung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. Die Pfeile markieren ausgewählte $APC^+CPI-17^-$ -Zellen.

Ergebnisse

Veränderung des prozentualen Anteils $APC^+ CPI-17^+$ -Zellen:

Unter Kontrollbedingungen exprimierten im lateralen Anteil des Corpus callosum $95,19 \pm 1,71\%$ aller APC^+ -Zellen auch CPI-17. Im Corpus callosum unter dem Cingulum exprimierten $96,41 \pm 2,48\%$ aller APC^+ -Zellen auch CPI-17. Im medialen Anteil des Corpus callosum exprimierten $94,74 \pm 1,04\%$ aller APC^+ -Zellen auch CPI-17 und im motorischen Cortex waren es $94,22 \pm 3,44\%$ aller APC^+ -Zellen. Nach Cuprizone-Intoxikation verminderte sich der Prozentsatz der APC^+ -Zellen, die auch CPI-17 exprimieren. Im lateralen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich der Prozentsatz auf $85,36 \pm 8,55\%$. Im Corpus callosum unter dem Cingulum reduzierte er sich auf $34,86 \pm 12,25\%$. Im medialen Anteil des Corpus callosum reduzierte sich der Prozentsatz auf $11,65 \pm 9,11\%$ und im motorischen Cortex exprimierten nur noch $45,85 \pm 20,24\%$ der APC^+ -Zellen auch CPI-17 (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 22).

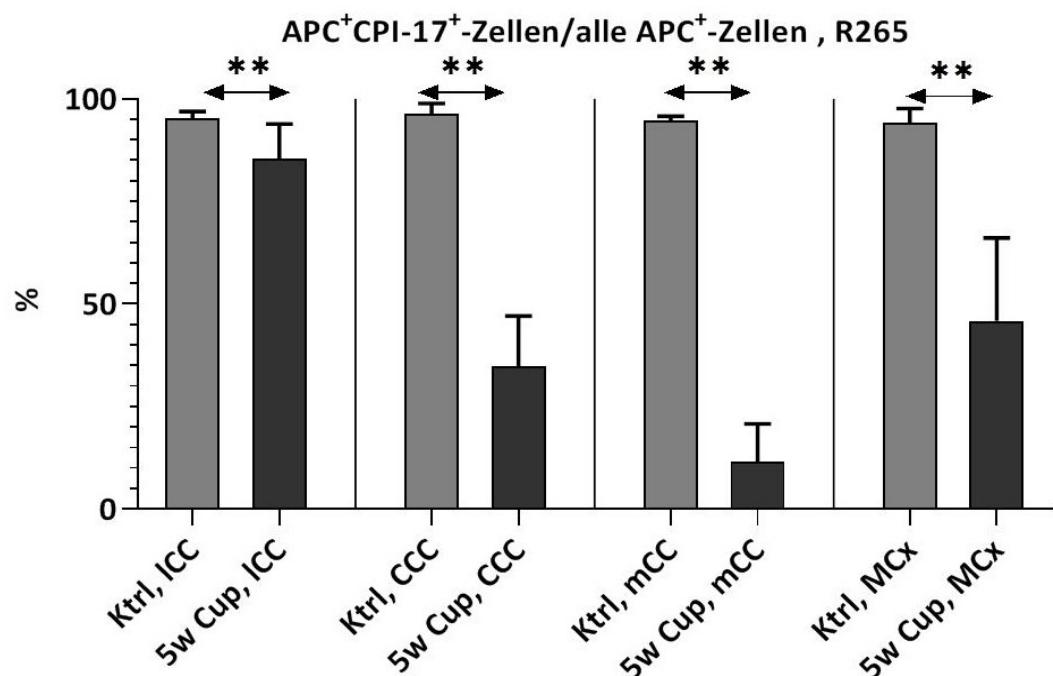


Abbildung 22: Anteil der APC^+ -Zellen, die auch CPI-17 exprimieren unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation

Quantifizierung in verschiedenen Regionen des Corpus callosum und des motorischen Cortex. (Abkürzungen: ICC= laterales Corpus callosum, CCC= Corpus callosum unter dem Cingulum, mCC= mediales Corpus callosum, MCx= motorischer Cortex)

4.2 Ausmaß Cuprizone-induzierter Schädigungen in WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen

Hintergrund: Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, scheint CPI-17 im Zuge von Remyelinisierungsvorgängen eine wichtige Rolle zu spielen. Daher nehme ich an, dass CPI-17 auch für die allgemeine Myelinstabilität von Bedeutung ist.

Arbeitshypothese: Die Arbeitshypothese lautet: CPI-17^{-/-}-Mäuse sind gegenüber einer Cuprizone-Intoxikation vulnerabler als WT-Mäuse. Wenn diese Hypothese zutrifft, dann:

- sollten CPI-17^{-/-}-Mäuse nach Cuprizone-Intoxikation eine geringere Myelindichte aufweisen als WT-Mäuse
- sollte das Ausmaß der Mikrogliaose nach Cuprizone-Intoxikation bei CPI-17^{-/-}-Mäusen höher sein als bei WT-Mäusen
- sollten CPI-17^{-/-}-Mäuse nach Cuprizone-Intoxikation mehr akuten, axonalen Schaden aufweisen als WT-Mäuse

Methoden: Es wurde das Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten Mäusen in definierten Schnittregionen untersucht (R215 und R265, vgl. Abbildung 8). Für beide Schnittregionen wurden festgelegte ROIs definiert (vgl. Abbildung 13). Es wurden der Demyelinisierungsgrad, die Mikrogliaaktivität und das Ausmaß des akuten, axonalen Schadens mithilfe immunhistochemischer Markierungen und histochemischer Färbungen untersucht.

Ergebnisse:

Lokalisation von CPI-17 im ZNS von WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen:

Vor der Untersuchung der Cuprizone-induzierten Schädigungen in den Hirnen von WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen wurde eine immunhistochemische Markierung von CPI-17 durchgeführt. Diese diente zur Lokalisation von CPI-17 im ZNS der Tiere und zur Bestätigung ihres Genotyps.

Bei WT-Mäusen zeigte sich eine homogene, bräunliche Hintergrundfärbung im Bereich des Corpus callosum und der Commissura anterior. Des Weiteren waren die Wände der Gefäße und die Oligodendrozyten im Corpus callosum kräftig dunkelbraun gefärbt.

Zusätzlich waren aber auch zahlreiche schwächere unspezifische Anfärbungen von Zellkernen und anderen Strukturen, wie z.B. dem Cingulum oder den Striosomen erkennbar. Die unspezifisch angefärbten Zellkerne waren von kleinerer bis hin zu gleicher Größe wie die der Oligodendrozyten und im gesamten Bereich des Hirnes inklusive des Cortex und des Striatums verteilt (vgl. Abbildung 23). In diesem Zusammenhang wurde eine immunhistochemische Markierung von CPI-17 mit drei unterschiedlichen Verdünnungen (1:5.000, 1:10.000 und 1:20.000) des anti-CPI-17-AK durchgeführt. Diese diente dazu, jene Verdünnung zu finden, bei der die unspezifischen Anfärbungen im Vergleich zur ursprünglichen Verdünnung (1:3.000) möglichst gering sind. In den 1:5.000- und 1:10.000-Verdünnungen zeigte sich keine Veränderung in der Intensität der unspezifischen Anfärbungen.

Ergebnisse

In der 1:20.000-Verdünnung waren die unspezifischen Anfärbungen nicht mehr zu erkennen, allerdings nahm die Intensität der spezifischen Anfärbungen in gleichem Maße ab. Dies führte dazu, dass spezifisch angefärbte Strukturen nicht sicher identifiziert werden konnten. Eine Optimierung der AK-Verdünnung war daher nicht möglich.

In CPI-17^{-/-}-Mäusen zeigten sich ausschließlich die beschriebenen, unspezifischen Anfärbungen. Dies ist besonders durch die fehlende, bräunliche Färbung im Bereich des Corpus callosum und der Commissura anterior sowie durch nur schwach bräunlich gefärbte Oligodendrozyten im Corpus callosum erkennbar. Die Gefäßwände waren bei CPI-17^{-/-}-Mäusen ungefärbt (vgl. Abbildung 23).

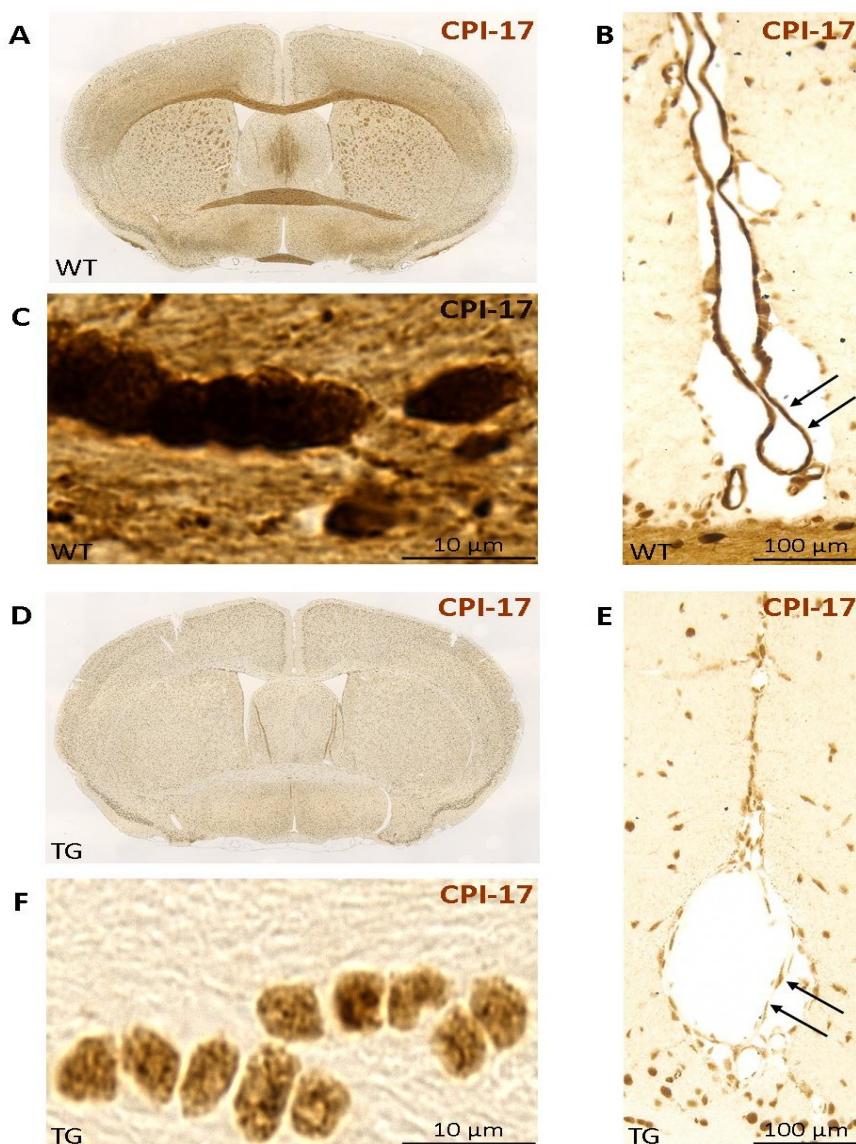


Abbildung 23: Lokalisierung von CPI-17 im ZNS von WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen anhand einer immunhistochemischen CPI-17-Markierung im Corpus callosum auf Höhe der Commissura anterior (R215)

(A) zeigt die Hirnübersicht einer WT-Maus. (B) zeigt ein Gefäß einer WT-Maus. Die Pfeile markieren die stark angefärbte Gefäßwand, in welcher CPI-17 exprimiert ist. (C) zeigt stark angefärbte Oligodendrozyten im medialen Corpus callosum einer WT-Maus. (D) zeigt die Hirnübersicht einer CPI-17^{-/-}-Maus. Deutlich erkennbar ist die geringere Anfärbung im Bereich des Corpus callosum und der Commissura anterior. (E) zeigt ein Gefäß einer CPI-17^{-/-}-Maus. Die Pfeile markieren die Gefäßwand, welche bei einem Knockout von CPI-17 nicht angefärbt ist. (F) zeigt die Oligodendrozyten im medialen Corpus callosum einer CPI-17^{-/-}-Maus.

Ergebnisse

Expression von CPI-17 durch Purkinje-Zellen:

Laut einer Studie von Eto et al. (2002) ist eine Expression von CPI-17 auch in Purkinje-Zellen der Maus nachzuweisen. Daher wurde eine eigene Untersuchung des Kleinhirns von WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen mittels einer immunhistochemischen CPI-17-Markierung vorgenommen.

In WT-Tieren zeigten die Purkinje-Zellen und die Gefäßwände eine bräunliche Färbung. In CPI-17^{-/-}-Mäusen waren die Wände der Gefäße nicht gefärbt. Die Purkinje-Zellen hingegen wiesen auch in transgenen Tieren eine bräunliche Färbung auf, welche eine ähnliche Intensität wie in WT-Tieren hatte (vgl. Abbildung 24).

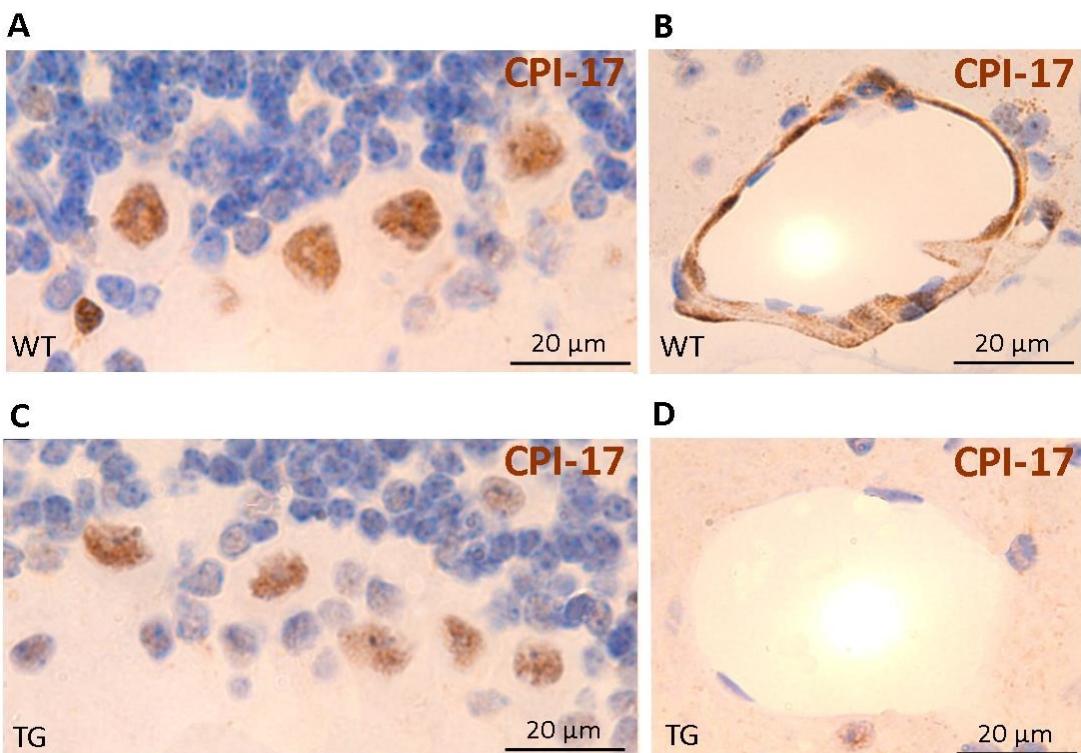


Abbildung 24: Untersuchung der Expression von CPI-17 durch Purkinje-Zellen anhand einer immunhistochemischen CPI-17-Markierung im Kleinhirn von WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen

(A) zeigt die Purkinje-Zellen eines WT-Tieres. Die braune Anfärbung ist deutlich zu erkennen. In (B) ist ein Gefäß eines WT-Tieres dargestellt. Die Wand dieses Gefäßes ist ebenfalls kräftig braun angefärbt. (C) zeigt die Purkinje-Zellen eines Tieres mit einem homozygoten Knockout für CPI-17. Trotz des Fehlens von CPI-17, welches am nicht gefärbten Gefäß des transgenen Tieres in (D) zu erkennen ist, sind die Purkinje-Zellen deutlich braun angefärbt. Dies weist darauf hin, dass diese Zellen in WT-Tieren nicht aufgrund einer Expression von CPI-17 angefärbt werden, sondern den primären AK lediglich unspezifisch an sich binden.

Demyelinisierung:

Die Demyelinisierung wurde mittels einer immunhistochemischen Markierung von PLP und einer histochemischen LFB/PAS-Färbung untersucht.

In der immunhistochemischen PLP-Markierung zeigten die Kontrolltiere in beiden untersuchten Regionen eine kräftige und homogene Anfärbung des Myelins im gesamten Corpus callosum. Bei den mit Cuprizone behandelten Tieren war in R215 in den lateralen Anteilen und vereinzelt auch in den medialen Anteilen des Corpus callosum eine beginnende Demyelinisierung erkennbar (vgl. Abbildung 25 A).

Ergebnisse

In R265 hingegen zeigten die Cuprizone-behandelten Tiere eine teils deutlich ausgeprägte Demyelinisierung des medialen Corpus callosum (vgl. Abbildung 25 **D**).

In der densitometrischen Auswertung wurde die optische Dichte der immunhistochemischen PLP-Markierung quantifiziert. Diese ist abhängig von der vorhandenen Menge an Myelin. Eine Verringerung der Myelinmenge durch eine Cuprizone-induzierte Demyelinisierung führt dementsprechend zu einer verminderten Signalintensität der immunhistochemischen PLP-Markierung und damit zu einer geringeren optischen Dichte. Als Resultat der Auswertung ergab sich sowohl für R215 als auch für R265 eine Abnahme der optischen Dichte in Cuprizone-behandelten Tieren verglichen mit den Kontrolltieren. Diese Abnahme war im lateralen sowie im medialen Corpus callosum nachweisbar und bei CPI-17^{-/-}-Mäusen ausgeprägter als bei WT-Mäusen (vgl. Abbildung 25 **B, C und E**). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung der optischen Dichte sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen PLP-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)

Versuchsgruppe	optische Dichte in %		
	R215		R265
	mediales CC	laterales CC	mediales CC
Kontrolle	92,59 \pm 1,28	89,80 \pm 1,90	86,17 \pm 2,47
3w Cup, WT	85,49 \pm 3,21	86,21 \pm 3,45	70,08 \pm 3,68
3w Cup, TG	76,86 \pm 9,02	83,73 \pm 2,93	62,29 \pm 4,76

Die Kontrolltiere zeigten auch in der histochemischen LFB/PAS-Färbung in beiden untersuchten Regionen eine kräftige und homogene blaue Anfärbung des Myelins. Im Corpus callosum dieser Tiere waren weder lateral noch medial Anzeichen einer Demyelinisierung zu erkennen, sodass der Myelinisierungsgrad auf 100% festgelegt wurde (vgl. Abbildung 26 **A und C**).

Bei den Cuprizone-behandelten Tieren ergab sich in R215 und R265 ein ähnliches histologisches Erscheinungsbild, welches je nach Region aber im Ausmaß variierte. In R215 waren bei den WT-Tieren im medialen Corpus callosum eine beginnende Auflockerung des Myelins und eine Demyelinisierung zu erkennen. Der Grad der Myelinisierung betrug $69,00 \pm 20,43\%$. In CPI-17^{-/-}-Mäusen zeigte sich eine bereits kräftiger ausgebildete Demyelinisierung mit teils myelinlosen Bereichen im medialen Corpus callosum. Diese Tiere waren in dieser Region nur noch zu $45,71 \pm 15,12\%$ myelinisiert (vgl. Abbildung 26 **A und B**). In R265 war sowohl bei den WT-Tieren als auch bei den CPI-17^{-/-}-Mäusen ein deutlicher Verlust an Myelin im Bereich des medialen Corpus callosum erkennbar. Der Myelinisierungsgrad betrug in dieser Region bei WT-Tieren $41,00 \pm 10,40\%$ und bei CPI-17^{-/-}-Mäusen $21,67 \pm 12,52\%$ (vgl. Abbildung 26 **C und D**).

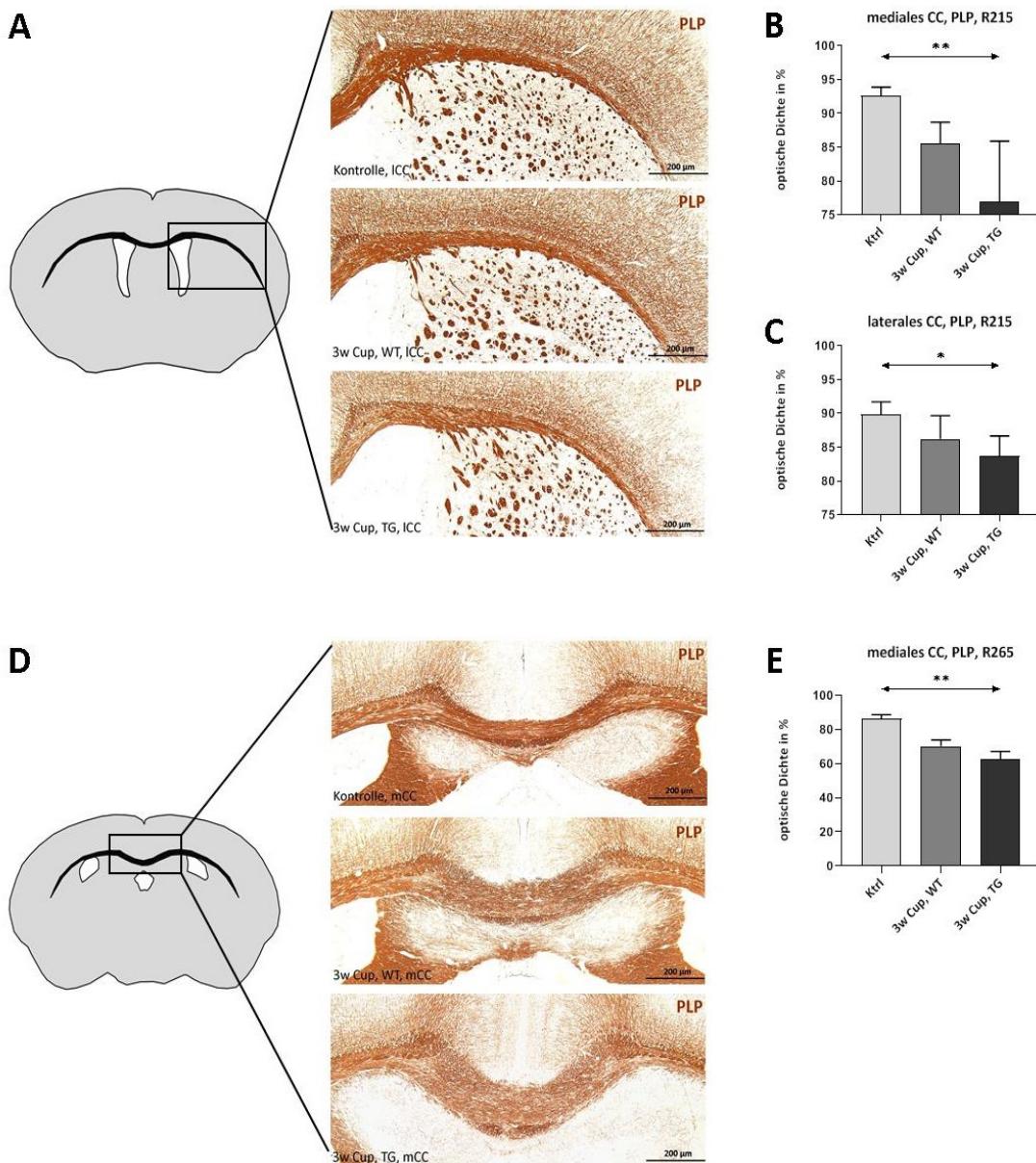


Abbildung 25: Untersuchung der Demyelinisierung anhand einer immunhistochemischen PLP-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)

(A) zeigt in R215 repräsentative Ausschnitte des lateralen Corpus callosum eines unbehandelten Kontrolltieres im Vergleich zu 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen. Die transgenen Tiere weisen gegenüber WT-Tieren eine stärkere Signalminderung im Corpus callosum und besonders im kortikalen Bereich auf. (B) zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Analyse im medialen Corpus callosum in R215. (C) zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Analyse im lateralen Corpus callosum in R215. (D) zeigt in R265 repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum eines unbehandelten Kontrolltieres im Vergleich zu 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen. Die Auflockerung des Myelins ist sowohl bei WT-Tieren als auch bei CPI-17^{-/-}-Mäusen erkennbar. In (E) sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse im medialen Corpus callosum in R265 graphisch dargestellt.

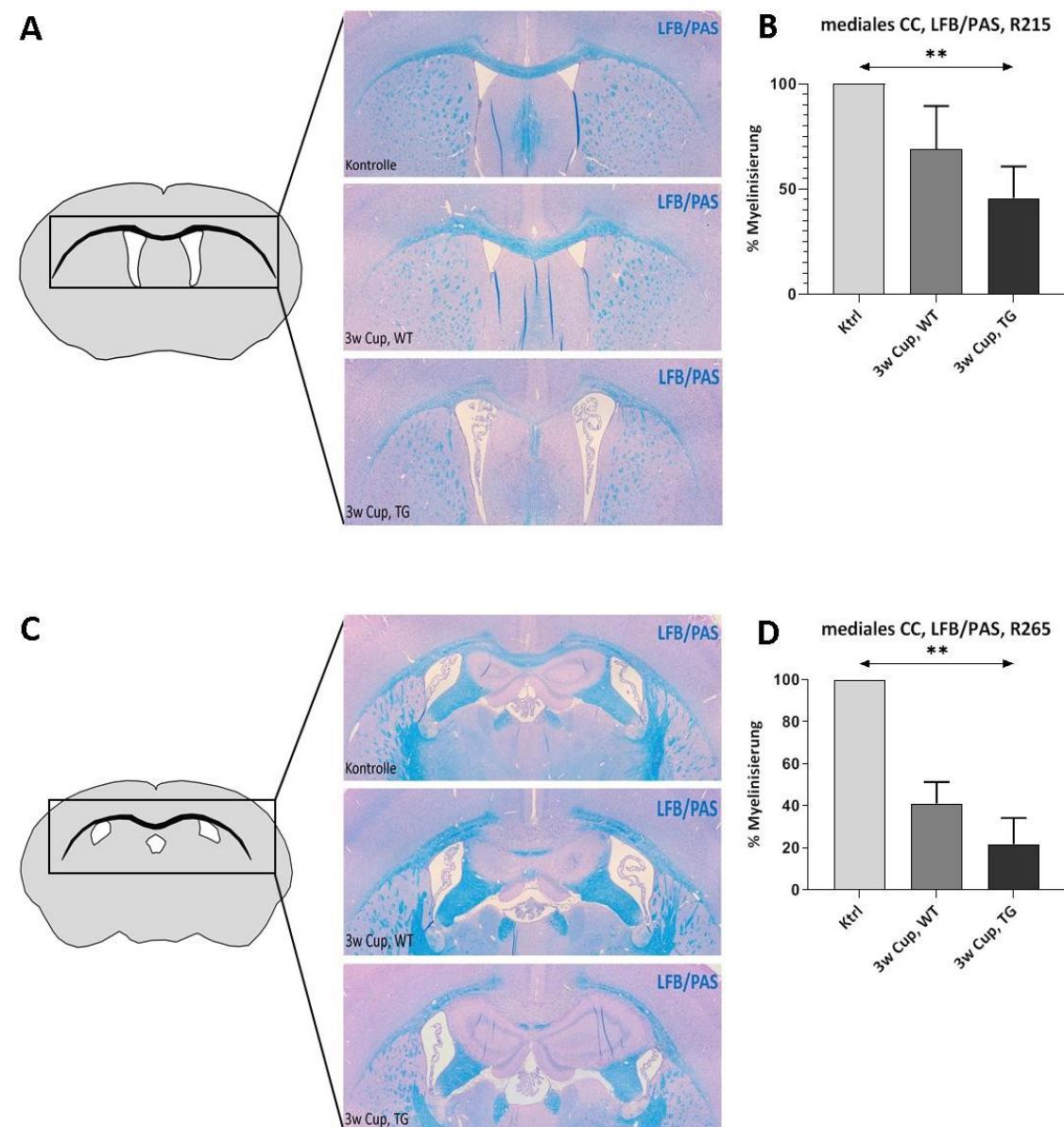


Abbildung 26: Untersuchung der Demyelinisierung anhand einer histologischen LFB/PAS-Färbung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)

(A) zeigt in R215 repräsentativ das Corpus callosum eines unbehandelten Kontrolltieres im Vergleich zu 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen. In den WT-Tieren ist eine beginnende Demyelinisierung anhand der Minderung der Färbungsintensität im medialen Corpus callosum zu erkennen. Bei den transgenen Tieren kommt es in Teilen des medialen Corpus callosum zu einem deutlich sichtbaren, kompletten Verlust der blauen Anfärbung und damit auch des Myelins. In (B) sind die Ergebnisse der manuellen Auswertung der LFB/PAS-Färbung in R215 dargestellt. Bei beiden Cuprizone-behandelten Gruppen ergab sich eine Verminderung des Myelinisierungsgrades, wobei die transgenen Tiere prozentual am wenigsten myelinisiert waren. (C) zeigt in R265 repräsentativ das Corpus callosum eines unbehandelten Kontrolltieres im Vergleich zu 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen. Sowohl bei WT-Tieren als auch bei CPI-17^{-/-}-Mäusen ist ein Verlust der blauen Anfärbung und damit auch des Myelins im Bereich des medialen Corpus callosum sichtbar. In (D) sind die Ergebnisse der manuellen Auswertung der LFB/PAS-Färbung in R265 dargestellt. Beide Cuprizone-Gruppen zeigten eine Verminderung des Myelinisierungsgrades, welche ausgeprägter war als in R215. Die transgenen Tiere waren, wie in R215, prozentual am wenigsten myelinisiert.

Ergebnisse

Mikrogliose bzw. Mikrogliaaktivierung:

Das Ausmaß der Mikrogliose bzw. der Mikrogliaaktivierung wurde mittels einer immunhistochemischen IBA-1-Markierung untersucht.

Bei den Kontrolltieren war in beiden untersuchten Regionen nur eine geringe Zahl an IBA-1⁺-Zellen nachweisbar, welche gleichmäßig über das gesamte Corpus callosum verteilt waren (vgl. Abbildung 27 A). Phänotypisch waren die Zellen durch einen kleinen Zellleib und weite, verzweigte Fortsätze charakterisiert, was dem Bild einer ruhenden Mikrogliazelle entspricht (vgl. Abbildung 27 B).

In den Cuprizone-behandelten Tieren waren in R215 und R265 eine Mikrogliose sowie eine Mikrogliaaktivierung erkennbar. Die Zahl der nachweisbaren IBA-1⁺-Zellen in den Cuprizone-behandelten Tieren überstieg in beiden Regionen deutlich die der Kontrolltiere (vgl. Abbildung 27 A und F). Zusätzlich veränderte sich der Phänotyp der Zellen. Der Zellleib zeigte sich vergrößert (hyperthroph), die Fortsätze waren zurückgezogen und weniger verzweigt. Dies entspricht dem Bild einer aktivierten Mikrogliazelle (vgl. Abbildung 27 C).

In der densitometrischen Auswertung wurde die optische Dichte der immunhistochemischen IBA-1-Markierung quantifiziert. Die Auswertung ergab sowohl für R215 als auch für R265 eine Zunahme der optischen Dichte in Cuprizone-behandelten Tieren verglichen mit den Kontrolltieren. Diese Zunahme war im lateralen sowie im medialen Corpus callosum nachweisbar und bei CPI-17^{−/−}-Tieren ausgeprägter als bei WT-Tieren (vgl. Abbildung 27 D, E und G). Die Mittelwerte ± Standardabweichung sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen IBA-1-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{−/−}-Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)

Versuchsgruppe	optische Dichte in %		
	R215		R265
	mediales CC	laterales CC	mediales CC
Kontrolle	7,73 ± 0,90	9,87 ± 1,44	11,91 ± 1,23
3w Cup, WT	17,65 ± 4,84	18,95 ± 6,69	55,24 ± 23,35
3w Cup, TG	26,50 ± 6,69	23,61 ± 8,48	71,18 ± 7,41

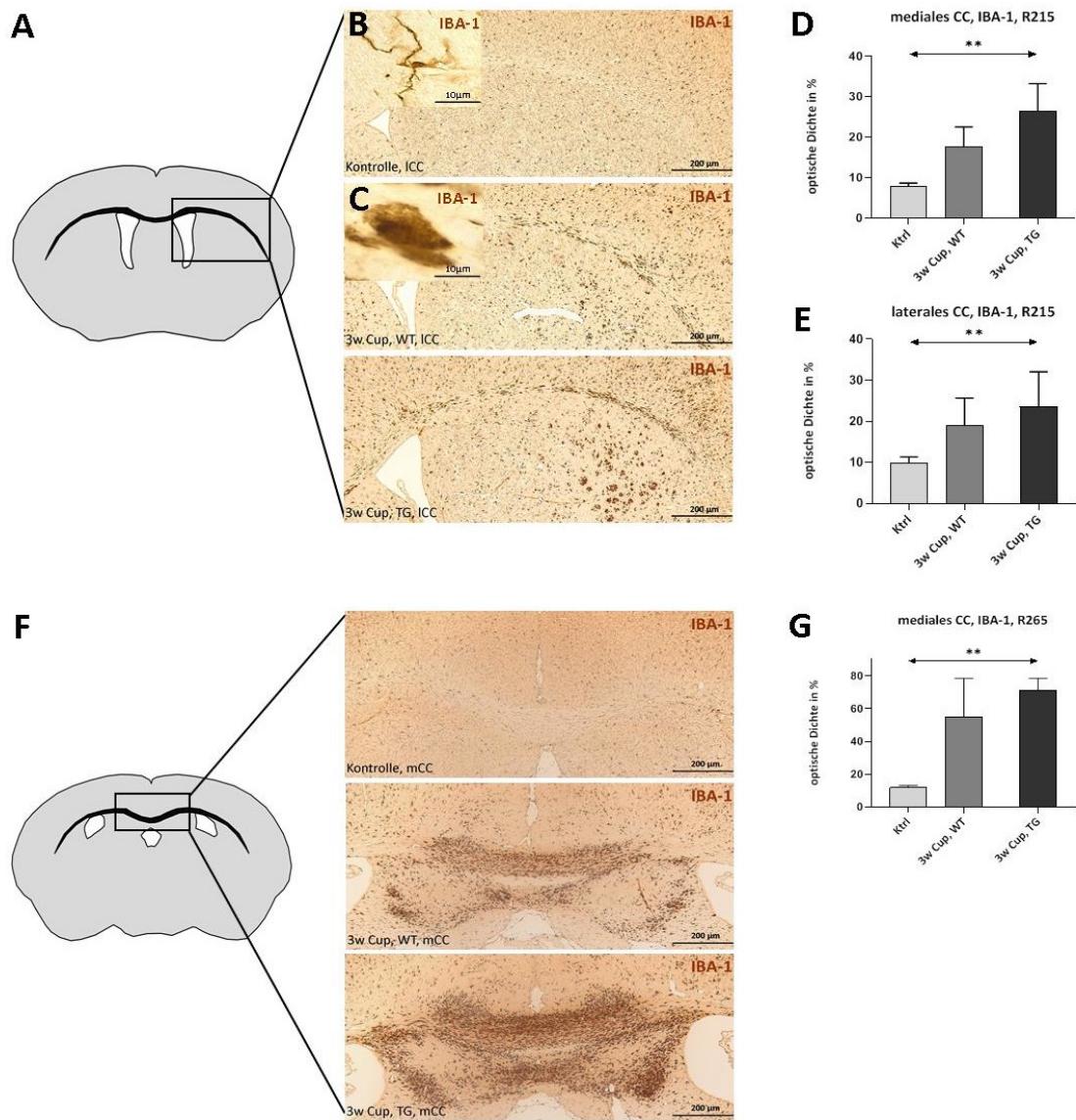


Abbildung 27: Untersuchung der Mikrogliose anhand einer immunhistochemischen IBA-1-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)

(A) zeigt in R215 repräsentative Ausschnitte des lateralen Corpus callosum eines unbehandelten Kontrolltieres im Vergleich zu 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen. In den Cuprizone-behandelten Tieren ist eine moderate Mikrogliose erkennbar. (B) zeigt beispielhaft eine ruhende Mikrogliazelle mit kleinem Zellkörper und weiteten, verzweigten Fortsätzen im lateralen Corpus callosum eines unbehandelten Kontrolltieres. In (C) zeigt sich die Phänotypveränderung der Mikrogliazellen im lateralen Corpus callosum eines WT-Tieres nach Cuprizone-Intoxikation. Der Zellkörper ist vergrößert und die Fortsätze zurückgezogen, die Mikrogliazelle ist aktiviert. (D) zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Analyse im medialen Corpus callosum in R215. (E) zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Analyse im lateralen Corpus callosum in R215. (F) zeigt in R265 repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum eines unbehandelten Kontrolltieres im Vergleich zu 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen. Die ausgeprägte Mikrogliose und Mikrogliaaktivierung ist in den Cuprizone-behandelten Tieren deutlich sichtbar. In (G) sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse im medialen Corpus callosum in R265 graphisch dargestellt.

Ergebnisse

Axonaler Schaden:

Das Ausmaß des axonalen Schadens wurde mittels einer immunhistochemischen APP-Markierung untersucht.

In den Kontrolltieren waren im gesamten Corpus callosum weder in R215 noch in R265 APP-Sphäroide nachweisbar.

In den Cuprizone-behandelten Tieren zeigten sich hingegen im medialen Corpus callosum beider untersuchter Regionen zahlreiche APP-Sphäroide unterschiedlicher Größe (vgl. Abbildung 28 A). Die Sphäroidzahl und damit das Ausmaß des axonalen Schadens waren dabei in CPI-17^{-/-}-Mäusen in beiden untersuchten Regionen größer als in WT-Tieren. Als Resultat der manuellen Auszählung der Sphäroide ergab sich in R215 für WT-Tiere eine Zahl von $49,25 \pm 33,54$ APP-Sphäroiden/mm² und für CPI-17^{-/-}-Mäuse eine Zahl von $117,70 \pm 61,71$ APP-Sphäroiden/mm². In R265 waren es $69,95 \pm 30,75$ APP-Sphäroide/mm² in WT-Tieren und $103,10 \pm 25,04$ APP-Sphäroide/mm² in CPI-17^{-/-}-Mäusen (vgl. Abbildung 28 B und C).

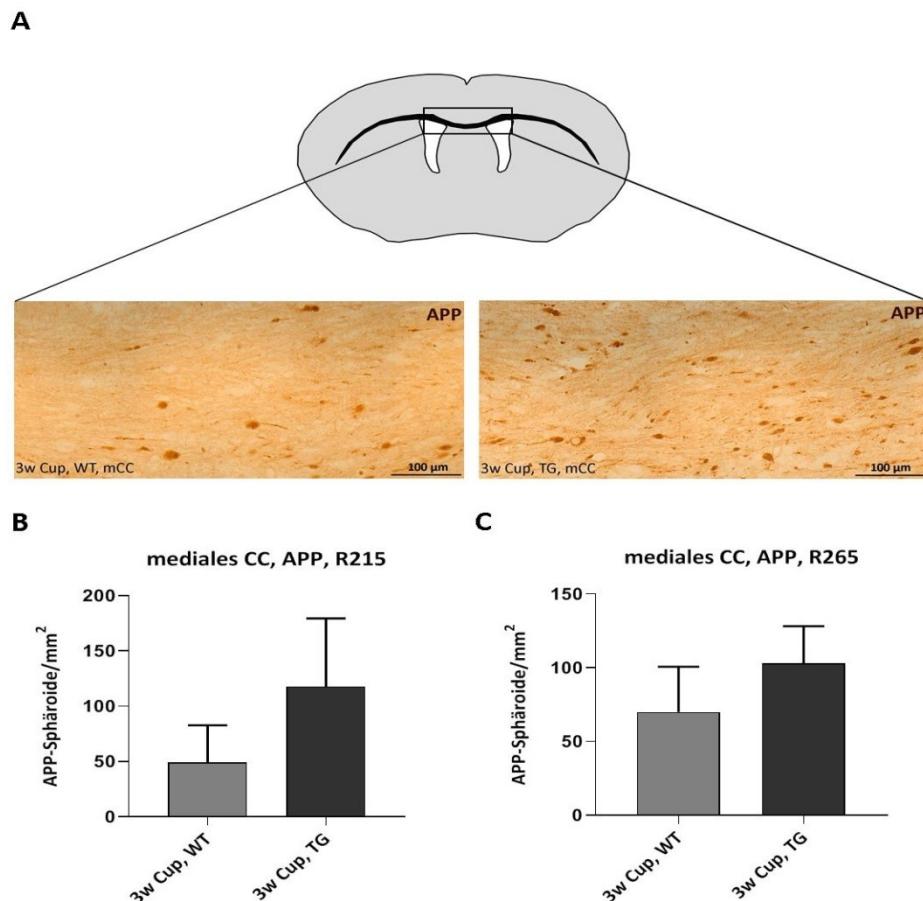


Abbildung 28: Untersuchung des axonalen Schadens anhand einer immunhistochemischen APP-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)

(A) zeigt in R215 repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum von 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen. Die APP-Sphäroide sowie deren größere Anzahl in transgenen Tieren sind deutlich zu erkennen. In (B) sind die Ergebnisse der manuellen Auszählung von APP-Sphäroiden im medialen Corpus callosum in R215 graphisch dargestellt. (C) zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse aus R265.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die MS ist eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung des ZNS, deren Ätiologie bis heute nicht geklärt ist. Aufgrund des sehr heterogenen Krankheitsbildes sind bisher lediglich Therapieansätze verfügbar, die entweder die Symptome während eines akuten Schubes lindern oder die Frequenz der Schübe verringern (Keegan & Noseworthy, 2002; Übersichtsartikel in: Kipp et al., 2017). Eine Heilung der MS ist nach aktuellem medizinischen Kenntnisstand nicht möglich.

Da die MS die häufigste demyelinisierende Erkrankung bei jungen Erwachsenen darstellt (T. Kuhlmann et al., 2008), sind ein besseres Verständnis der Ätiologie und die Entwicklung neuer Therapie- bzw. Heilungsansätze von großer klinischer Relevanz. In der Forschung werden daher, gemäß ethischer und gesetzlicher Richtlinien, MS-Tiermodelle in Kombination mit verschiedenen Auswertungsmethoden wie z.B. der Immunhistochemie oder der Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Vorteile, Nachteile und Grenzen der in dieser Arbeit verwendeten Methoden werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

5.1.1 Das Cuprizone-Modell

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Cuprizone-Modell gehört zur Gruppe der toxischen MS-Tiermodelle. In dieser Gruppe entsteht das für das Modell typische Schädigungsmuster als direkte Reaktion auf die Gabe eines Toxins. Die Kennzeichen des Cuprizone-Modells sind unter anderem eine zentrale Demyelinisierung (Hesse et al., 2010; Höflich et al., 2016; Islam et al., 2009), die Apoptose reifer Oligodendrozyten (Goldberg et al., 2013; Hesse et al., 2010; Matsushima & Morell, 2001) und die Proliferation von OPZ (Gudi et al., 2009; Islam et al., 2009). Des Weiteren kommt es zu einer Mikrogliose (Hiremath et al., 1998; Remington et al., 2007) und zu akutem axonalen Schaden (Höflich et al., 2016).

Das Cuprizone-Modell eignet sich besonders gut zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsvorgängen sowie deren Einflussfaktoren (Praet et al., 2014; Torkildsen et al., 2008). Die durch eine 5-wöchige Cuprizone-Intoxikation hervorgerufene Demyelinisierung ist gleichmäßig, in bestimmten Hirnregionen lokalisiert und dadurch vorhersagbar und einfach zu reproduzieren (Doucette et al., 2010; Hesse et al., 2010; Hiremath et al., 1998; Matsushima & Morell, 2001; Torkildsen et al., 2008).

Das Cuprizone-Modell ist aufgrund der ausgeprägten Vulnerabilität von reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten gegenüber Cuprizone (Bénardais et al., 2013; Matsushima & Morell, 2001) außerdem gut dafür geeignet, zu untersuchen, welche Auswirkungen die Apoptose dieser Zellen und damit der Verlust der von ihnen exprimierten Proteine auf das Gewebe haben.

In Bezug auf die MS weist das Cuprizone-Modell histopathologisch zahlreiche Parallelen zu den progressiven Phasen der Erkrankung auf. Diese Parallelen sind in Tabelle 18 zusammengefasst und ermöglichen eine weitere Erforschung dieser Krankheitsphasen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da für die progressive MS bisher keine adäquaten Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen (Tsang & Macdonell, 2011).

Ein letzter Vorteil des Cuprizone-Modells ist dessen einfache Anwendung. Zur Durchführung eines Experimentes unter Nutzung dieses Modells sind weder spezielle Gerätschaften noch eine besondere Ausbildung der Experimentatoren, mit Ausnahme derjenigen, die die Gesundheit der Tiere kontrollieren, erforderlich.

Tabelle 18: Ähnlichkeiten zwischen den progressiven Phasen der MS und dem Cuprizone-Tiermodell (Tabelle modifiziert nach Zhan et al., 2020)

Histopathologie der progressiven MS	Referenz	Histopathologie im Cuprizone-Modell	Referenz
kortikale Demyelinisierung	Kutzelnigg et al., 2005; Peterson et al., 2001	kortikale und subkortikale Demyelinisierung	Gudi et al., 2009; Skripuletz et al., 2008
axonaler Schaden	Haines et al., 2011; Singh et al., 2017	akuter axonaler Schaden	Höflich et al., 2016
geringe Immunzellinfiltration	Lassmann et al., 2007; Machado-Santos et al., 2018	geringe bis keine Infiltration durch Lymphozyten	Kaddatz et al., 2020; Remington et al., 2007,
geringe Schädigung der Blut-Hirn-Schranke	Kirk et al., 2003; Leech et al., 2007	geringe Schädigung der Blut-Hirn-Schranke	Matsushima & Morell, 2001; Torkildsen et al., 2008

Das Cuprizone-Modell weist einige Nachteile auf. Zu diesen Nachteilen gehört z.B., wie bei allen anderen Tiermodellen auch, die nur begrenzt mögliche Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Versuchstier auf den Menschen. Ein positiver Effekt eines neuen Therapieansatzes im Tiermodell bedeutet nicht zwingend auch einen positiven Effekt auf die Erkrankung im Menschen bzw. der Einfluss eines bestimmten Faktors, ob positiv oder negativ, auf das Ausmaß der Schädigungen im Tiermodell muss nicht dem im Menschen entsprechen. Ein Beispiel hierfür aus einem anderen Tiermodell ist die Applikation von TGFβ-2. Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) führte sie zu einer verminderten Ausbildung der EAE, wohingegen TGFβ-2 im Menschen keinen signifikanten Effekt auf die „Expanded Disability Status Scale“ (Methode zur Quantifizierung der Beeinträchtigungen bei der MS) oder auf die Anzahl der Läsionen im MRT hatte (Übersichtsartikel in: Wiendl & Hohlfeld, 2002). Für Ergebnisse aus dem Cuprizone-Modell gilt ähnliches. Diese können zwar als Hinweis auf einen möglichen Einfluss eines bestimmten Faktors oder einer bestimmten Therapie angesehen werden, müssen aber immer durch weitere, kontrollierte Studien auf ihre Geltung im Menschen überprüft werden.

Ein weiterer Nachteil des Cuprizone-Modells ist die von verschiedenen Variablen abhängige Wirkung des Cuprizones auf den Organismus. Neben der Applikationsdauer und -dosis (Übersichtsartikel in: Gudi et al., 2014) spielt auch die Wahl der Versuchstiere eine erhebliche Rolle. Die Regenerations- bzw. Remyelinisierungsfähigkeit von 16 Monate alten Mäusen ist z.B. nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung geringer als bei 2 Monate alten Mäusen (Doucette et al., 2010) und Mäuse vom CD1-Stamm sind gegenüber Cuprizone deutlich weniger empfindlich als Mäuse vom Stamm C57BL/6 (Yu et al., 2017). Außerdem kann die Wirkung von Cuprizone auf den Organismus auch abhängig vom Geschlecht und dem Gewicht der verwendeten Tiere variieren (Übersichtsartikel in: Gudi et al., 2014). Diese Vielzahl von Variablen sorgt zwar dafür, dass eine Demyelinisierung durch Cuprizone in unterschiedlichen Arten von Versuchstieren induziert werden kann, macht die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen gleichzeitig aber schwerer vergleichbar. Die Einflussparameter und damit auch die Cuprizone-Wirkung variieren von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe, was zu unterschiedlichen Ergebnissen bei ansonsten gleichen Untersuchungen führen kann.

In Bezug auf die MS und deren Erforschung weist das Cuprizone-Modell zwei weitere wesentliche Nachteile auf.

Zum einen unterscheiden sich die Ätiologie und der zeitliche Ablauf der Schädigungen im Cuprizone-Modell erheblich von denen der menschlichen MS. Im Cuprizone-Modell werden die Schädigungen durch die Gabe eines Toxins hervorgerufen, dessen Wirkmechanismus, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, bis heute nicht vollständig geklärt ist. Bei der menschlichen MS hingegen sind die auslösenden Faktoren der Erkrankung sehr variabel und das Schädigungsmuster entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel eben jener und unter anderem dem adaptiven Immunsystem des menschlichen Körpers (Chatterjee et al., 2013). Dabei wird angenommen, dass dieses Zusammenspiel teilweise schon Jahre vor dem ersten Auftreten einer klinischen Symptomatik im Gehirn von MS-Patienten beginnen kann. Im Cuprizone-Modell hingegen lassen sich die ersten Pathologien bereits Tage (Hesse et al., 2010) bzw. wenige Wochen (Blakemore, 1972; Hesse et al., 2010; Kipp et al., 2009) nach Beginn der Cuprizone-Intoxikation nachweisen. Die vorher stattfindenden, langjährigen, pathologischen Prozesse können daher im Tiermodell nicht untersucht werden.

Zum anderen ist das Cuprizone-Modell eher durch eine geringe bis hin zu keiner Infiltration durch Lymphozyten gekennzeichnet (Kaddatz et al., 2020; Remington et al., 2007). Die autoimmune Komponente der MS kann in diesem Modell also ebenfalls nicht ausreichend untersucht werden.

Das Cuprizone-Modell kann letztendlich, wie andere Tiermodelle auch, nicht alle Merkmale der MS abbilden. Es eignet sich aber gut dazu, bestimmte Teilespekte der MS zu untersuchen. Zu diesen Teilespekten gehören insbesondere die Demyelinisierung und der Untergang von reifen Oligodendrozyten. Das Ziel dieser Arbeit war, das Expressionsmuster von CPI-17 in Oligodendrozyten genauer zu charakterisieren und einen möglichen Einfluss dieses Proteins auf die Demyelinisierung zu identifizieren. Die immunologische Komponente der MS spielte eine untergeordnete Rolle.

Daher eignete sich, trotz der Nachteile, zu diesem Zweck das Cuprizone-Modell deutlich besser als z.B. das gängigere EAE-Modell, welches durch T-Zell-Infiltration in das ZNS (Höflich et al., 2016) und geringe primäre Demyelinisierung (Übersichtsartikel in: Kipp et al., 2017) gekennzeichnet ist.

5.1.2 Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und histochemische Färbungen

Mithilfe der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz lassen sich gezielt ein oder mehrere Antigene im Gewebe farblich darstellen, während bei den histochemischen Färbungen bestimmte Strukturen oder Zelltypen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften sichtbar gemacht werden.

Bei allen der drei genannten Auswertungsmethoden kann es aus verschiedenen Gründen dazu kommen, dass die weitere Auswertung des markierten bzw. gefärbten Gewebes beeinträchtigt wird und die Ergebnisse weniger exakt und verlässlich sind.

Bei immunhistochemischen Markierungen, der Immunfluoreszenz und bei allen weiteren Auswertungsmethoden, bei denen AK zum Einsatz kommen, kann es zu unspezifischen Bindungen der AK innerhalb des Gewebes kommen (vgl. Kapitel 3.9.1), welche das Ergebnis der weiteren Auswertungen in die eine oder andere Richtung verfälschen können. Diesem Phänomen wurde durch verschiedene Arbeitsschritte während der Markierungen entgegengewirkt. Zum einen wurde die spezifische Bindung des primären AK an die gesuchten Antigene durch einen Vergleich des entstandenen Markierungsmusters mit einem bei spezifischer Bindung zu erwartendem Muster überprüft. Zum anderen wurden unspezifische Bindungen des sekundären AK durch das „Blocken“ sowie die Mitführung von Negativkontrollen ohne primären AK vermindert bzw. kontrolliert. Bei den Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen erfolgten zusätzliche Kontrollen, durch die ausgeschlossen werden konnte, dass die sekundären AK an den falschen Primärantikörper binden und somit das Ergebnis verfälschen.

Des Weiteren können bei allen drei Methoden die Signal- bzw. Färbeintensitäten in Abhängigkeit von z.B. dem Alter, der Dicke, dem Einbettungsvorgang oder auch der Lagerung der untersuchten Gewebe von Färbung zu Färbung variieren. Daher wurden bei jeder Markierung oder Färbung stets Hirnschnitte aller Tiere aus dem Tierexperiment zur selben Zeit und nach demselben Arbeitsprotokoll behandelt, sodass einheitliche und vergleichbare Ergebnisse entstehen.

5.1.3 Quantifizierung von Zell-, Partikel- und optischer Dichte

Die Quantifizierung von Zell-, Partikel- und optischer Dichte stellt einen der letzten Schritte bei der Auswertung von Geweben dar. Durch eine Quantifizierung werden die Ergebnisse einer Markierung oder Färbung verständlicher, deutlicher und vergleichbarer. Doch auch bei diesen Methoden existieren kritisch zu betrachtende Aspekte.

Die Quantifizierung von Zell- und Partikeldichten erfolgt z.B. manuell durch einen Experimentator. Daher können unter anderem die Erwartungshaltung des Experimentators, dessen persönliche Zählkriterien sowie die Intensität der Markierung oder Färbung zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Diesen Einflussfaktoren wurde zum einen dadurch entgegengewirkt, dass die Bilder gegenüber dem Experimentator verblindet wurden. Die Erwartungshaltung des Experimentators kann die Zählweise somit nicht mehr beeinflussen. Zum anderen wurden immer zwei Hirnschnitte eines Tieres gezählt und der daraus gebildete Mittelwert als Ergebnis verwendet, um den Einfluss der Zählkriterien möglichst gering zu halten.

Die Quantifizierung der optischen Dichte erfolgt mithilfe eines Thresholds im Programm ImageJ. Die Auswahl des Thresholds kann beeinflussen, ob ein Pixel von der Software als schwarz oder als weiß eingeordnet wird, obwohl sich die Intensität des Pixels nicht verändert. Dies beeinflusst auch die optische Dichte und kann somit das Ergebnis verfälschen. Dem wurde dadurch entgegengewirkt, dass miteinander zu vergleichende Hirnschnitte bzw. auch miteinander zu vergleichende Markierungen stets mit demselben Threshold quantifiziert wurden, sodass der Einfluss des Thresholds auf das Ergebnis jeweils gleich ist.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von CPI-17 im Wesentlichen auf spätreife Oligodendrozyten beschränkt.

Außerdem wurde CPI-17 als möglicher Einflussfaktor der Demyelinisierung identifiziert. Im toxischen Cuprizone-Mausmodell wiesen CPI-17^{+/}-Tiere eine stärkere Demyelinisierung, eine ausgeprägtere Mikrogliose sowie mehr akuten axonalen Schaden als WT-Tiere auf. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse unter Einbeziehung der aktuellen Literatur diskutiert.

5.2.1 Die Expression von CPI-17

Das Protein CPI-17 wird unter Normalbedingungen nur von sehr wenigen Zelltypen wie z.B. glatten Muskelzellen (Eto et al., 1997; Woodsome et al., 2001), Endothelzellen (Eto, 2009) und, innerhalb des ZNS, von Oligodendrozyten (Dornblut, 2018; Takada & Appel, 2010) exprimiert. Einen Hinweis darauf, dass das Protein CPI-17 innerhalb des ZNS noch von weiteren Zelltypen wie z.B. Mikrogliazellen, Astrozyten oder Purkinje-Zellen exprimiert wird, gibt es basierend auf dem aktuellen Forschungsstand und den Ergebnissen meiner eigenen Untersuchungen nicht. Zum einen zeigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen einen starken Abfall der Anzahl CPI-17^{+/}-Zellen nach Cuprizone-Intoxikation, kompatibel zur Apoptose der reifen Oligodendrozyten.

Die Zahl der CPI-17⁺-Zellen müsste, wenn das Protein in Mikrogliazellen oder Astrozyten exprimiert werden würde, entsprechend der nach Cuprizone-Intoxikation auftretenden Mikro- und Astrogliose eher zu- als abnehmen.

Zum anderen wiesen die Purkinje-Zellen bei der immunhistochemischen Markierung von CPI-17 im Kleinhirn von WT- und CPI-17^{-/-}-Mäusen sowohl in WT-Tieren als auch in transgenen Tieren eine bräunliche Färbung auf. Die Gefäßwände waren hingegen nur in WT-Tieren gefärbt. Die Färbung der Purkinje-Zellen ist daher höchstwahrscheinlich nicht darauf zurückzuführen, dass Purkinje-Zellen CPI-17 exprimieren, sondern darauf, dass der primäre AK unspezifisch von den Purkinje-Zellen gebunden wird. Die Morphologie und das Verteilungsmuster von CPI-17⁺-Zellen in untersuchten Hirnschnitten der vorliegenden Arbeit stimmten außerdem mit der Morphologie und dem Verteilungsmuster von Oligodendrozyten überein. Daher kann davon ausgegangen werden, dass CPI-17 bezogen auf die innerhalb des ZNS lokalisierten Zellen ausschließlich von Oligodendrozyten exprimiert wird.

Die Expression von CPI-17 in Oligodendrozyten wurde explizit dahingehend untersucht, ab wann sie im Verlauf des Reifeprozesses dieser Zellen beginnt. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen durchgeführt, in denen CPI-17, jeweils in Kombination mit einem Marker für bestimmte Reifestufen der Oligodendrozyten, markiert wurde. Zunächst wurde die Expression von CPI-17 bezogen auf alle Reifestufen der Oligodendrozyten untersucht. Bei dem in diesem Fall verwendeten Marker handelte es sich um OLIG-2. OLIG-2 ist ein hauptsächlich nuklear lokalizierter (Doucette et al., 2010) Transkriptionsfaktor, der für die Migration, Proliferation und Differenzierung von OPZs eine wichtige Rolle spielt (Übersichtsartikel in: Tiane et al., 2019). OLIG-2 wird zu jedem Zeitpunkt des Reifeprozesses in Oligodendrozyten exprimiert (Elisabeth Sock & Michael Wegner, 2019; T. Kuhlmann et al., 2008) und fand bereits in zahlreichen publizierten Studien zur von der Reifestufe unabhängigen Identifizierung von Oligodendrozyten Anwendung. Aufgrund der etablierten Nutzung dieses Markers und dessen Expressionsmusters eignete er sich für die in der vorliegenden Arbeit geplanten Untersuchungen am besten.

Als Ergebnis dieser Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung ergab sich, dass unter Kontrollbedingungen und je nach Hirnregion 70-81% der OLIG-2⁺-Zellen auch CPI-17 exprimieren. Bei den 19-30% der OLIG-2⁺-Zellen, die kein CPI-17 exprimieren, handelt es sich wahrscheinlich um unausgereifte Oligodendrozyten, die zwar schon OLIG-2, aber noch kein CPI-17 exprimieren. Nach Cuprizone-Intoxikation nahm die absolute Zahl an OLIG-2⁺-Zellen eher moderat und die von CPI-17⁺-Zellen stark ab. Dementsprechend nahm ebenfalls der Anteil der OLIG-2⁺-Zellen, die auch CPI-17 exprimieren, im Corpus callosum ab. In beiden Fällen wurden die Unterschiede in den Zellzahlen bzw. im Prozentsatz im Vergleich zu Kontrollbedingungen von lateral nach medial größer. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Vulnerabilität der im Corpus callosum befindlichen Oligodendrozyten gegenüber Cuprizone in der untersuchten Hirnregion 265 medial höher ist als lateral. Der eher moderate Abfall der Anzahl an OLIG-2⁺-Zellen lässt sich durch proliferierende OPZ erklären. Diese werden zum Ort der Schädigung rekrutiert und ersetzen die apoptotischen,

ausgereiften Oligodendrozyten. Da OPZ bereits OLIG-2 exprimieren, bilden nun sie anstatt der reifen Oligodendrozyten den größten Teil der OLIG-2⁺-Zellen. Entsprechend meiner Arbeitshypothese exprimieren diese Zellen aber noch kein CPI-17, was wiederum den starken Abfall der Anzahl an CPI-17⁺-Zellen und den daraus resultierenden Anstieg der Anzahl an OLIG-2⁺CPI-17⁻-Zellen erklärt.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung meine in Kapitel 4.1.1 formulierte Arbeitshypothese. Die Expression von CPI-17 scheint selektiv für reife Oligodendrozyten zu sein.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde folgend untersucht, ob die Expression von CPI-17 in allen reifen Oligodendrozyten erfolgt oder ob, entsprechend meiner Arbeitshypothese, anhand des Expressionsmusters noch eine weitere Differenzierung in früh- und spätreife Oligodendrozyten möglich ist. Bei dem zu diesem Zweck in der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung verwendeten Marker handelte es sich um APC. APC ist ein vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes (Midgley et al., 1997) Protein, welches unter anderem an Catenine bindet und damit möglicherweise einen Einfluss auf die Zell-Zell-Adhäsion hat (Bhat et al., 1996). Es wurde ursprünglich im Zusammenhang mit einer genetischen Prädisposition für Kolon-Karzinome entdeckt, später dann aber auch in Oligodendrozyten nachgewiesen (Bhat et al., 1996). APC eignet sich dabei besonders zur Identifizierung von ausgereiften Oligodendrozyten (Ness et al., 2005; Salinas Tejedor et al., 2015) und die Anwendung von APC zu diesem Zweck wurde bereits in mehreren publizierten Studien etabliert.

Als Ergebnis dieser Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung ergab sich, dass unter Kontrollbedingungen >94% der APC⁺-Zellen auch CPI-17 exprimieren. Nach Cuprizone-Intoxikation nahm die Zahl der CPI-17⁺-Zellen erneut stark ab. Die Zahl der APC⁺-Zellen nahm ebenfalls ab, wenn auch in geringerem Maß als es bei CPI-17 der Fall war. Dementsprechend verringerte sich der Anteil an APC⁺-Zellen, die auch CPI-17 exprimieren. Die medial höhere Vulnerabilität der im Corpus callosum befindlichen Oligodendrozyten in R265 spiegelte sich bei dieser Doppelmarkierung in den Ergebnissen wider, da die Unterschiede in den absoluten Zellzahlen bzw. dem Prozentsatz im Vergleich zu Kontrollbedingungen von lateral nach medial größer wurden. Der starke Abfall der Zahl CPI-17⁺-Zellen resultiert wahrscheinlich daraus, dass die reifen Oligodendrozyten in die Apoptose übergehen und die rekrutierten, proliferierenden OPZ sowie die unausgereiften Oligodendrozyten noch kein CPI-17 exprimieren. Die weniger ausgeprägte Verringerung der Zahl APC⁺-Zellen ist damit zu erklären, dass die zum Ort der Schädigung rekrutierten Oligodendrozyten zwar schon reif genug für die Expression von APC sind, aber noch kein CPI-17 exprimieren. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass APC unter Stressbedingungen, wie sie bei einer Cuprizone-Intoxikation auftreten, auch von Zellen exprimiert wird, die keine Oligodendrozyten sind.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass innerhalb der Gruppe der reifen Oligodendrozyten noch eine weitere Differenzierung anhand des Expressionsmusters möglich ist. APC scheint im Rahmen der Oligodendrozytenreifung zu einem früheren Zeitpunkt als CPI-17 exprimiert zu werden.

Die Ergebnisse beider Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen bestätigen insgesamt mit statistischer Signifikanz meine Arbeitshypothese, dass die Expression von CPI-17 selektiv für spätreife Oligodendrozyten ist. Für die MS-Forschung ist das von Bedeutung, weil es in Typ III und Typ IV Läsionen (vgl. Kapitel 1.1.2) zur Apoptose von genau diesem Zelltyp kommt (Kipp et al., 2009; T. Kuhlmann et al., 2008). Die Entwicklung von proliferierenden OPZ zu ausgereiften, myelinisierenden Oligodendrozyten ist anschließend für die Remyelinisierung und damit für die Verminderung der neurologischen Symptomatik bei MS-Patienten nötig. Das Protein CPI-17 bzw. das kodierende *ppp1r14a*-Gen werden während des endgültigen Differenzierungsprozesses von reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten stark exprimiert (Zhang et al., 2014). Die Klärung der genauen Funktion von CPI-17 innerhalb dieses Prozesses ist daher möglicherweise von therapeutischer Relevanz und sollte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

5.2.2 Die Rolle von CPI-17 im toxischen Cuprizone-Mausmodell

Das Protein CPI-17 wird, wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben, hauptsächlich von ausgereiften, myelinisierenden Oligodendrozyten exprimiert. Das für CPI-17 kodierende *ppp1r14a*-Gen gehört außerdem zu den 10 am stärksten regulierten Genen während Remyelinisierungsvorgängen (Huang et al., 2011). Dies lässt die Vermutung zu, dass das Vorhandensein von CPI-17 auch für die allgemeine Myelininstabilität von Bedeutung ist. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden der Einfluss eines homozygoten Knockouts des *ppp1r14a*-Gens und damit auch der Einfluss des Fehlens von CPI-17 auf die Ausprägung Cuprizone-induzierter Schädigungen im Tiermodell untersucht. Als Ergebnis dieses Experimentes ergab sich, dass CPI-17^{-/-}-Tiere sowohl eine stärker ausgeprägte Demyelinisierung als auch eine stärkere Mikrogliose und mehr akuten axonalen Schaden im Vergleich zu WT-Tieren aufwiesen. Das Vorhandensein von CPI-17 scheint dementsprechend ein zu beachtender Faktor bei der Ausprägung demyelinisierender Läsionen im Tiermodell zu sein.

Die Beteiligung von CPI-17 an pathologischen Prozessen konnte bereits bei anderen Krankheiten nachgewiesen werden. So ist CPI-17 z.B. zu den möglichen Onkogenen zu zählen, da es über den Merlin-Signalweg zu einer gesteigerten Ras-Aktivität und damit zu einer tumorerzeugenden Transformation von Zellen führen kann (Jin et al., 2006; Riecken et al., 2016). Zahlreiche menschliche Tumorzelllinien weisen eine gesteigerte Expression bzw. eine Dyexpression von CPI-17 auf. Dazu gehören z.B. Schwannome (Hagel et al., 2016; Xu et al., 2020), Melanome (Riecken et al., 2016) oder Mesotheliome (Thurneysen et al., 2009). Außerdem sind Veränderungen der Expression von CPI-17 und daraus folgend auch Veränderungen der Phosphorylierungslevel von CPI-17 und der MLKP an der Entstehung von verschiedenen mit dem glatten Muskelsystem assoziierten Erkrankungen beteiligt. Zu diesen Erkrankungen gehören z.B. allergisches Asthma (Sakai et al., 2017), die diabetogene Blasenfunktionsstörung (Chang et al., 2006) oder pulmonale Hypertonie (Dakshinamurti et al., 2005).

Die Ergebnisse des Tierexperimentes geben nun einen Hinweis darauf, dass CPI-17 möglicherweise auch bei demyelinisierenden Erkrankungen wie der MS eine Rolle spielen könnte. Die Tiere, bei denen CPI-17 vorhanden war, wiesen ein geringeres Ausmaß an Cuprizone-induzierten Schädigungen auf als CPI-17^{-/-}-Tiere. Dieses Experiment konnte also tendenziell zeigen, dass das Fehlen von CPI-17 mit einer verminderten Myelininstabilität gegenüber Cuprizone assoziiert ist. Bei MS-Patienten entsteht die neurologische Symptomatik unter anderem durch die Ausbildung von demyelinisierten Läsionen im ZNS. Eine Erhöhung der Myelininstabilität durch CPI-17 und eine damit verbundene geringere Demyelinisierung könnten daher für MS-Patienten von erheblicher präventiver bzw. therapeutischer Bedeutung sein. Der Signalweg, über den CPI-17 für diesen Effekt sorgt, wurde in dieser Studie nicht identifiziert und sollte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Des Weiteren ist es notwendig zu überprüfen, ob sich der in diesem MS-Tiermodell gemessene Effekt auch auf andere Tiermodelle übertragen lässt oder ob CPI-17 die Myelininstabilität lediglich gegenüber einem Toxin erhöhen kann.

Es ist außerdem kritisch zu betrachten, dass sich als Ergebniss zwar Unterschiede und klare Tendenzen zwischen den betrachteten Versuchsgruppen nachweisen ließen, statistische Signifikanzen jedoch nicht. Dies liegt möglicherweise zum einen an der relativ geringen Gruppengröße und zum anderen an der, abhängig von der körperlichen Konstitution, relativ variablen Ausprägung der Cuprizone-induzierten Schädigungen in den unterschiedlichen Versuchstieren. Zur Erlangung statistischer Signifikanz sollten daher noch weitere Studien mit größeren Gruppen und Versuchstieren mit möglichst identischen körperlichen Eigenschaften durchgeführt werden.

5.3 Abschließende Bemerkungen

Die bisherige Erforschung von CPI-17 fokussierte sich vor allem auf dessen Funktion im System der glatten Muskulatur und die Beteiligung an der Entstehung von mit diesem System assoziierten Erkrankungen. Das Expressionsmuster von CPI-17 und die Funktion im ZNS bzw. in Oligodendrozyten sind daher noch nicht genau bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression von CPI-17 in Oligodendrozyten genauer untersucht und der Einfluss dieses Proteins auf das Ausmaß der Schädigungen im Cuprizone-Modell charakterisiert.

Die vorliegende Arbeit liefert einen Hinweis darauf, dass CPI-17 als möglicher, an pathologischen Prozessen beteiligter Faktor bei der MS zu berücksichtigen ist. Über welchen Signalweg CPI-17 seine Funktion in Oligodendrozyten ausübt, wie genau es an der Erhöhung der Myelininstabilität beteiligt ist und inwieweit diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sind, sollte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Dadurch wird ein besseres Verständnis der Ätiologie der MS ermöglicht, welches unerlässlich für die Entwicklung neuer Präventions-, Therapie- und Heilungsansätze ist.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Die vorliegende Arbeit basiert grundlegend auf der Hypothese, dass die MS eine primär neurodegenerative Erkrankung ist, bei der es zur Entstehung von demyelinisierten Läsionen im ZNS kommt. Die myelinisierenden Zellen des ZNS, die Oligodendrozyten, sind daher von zentraler Bedeutung. Das Protein CPI-17 wird von Oligodendrozyten exprimiert. Ab wann im Verlauf des Reifeprozesses der Oligodendrozyten die Expression erfolgt, ist bisher jedoch nicht geklärt. In funktioneller Hinsicht könnte CPI-17 einen Einfluss auf die Differenzierung von OPZ zu reifen Oligodendrozyten, auf die allgemeine Myelininstabilität und auf Remyelinisierungsvorgänge haben. Diese Annahme beruht darauf, dass das für CPI-17 kodierende *ppp1r14a*-Gen während der Differenzierung von Oligodendrozyten und späten Remyelinisierungsvorgängen zu den am stärksten regulierten Genen gehört.

Hypothesen:

- CPI-17 ist ein Marker für spätreife Oligodendrozyten
- CPI-17^{-/-}-Mäuse sind gegenüber einer Cuprizone-Intoxikation vulnerabler als WT-Mäuse

Methoden: Die Charakterisierung des Expressionsmusters von CPI-17 erfolgte mithilfe von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen in Hirnen von gesunden und 5 Wochen mit Cuprizone behandelten Mäusen. Zur Untersuchung der Vulnerabilität wurden CPI-17^{-/-}- und WT-Mäuse im Cuprizone-Mausmodell verglichen. Der Demyelinisierungsgrad, die Mikrogliose und das Ausmaß des akuten axonalen Schadens wurden mittels immunhistochemischer Markierungen und histochemischer Färbungen untersucht.

Ergebnisse: OPZ und frühreife Oligodendrozyten exprimieren vermutlich kein CPI-17. Die Expression von CPI-17 scheint selektiv für spätreife Oligodendrozyten zu sein. CPI-17^{-/-}-Mäuse weisen im Vergleich zu WT-Mäusen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Cuprizone auf.

Ausblick: Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass CPI-17 sowohl für die Differenzierung von Oligodendrozyten als auch für die allgemeine Myelininstabilität von Bedeutung und somit ein möglicher zu beachtender Faktor bei der Entstehung demyelinisierender Läsionen in der MS ist. Der Signalweg, über den CPI-17 diese Funktionen erfüllt und inwieweit die Ergebnisse dieser Arbeit auf andere Tiermodelle übertragbar sind, sollte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Mögliche neue Therapie- oder Präventionsansätze könnten so identifiziert werden.

7. Thesen

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine erworbene, chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) und stellt die häufigste demyelinisierende Erkrankung bei jungen Erwachsenen dar.
 2. Die Entstehung von entzündlichen Läsionen sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz des ZNS ist ein pathologisches Kennzeichen der Erkrankung. Je nach Lokalisation der Läsionen kann bei der MS nahezu jedes neurologische Symptom auftreten. Die grundlegenden Merkmale einer MS-Läsion sind Demyelinisierung, Inflammation, der Untergang von Axonen und reaktive Gliose.
 3. Die myelinisierenden Zellen des ZNS, die Oligodendrozyten, sind ein Typ von Gliazellen und entwickeln sich aus multipotenten Stammzellen der subventrikulären Zone. Diese Entwicklung ist ein komplexer Vorgang, der durch unterschiedliche Signalkaskaden reguliert wird.
 4. Die Funktion der Oligodendrozyten ist die Myelinisierung von Axonen, wodurch die schnelle Weiterleitung von Aktionspotenzialen ermöglicht wird. Des Weiteren bilden die Oligodendrozyten eine metabolische Unterstützung für die Axone und erhalten ihre Integrität.
 5. Das Protein CPI-17 ist ein 17 kDa schweres Protein, dessen Expression sich unter Normalbedingungen auf wenige Zelltypen beschränkt. Zu diesen Zellen gehören glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Epithelzellen und, innerhalb des ZNS, Oligodendrozyten.
 6. Die Funktion von CPI-17 ist die Hemmung der Myosin-Phosphatase. Diese spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Kontraktionsgrades der glatten Muskulatur und im sogenannten Merlin-Signalweg. In Oligodendrozyten scheint CPI-17 einen Einfluss auf die Differenzierung und die Remyelinisierung zu haben.
 7. Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches, zytodegeneratives Tiermodell, welches sich besonders zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsvorgängen eignet. Die grundlegenden Merkmale dieses Tiermodells sind eine zentrale Demyelinisierung, die Apoptose reifer Oligodendrozyten und die Proliferation von OPZ. Begleitet werden diese Prozesse von einer ausgeprägten Mikrogliaaktivierung, einer reaktiven Gliose und akutem axonalen Schaden.
 8. Die Charakterisierung des Expressionsmusters von CPI-17 erfolgte mithilfe von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen in Hirnen von gesunden und 5 Wochen mit Cuprizone behandelten Mäusen.
-

9. Zur Untersuchung der Vulnerabilität wurden CPI-17^{-/-}- und WT-Mäuse im Cuprizone-Mausmodell verglichen. Der Demyelinisierungsgrad, die Mikrogliose und das Ausmaß des akuten axonalen Schadens wurden mittels immunhistochemischer Markierungen und histochemischer Färbungen untersucht.
10. OPZ und frühreife Oligodendrozyten exprimieren vermutlich kein CPI-17. Die Expression von CPI-17 scheint selektiv für spätreife Oligodendrozyten zu sein.
11. CPI-17^{-/-}-Mäuse weisen im Vergleich zu WT-Mäusen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Cuprizone auf.
12. Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass CPI-17 sowohl für die Differenzierung von Oligodendrozyten als auch für die allgemeine Myelininstabilität von Bedeutung und somit ein möglicher zu beachtender Faktor bei der Entstehung demyelinisierender Läsionen bei der MS ist.

8. Literaturverzeichnis

- Adamo, A. M., Aloise, P. A., Soto, E. F. & Pasquini, J. M. (1990). Neonatal hyperthyroidism in the rat produces an increase in the activity of microperoxisomal marker enzymes coincident with biochemical signs of accelerated myelination. *Journal of neuroscience research*, 25(3), 353–359. <https://doi.org/10.1002/jnr.490250312>
- Bakker, D. A. & Ludwin, S. K. (1987). Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *Journal of the neurological sciences*, 78(2), 125–137.
- Barres, B. A [B. A.], Lazar, M. A. & Raff, M. C [M. C.] (1994). A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development (Cambridge, England)*, 120(5), 1097–1108.
- Barres, B. A [B. A.] & Raff, M. C [M. C.] (1993). Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature*, 361(6409), 258–260. <https://doi.org/10.1038/361258a0>
- Barres, B. A [B. A.], Schmid, R., Sendnter, M. & Raff, M. C [M. C.] (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development (Cambridge, England)*, 118(1), 283–295.
- Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., Ioannidis, J. P. A. & Tzoulaki, I. (2015). Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*, 14(3), 263–273. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70267-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70267-4)
- Bénardais, K., Kotsiari, A., Skuljec, J., Koutsoudaki, P. N., Gudi, V., Singh, V., Vulinović, F., Skripuletz, T. & Stangel, M. (2013). Cuprizone bis(cyclohexylidenehydrazide) is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotoxicity research*, 24(2), 244–250. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9380-9>
- Benetti, F., Ventura, M., Salmini, B., Ceola, S., Carbonera, D., Mammi, S., Zitolo, A., D'Angelo, P., Urso, E., Maffia, M., Salvato, B. & Spisni, E. (2010). Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. *Neurotoxicology*, 31(5), 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.008>
- Bhat, R. V., Axt, K. J., Fosnaugh, J. S., Smith, K. J., Johnson, K. A., Hill, D. E., Kinzler, K. W. & Baraban, J. M. (1996). Expression of the APC tumor suppressor protein in oligodendroglia. *Glia*, 17(2), 169–174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199606\)17:2<169::AID-GLIA8>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199606)17:2<169::AID-GLIA8>3.0.CO;2-Y)
- Blakemore, W. F. (1972). Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *Journal of neurocytology*, 1(4), 413–426. <https://doi.org/10.1007/bf01102943>
- Blakemore, W. F. (1973a). Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. *Journal of the neurological sciences*, 20(1), 63–72. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(73\)90118-4](https://doi.org/10.1016/0022-510X(73)90118-4)
- Blakemore, W. F. (1973b). Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *Journal of the neurological sciences*, 20(1), 73–83. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(73\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0022-510X(73)90119-6)

- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J. & Barres, B. A [Ben A.] (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *The Journal of Neuroscience*, 28(1), 264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Carlton, W. W. (1967). Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sciences*, 6(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(67\)90356-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(67)90356-6)
- Chang, S., Hypolite, J. A., DiSanto, M. E., Changolkar, A., Wein, A. J. & Chacko, S. (2006). Increased basal phosphorylation of detrusor smooth muscle myosin in alloxan-induced diabetic rabbit is mediated by upregulation of Rho-kinase beta and CPI-17. *American journal of physiology. Renal physiology*, 290(3), F650-6. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00235.2005>
- Chatterjee, D., Biswas, K., Nag, S., Ramachandra, S. G. & Das Sarma, J. (2013). Microglia play a major role in direct viral-induced demyelination. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 510396. <https://doi.org/10.1155/2013/510396>
- Czopka, T., Ffrench-Constant, C. & Lyons, D. A. (2013). Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Developmental cell*, 25(6), 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.013>
- Dakshinamurti, S., Mellow, L. & Stephens, N. L. (2005). Regulation of pulmonary arterial myosin phosphatase activity in neonatal circulatory transition and in hypoxic pulmonary hypertension: a role for CPI-17. *Pediatric pulmonology*, 40(5), 398–407. <https://doi.org/10.1002/ppul.20290>
- Demerens, C., Stankoff, B., Logak, M., Anglade, P., Allinquant, B., Couraud, F., Zalc, B. & Lubetzki, C. (1996). Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9887–9892. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9887>
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), 5046–5061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997>
- Dornblut, C. (2018). *How do oligodendrocytes enwrap axons?* [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Doucette, J. R., Jiao, R. & Nazarali, A. J. (2010). Age-related and cuprizone-induced changes in myelin and transcription factor gene expression and in oligodendrocyte cell densities in the rostral corpus callosum of mice. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(4), 607–629. <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9486-z>
- Dugas, J. C., Tai, Y. C., Speed, T. P., Ngai, J. & Barres, B. A [Ben A.] (2006). Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *The Journal of Neuroscience*, 26(43), 10967–10983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2572-06.2006>

- Elbaz, B. & Popko, B. (2019). Molecular Control of Oligodendrocyte Development. *Trends in neurosciences*, 42(4), 263–277. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.01.002>
- Elisabeth Sock & Michael Wegner (2019). Transcriptional control of myelination and remyelination. *Glia*, 67(11), 2153–2165. <https://doi.org/10.1002/glia.23636>
- Eto, M [Masumi] (2009). Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, 284(51), 35273–35277. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.059972>
- Eto, M [Masumi], Bock, R., Brautigan, D. L [David L.] & Linden, D. J. (2002). Cerebellar Long-Term Synaptic Depression Requires PKC-Mediated Activation of CPI-17, a Myosin/Moesin Phosphatase Inhibitor. *Neuron*, 36(6), 1145–1158. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01107-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01107-8)
- Eto, M [Masumi], Kitazawa, T [Toshio], Matsuzawa, F., Aikawa, S.-I., Kirkbride, J. A., Isozumi, N., Nishimura, Y., Brautigan, D. L [David L.] & Ohki, S.-Y. (2007). Phosphorylation-induced conformational switching of CPI-17 produces a potent myosin phosphatase inhibitor. *Structure (London, England : 1993)*, 15(12), 1591–1602. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.10.014>
- Eto, M [Masumi], Senba, S., Morita, F. & Yazawa, M [Michio] (1997). Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle 1. *FEBS letters*, 410(2-3), 356–360. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00657-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00657-1)
- Fischbach, F., Nedelcu, J., Leopold, P., Zhan, J., Clarner, T., Nellessen, L., BeiSel, C., van Heuvel, Y., Goswami, A., Weis, J., Denecke, B., Schmitz, C., Hochstrasser, T., Nyamoya, S., Victor, M., Beyer, C. & Kipp, M. (2018). Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3. *Glia*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1002/glia.23538>
- Fukata, Y., Kimura, K., Oshiro, N., Saya, H., Matsuura, Y. & Kaibuchi, K. (1998). Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *The Journal of cell biology*, 141(2), 409–418. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.2.409>
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., Brinkmann, B. G., Kassmann, C. M., Tzvetanova, I. D., Möbius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M. W., Moraes, C. T., Frahm, J., Goebbels, S. & Nave, K.-A. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, 485(7399), 517–521. <https://doi.org/10.1038/nature11007>
- Geissler, K. J., Jung, M. J., Riecken, L. B., Sperka, T., Cui, Y., Schacke, S., Merkel, U., Markwart, R., Rubio, I., Than, M. E., Breithaupt, C., Peuker, S., Seifert, R., Kaupp, U. B., Herrlich, P. & Morrison, H [Helen] (2013). Regulation of Son of sevenless by the membrane-actin linker protein ezrin. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20587–20592.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1222078110>
- Goldberg, J., Daniel, M., van Heuvel, Y., Victor, M., Beyer, C., Clarner, T. & Kipp, M. (2013). Short-term cuprizone feeding induces selective amino acid deprivation with concomitant activation of an integrated stress response in oligodendrocytes. *Cellular and molecular neurobiology*, 33(8), 1087–1098.
<https://doi.org/10.1007/s10571-013-9975-y>
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T. & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 73. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00073>
- Gudi, V., Moharregh-Khiabani, D., Skripuletz, T., Koutsoudaki, P. N., Kotsiari, A., Skuljec, J., Trebst, C. & Stangel, M. (2009). Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain research*, 1283, 127–138.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.005>
- Hagel, C [C.], Dornblut, C., Schulz, A., Wiehl, U [U.], Friedrich, R. E., Huckhagel, T., Mautner, V.-F. & Morrison, H [H.] (2016). The putative oncogene CPI-17 is up-regulated in schwannoma. *Neuropathology and applied neurobiology*, 42(7), 664–668. <https://doi.org/10.1111/nan.12330>
- Haines, J. D., Inglese, M. & Casaccia, P. (2011). Axonal damage in multiple sclerosis. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 78(2), 231–243.
<https://doi.org/10.1002/msj.20246>
- Hemm, R. D., Carlton, W. W. & Welser, J. R. (1971). Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 18(4), 869–882.
[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(71\)90235-3](https://doi.org/10.1016/0041-008X(71)90235-3)
- Hesse, A., Wagner, M., Held, J., Brück, W [Wolfgang], Salinas-Riester, G., Hao, Z., Waisman, A. & Kuhlmann, T [Tanja] (2010). In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiology of disease*, 37(2), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.016>
- Hiremath, M. M., Saito, Y., Knapp, G. W., Ting, J.-Y., Suzuki, K. & Matsushima, G. K. (1998). Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*, 92(1-2), 38–49.
[https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00168-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00168-4)
- Hoffmann, K., Lindner, M., Gröticke, I., Stangel, M. & Löscher, W. (2008). Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Experimental neurology*, 210(2), 308–321.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.005>
- Höflich, K. M., Beyer, C., Clarner, T., Schmitz, C., Nyamoya, S., Kipp, M. & Hochstrasser, T. (2016). Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain research*, 1650, 125–133.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.048>
- Huang, J. K., Jarjour, A. A., Nait Oumesmar, B., Kerninon, C., Williams, A., Krezel, W., Kagechika, H., Bauer, J [Julien], Zhao, C., Baron-Van Evercooren, A., Chambon, P.,
-

- Ffrench-Constant, C. & Franklin, R. J. M. (2011). Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nature neuroscience*, 14(1), 45–53. <https://doi.org/10.1038/nn.2702>
- Humphrey, P. A., Dehner, L. P. & Pfeifer, J. D. (2008). *The Washington manual of surgical pathology*. Lippincott Williams & Wilkins. [http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=booktext&NEWS=N&DF=bookdb&AN=01337258/1st_Edition&XPATH=/PG\(0\)](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=booktext&NEWS=N&DF=bookdb&AN=01337258/1st_Edition&XPATH=/PG(0))
- Islam, M. S., Tatsumi, K., Okuda, H., Shiosaka, S. & Wanaka, A. (2009). Olig2-expressing progenitor cells preferentially differentiate into oligodendrocytes in cuprizone-induced demyelinated lesions. *Neurochemistry international*, 54(3-4), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.10.011>
- Jin, H., Sperka, T., Herrlich, P. & Morrison, H [Helen] (2006). Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature*, 442(7102), 576–579. <https://doi.org/10.1038/nature04856>
- Kaddatz, H., Joost, S., Nedelcu, J., Chrzanowski, U., Schmitz, C., Gingele, S., Gudi, V., Stangel, M., Zhan, J., Santrau, E., Greiner, T., Frenz, J., Müller-Hilke, B., Müller, M., Amor, S., van der Valk, P. & Kipp, M. (2020). Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1002/glia.23937>
- Katz Sand, I. (2015). Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*, 28(3), 193–205. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000206>
- Keegan, B. M. & Noseworthy, J. H. (2002). Multiple sclerosis. *Annual review of medicine*, 53, 285–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103909>
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S. & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica*, 118(6), 723–736. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0591-3>
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T. & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 27(2), 123–137. <https://doi.org/10.1111/bpa.12454>
- Kirk, J [John], Plumb, J [Jonnie], Mirakhur, M. & McQuaid, S [Stephen] (2003). Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *The Journal of Pathology*, 201(2), 319–327. <https://doi.org/10.1002/path.1434>
- Kuhlmann, T [T.] (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*, 125(10), 2202–2212. <https://doi.org/10.1093/brain/awf235>
- Kuhlmann, T [T.], Miron, V., Cui, Q., Cuo, Q., Wegner, C., Antel, J [J.] & Brück, W [W.] (2008). Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 131(Pt 7), 1749–1758. <https://doi.org/10.1093/brain/awn096>

- Kuhlmann, T [Tanja], Ludwin, S., Prat, A., Antel, J [Jack], Brück, W [Wolfgang] & Lassmann, H [Hans] (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta neuropathologica*, 133(1), 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1653-y>
- Kuo, I. Y. & Ehrlich, B. E. (2015). Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(2), a006023. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006023>
- Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C. F., Stadelmann, C., Brück, W [Wolfgang], Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J. E. & Lassmann, H [Hans] (2005). Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 128(Pt 11), 2705–2712. <https://doi.org/10.1093/brain/awh641>
- Lassmann, H [Hans], Brück, W [Wolfgang] & Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 17(2), 210–218. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x>
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., Pellerin, L., Magistretti, P. J. & Rothstein, J. D. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, 487(7408), 443–448. <https://doi.org/10.1038/nature11314>
- Leech, S., Kirk, J [J.], Plumb, J [J.] & McQuaid, S [S.] (2007). Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology*, 33(1), 86–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00781.x>
- Li, H., He, Y., Richardson, W. D. & Casaccia, P. (2009). Two-tier transcriptional control of oligodendrocyte differentiation. *Current opinion in neurobiology*, 19(5), 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.08.004>
- Lucchinetti, C., Brück, W [W.], Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. & Lassmann, H [H.] (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology*, 47(6), 707–717.
- Machado-Santos, J., Saji, E., Tröscher, A. R., Paunovic, M., Liblau, R., Gabriely, G., Bien, C. G., Bauer, J [Jan] & Lassmann, H [Hans] (2018). The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*, 141(7), 2066–2082. <https://doi.org/10.1093/brain/awy151>
- Matsushima, G. K. & Morell, P. (2001). The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 11(1), 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x>
- McDonald, J. W. & Belegu, V. (2006). Demyelination and remyelination after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*, 23(3-4), 345–359. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.345>

- Midgley, C. A., White, S., Howitt, R., Save, V., Dunlop, M. G., Hall, P. A., Lane, D. P., WYLLIE, A. H. & Bubb, V. J. (1997). APC expression in normal human tissues. *The Journal of Pathology*, 181(4), 426–433. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199704\)181:4<426::AID-PATH768>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199704)181:4<426::AID-PATH768>3.0.CO;2-T)
- Ness, J. K., Valentino, M., McIver, S. R. & Goldberg, M. P. (2005). Identification of oligodendrocytes in experimental disease models. *Glia*, 50(4), 321–328. <https://doi.org/10.1002/glia.20206>
- Ohki, S., Eto, M [M.], Kariya, E., Hayano, T., Hayashi, Y., Yazawa, M [M.], Brautigan, D. & Kainosho, M. (2001). Solution NMR structure of the myosin phosphatase inhibitor protein CPI-17 shows phosphorylation-induced conformational changes responsible for activation. *Journal of molecular biology*, 314(4), 839–849. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5200>
- Olsen, J. A. & Akirav, E. M. (2015). Remyelination in multiple sclerosis: cellular mechanisms and novel therapeutic approaches. *Journal of neuroscience research*, 93(5), 687–696. <https://doi.org/10.1002/jnr.23493>
- Othman, A., Frim, D. M., Polak, P., Vujicic, S., Arnason, B. G. W. & Boullerne, A. I. (2011). Olig1 is expressed in human oligodendrocytes during maturation and regeneration. *Glia*, 59(6), 914–926. <https://doi.org/10.1002/glia.21163>
- Pasquini, L. A., Calatayud, C. A., Bertone Uña, A. L., Millet, V., Pasquini, J. M. & Soto, E. F. (2007). The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochemical research*, 32(2), 279–292. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9165-0>
- Pearson, M. A., Reczek, D., Bretscher, A. & Karplus, P. (2000). Structure of the ERM Protein Moesin Reveals the FERM Domain Fold Masked by an Extended Actin Binding Tail Domain. *Cell*, 101(3), 259–270. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80836-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80836-3)
- Peterson, J. W., Bö, L., Mörk, S., Chang, A. & Trapp, B. D. (2001). Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*, 50(3), 389–400. <https://doi.org/10.1002/ana.1123>
- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., van der Linden, A. & Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 47, 485–505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.004>
- Remington, L. T., Babcock, A. A., Zehntner, S. P. & Owens, T. (2007). Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1713–1724. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060783>
- Riecken, L. B., Zoch, A., Wiehl, U [Ulrike], Reichert, S., Scholl, I., Cui, Y., Ziemer, M., Anderegg, U., Hagel, C [Christian] & Morrison, H [Helen] (2016). CPI-17 drives oncogenic Ras signaling in human melanomas via Ezrin-Radixin-Moesin family proteins. *Oncotarget*, 7(48), 78242–78254. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12919>

- Sakai, H., Suto, W., Kai, Y. & Chiba, Y. (2017). Mechanisms underlying the pathogenesis of hyper-contractility of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanshi*, 53(0), 37–47. <https://doi.org/10.1540/jsmr.53.37>
- Salinas Tejedor, L., Gudi, V., Kucman, V., Pul, R., Gingele, S., Sühs, K.-W., Stangel, M. & Skripuletz, T. (2015). Oligodendroglial markers in the cuprizone model of CNS de- and remyelination. *Histology and histopathology*, 30(12), 1455–1464. <https://doi.org/10.14670/HH-11-640>
- Sawcer, S., Franklin, R. J. M. & Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology*, 13(7), 700–709. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70041-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70041-9)
- Shaw, R. J., Paez, J., Curto, M., Yaktine, A., Pruitt, W. M., Saotome, I., O'Bryan, J. P., Gupta, V., Ratner, N., Der, C. J., Jacks, T. & McClatchey, A. I. (2001). The Nf2 Tumor Suppressor, Merlin, Functions in Rac-Dependent Signaling. *Developmental cell*, 1(1), 63–72. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00009-0)
- Sidman et al. (1971). *Atlas of the mouse brain and spinal cord*. <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>
- Singh, S., Dallenga, T., Winkler, A., Roemer, S., Maruschak, B., Siebert, H., Brück, W [Wolfgang] & Stadelmann, C. (2017). Relationship of acute axonal damage, Wallerian degeneration, and clinical disability in multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0831-8>
- Skripuletz, T., Bussmann, J.-H., Gudi, V., Koutsoudaki, P. N., Pul, R., Moharregh-Khiabani, D., Lindner, M. & Stangel, M. (2010). Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 20(2), 301–312. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00271.x>
- Skripuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C. & Stangel, M. (2008). Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *The American Journal of Pathology*, 172(4), 1053–1061. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070850>
- Solari, A., Giovannetti, A. M., Giordano, A., Tortorella, C., Torri Clerici, V., Brichetto, G., Granella, F., Lugaresi, A., Patti, F., Salvetti, M., Pesci, I., Pucci, E., Centonze, D., Danni, M. C., Bonavita, S., Ferraro, D., Gallo, A., Gajofatto, A., Nociti, V., . . . the, M. P. (2019). Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis: Patient Awareness and Needs. Results From an Online Survey in Italy and Germany. *Frontiers in Neurology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00916>
- Suminaite, D., Lyons, D. A. & Livesey, M. R. (2019). Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. *Glia*, 67(11), 2050–2062. <https://doi.org/10.1002/glia.23665>
- Takada, N. & Appel, B. (2010). Identification of genes expressed by zebrafish oligodendrocytes using a differential microarray screen. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 239(7), 2041–2047. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22338>

- Temple, S. & Raff, M. C [Martin C.] (1986). Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: Evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell*, 44(5), 773–779. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90843-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90843-3)
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., . . . Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 17(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Thurneysen, C., Opitz, I., Kurtz, S., Weder, W., Stahel, R. A. & Felley-Bosco, E. (2009). Functional inactivation of NF2/merlin in human mesothelioma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 64(2), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.08.014>
- Tiane, A., Schepers, M., Rombaut, B., Hupperts, R., Prickaerts, J., Hellings, N., van den Hove, D. & Vanmierlo, T. (2019). From OPC to Oligodendrocyte: An Epigenetic Journey. *Cells*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/cells8101236>
- Torkildsen, O., Brunborg, L. A., Myhr, K.-M. & Bø, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 188, 72–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x>
- Tsang, B. K.-T. & Macdonell, R. (2011). Multiple sclerosis- diagnosis, management and prognosis. *Australian family physician*, 40(12), 948–955.
- Venturini, G. (1973). Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo. *Journal of neurochemistry*, 21(5), 1147–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb07569.x>
- Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1299–1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>
- Wiendl, H. & Hohlfeld, R. (2002). Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 16(3), 183–200. <https://doi.org/10.2165/00063030-200216030-00003>
- Woodsome, T. P., Eto, M [M.], Everett, A., Brautigan, D. L. & Kitazawa, T [T.] (2001). Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *The Journal of Physiology*, 535(Pt 2), 553–564. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00553.x>
- Xu, J., Zhang, Y [Yang], Shi, Y., Yin, D., Dai, P., Zhao, W. & Zhang, T. (2020). CPI-17 Overexpression and Its Correlation With the NF2 Mutation Spectrum in Sporadic Vestibular Schwannomas. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European*

- Academy of Otology and Neurotology*, 41(1), e94-e102.
<https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002430>
- Yonemura, S., Matsui, T., Tsukita, S [Shoichiro] & Tsukita, S [Sachiko] (2002). Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *Journal of cell science*, 115(Pt 12), 2569–2580.
- Yu, Q., Hui, R., Park, J., Huang, Y., Kusnecov, A. W., Dreyfus, C. F. & Zhou, R. (2017). Strain differences in cuprizone induced demyelination. *Cell & bioscience*, 7, 59.
<https://doi.org/10.1186/s13578-017-0181-3>
- Zhan, J., Mann, T., Joost, S., Behrang, N., Frank, M. & Kipp, M. (2020). The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040843>
- Zhang, Y [Ye], Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keeffe, S., Phatnani, H. P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B. A [Ben A.] & Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929–11947.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei unterscheidbaren MS-Verlaufsformen.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklungsphasen von Oligodendrozyten.....	5
Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur von CPI-17	6
Abbildung 4: Kontraktionsregulierung im glatten Muskel.....	7
Abbildung 5: Der Merlin-Signalweg	8
Abbildung 6: Strukturformel von Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon).....	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen	16
Abbildung 8: Regionen 215 und 265 (Maus-Hirn-Atlas von Sidman et al.)	18
Abbildung 9: Ergebnisse einer LFB/PAS-Färbung am Hirn	19
Abbildung 10: Prinzip einer immunhistochemischen Markierung nach der ABC-Methode..	22
Abbildung 11: Prinzip einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung	27
Abbildung 12: Darstellung der in der Immunfluoreszenz untersuchten ROIs auf Höhe des rostralen Hippocampus, R265.....	30
Abbildung 13: Darstellung der in der Immunhistochemie untersuchten ROIs auf Höhe des Zusammenschlusses der Commissura anterior und des rostralen Hippocampus, R215 und R265	31
Abbildung 14: Quantifizierung von APP-Sphäroiden	35
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Expressionszeitraumes von OLIG-2 und CPI-17 während des Reifeprozesses von Oligodendrozyten entsprechend der Arbeitshypothese	36
Abbildung 16: Absolute Zahlen von CPI-17 ⁺ - und OLIG-2 ⁺ -Zellen unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation in verschiedenen Regionen des Corpus callosum und des motorischen Cortex auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265) ..	37
Abbildung 17: Fluoreszenzaufnahmen einer DAPI/OLIG-2/CPI-17-Markierung unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation im Corpus callosum unter dem Cingulum auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265).....	38
Abbildung 18: Anteil der OLIG-2 ⁺ -Zellen, die auch CPI-17 exprimieren unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation	39
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Expressionszeitraumes von APC und CPI-17 im Verlauf des Reifeprozesses von Oligodendrozyten entsprechend der Arbeitshypothese	40
Abbildung 20: Absolute Zahlen von CPI-17 ⁺ - und APC ⁺ -Zellen unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation in verschiedenen Regionen des Corpus callosum und des motorischen Cortex auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265) ..	41
Abbildung 21: Fluoreszenzaufnahmen einer DAPI/APC/CPI-17-Markierung unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation im Corpus callosum unter dem Cingulum auf Höhe des rostralen Hippocampus (R265).....	42
Abbildung 22: Anteil der APC ⁺ -Zellen, die auch CPI-17 exprimieren unter Kontrollbedingungen und nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 23: Lokalisierung von CPI-17 im ZNS von WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen anhand einer immunhistochemischen CPI-17-Markierung im Corpus callosum auf Höhe der Commissura anterior (R215)	45
Abbildung 24: Untersuchung der Expression von CPI-17 durch Purkinje-Zellen anhand einer immunhistochemischen CPI-17-Markierung im Kleinhirn von WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen	46
Abbildung 25: Untersuchung der Demyelinisierung anhand einer immunhistochemischen PLP-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)	48
Abbildung 26: Untersuchung der Demyelinisierung anhand einer histologischen LFB/PAS-Färbung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)	49
Abbildung 27: Untersuchung der Mikrogliose anhand einer immunhistochemischen IBA-1-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)	51
Abbildung 28: Untersuchung des axonalen Schadens anhand einer immunhistochemischen APP-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265)	52

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Chemikalien	13
Tabelle 2: Manuelle Entwässerung und Einbettung	18
Tabelle 3: Entparaffinierung und Rehydrierung.....	20
Tabelle 4: Differenzierung von LFB	20
Tabelle 5: PAS-Färbung und Kerngegenfärbung	21
Tabelle 6: Entwässerung	21
Tabelle 7: Entparaffinierung und Rehydrierung.....	23
Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper bei immunhistochemischen Markierungen.....	24
Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper bei immunhistochemischen Markierungen	25
Tabelle 10: Entwässerung	25
Tabelle 11: Arbeitsprotokoll einer immunhistochemischen Markierung.....	26
Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper bei Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen....	28
Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper bei Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen	28
Tabelle 14: Arbeitsprotokoll einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung.....	29
Tabelle 15: Arbeitsschritte einer Dichtemessung mittels ImageJ.....	33
Tabelle 16: Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen PLP- Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralnen Hippocampus (R265).....	47
Tabelle 17: Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen IBA- 1-Markierung im Corpus callosum von Kontrolltieren und 3 Wochen mit Cuprizone behandelten WT- und CPI-17 ^{-/-} -Mäusen auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralnen Hippocampus (R265).....	50
Tabelle 18: Ähnlichkeiten zwischen den progressiven Phasen der MS und dem Cuprizone- Tiermodell (Tabelle modifiziert nach Zhan et al., 2020)	54

11. Anhang**11.1 Überblick Tierexperiment München**

In dieser Tabelle finden sich die ausführlichen Informationen zu dem Tierexperiment, welches in Kapitel 3.5 erwähnt wurde. An Material dieses Experimentes wurden die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen zur Untersuchung der Expression von CPI-17 durchgeführt.

Tierexperiment München	
Name des Experimentes:	Verlauf 4, Uta
Durchführungsart:	Ludwig-Maximilian-Universität, München
durchführender Experimentator:	Dr. med. M. sc. U. Splietker, Ludwig-Maximilian-Universität München
Informationen zu den verwendeten Tieren:	Abstammung: C57BL/6, Janvier Geschlecht: männlich Alter: 6 Wochen Gewicht: 19-21g
Versuchsbedingungen:	Tag/Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden Temperatur: 22 ± 2 °C Käfigwechsel: dreimal die Woche
Cuprizone-Dosis:	0,25% Gemisch wurde täglich frisch zubereitet
Versuchsgruppen:	Kontrolle 1w Cup 3w Cup 5w Cup
Untersuchte Gruppen:	Kontrolle, n=3 5w Cup, n=3
Untersuchte Hirnregion:	R265
nachgewiesene Antigene:	APC, CPI-17, OLIG-2

Danksagungen

Danksagungen

In besonderem Maße möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Markus Kipp für die herausragende Betreuung meiner Promotion bedanken. Das große persönliche Engagement, die Möglichkeit auf Fragen jeglicher Art schnell und unkompliziert eine Antwort bekommen zu können sowie die zahlreichen konstruktiven Anregungen empfand ich stets als große Hilfe und Bereicherung.

Für die Einführung in das Thema meiner Dissertation und die Ausräumung von sowohl fachlichen als auch technischen Unklarheiten bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. biol. hum. Newshan Behrangi.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Jiangshan Zhan bedanken, ohne dessen geduldige Einarbeitung in laborexperimentelle Methoden und Mithilfe bei der Durchführung des Tierexperimentes die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso danke ich Frau Susann Lehmann und Frau Frauke Winzer für die technische Unterstützung bei der Anfertigung von Hirnschnitten oder der Durchführung von histochemischen Färbungen im Rahmen dieser Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Anatomie für ihre andauernde Hilfsbereitschaft sowie für die herzliche Aufnahme während meiner Promotion. Besonders erwähnen möchte ich hierbei Frau Dr. rer. hum. Sarah Joost, Herrn Dr. med. Hannes Kaddatz, Frau Theresa Greiner und Frau Emily Santrau. Ich danke ihnen für die konstruktiven Diskussionen, die etlichen Korrekturen meiner Arbeit und das Aufbauen nach Rückschlägen oder bei Zweifeln.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden für deren bedingungslose und immerwährende Unterstützung.

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Sylvia Elke Frenz
Geburtsdatum: 01. September 1997
Geburtsort: Rostock
PLZ, Stadt: 18069 Rostock

Bildungsweg

08/2004 - 07/2008 Grundschule „Türmchenschule“ in Rostock
09/2008 - 06/2016 Gymnasialausbildung an der „CJD Christophorusschule“ in Rostock
06/2016 Abitur, Durchschnittsnote 1,0
seit 10/2016 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

Praxiserfahrung

02 - 03/2017 Pflegepraktikum auf der Station „Innere Medizin“ der Oberhavel Kliniken GmbH in Gransee, Teil 1
07 - 09/2017 Pflegepraktikum auf der Station „Innere Medizin“ der Oberhavel Kliniken GmbH in Gransee, Teil 2
02 - 03/2019 Famulatur auf der Station „Chirurgie“ der Oberhavel Kliniken GmbH in Gransee
05 - 10/2020 Anstellung als hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock in der Gertrudenstraße 9, 18057 Rostock
08/2020 Famulatur in der kardiologischen Gemeinschaftspraxis Dr. Eckard und Dr. Holzhausen in der Doberaner Straße 115, 18057 Rostock
09/2020 Famulatur in der allgemeinmedizinischen Praxis des MVZ „RosDOC“ GmbH in der Albrecht-Tischbein-Straße 48, 18109 Rostock, Teil 1

Lebenslauf

02/2021	Famulatur in der allgemeinmedizinischen Praxis des MVZ „RosDOC“ GmbH in der Albrecht-Tischbein-Straße 48, 18109 Rostock, Teil 2
08/2021	Famulatur in der orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock
seit 05/2023	Praktisches Jahr („PJ“)

Kenntnisse und Fähigkeiten:

Sprachkenntnisse:

Deutsch	Muttersprache
Englisch	sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift

Computerkenntnisse:

MS Office	gute Kenntnisse in Word, Excel, PowerPoint und Publisher
GIMP	Grundkenntnisse der Bildbearbeitung

Sonstiges:

Führerschein	Klasse B
--------------	----------