

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis auf
elektrische und chemische Synapsen der murinen Retina**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin*

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

Vorgelegt von: Bernadette Gaida
geb. am 15.02.1994 in Saarbrücken

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2019

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M.D. Menger

Prüfungsvorsitzender: Univ.-Prof. Dr. T. Hartmann

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. C. Meier

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. J. Rettig

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Homburg, den

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Multiple Sklerose: Prävalenz, Inzidenz und Symptome der Erkrankung	1
1.2	Die Pathogenese der MS	3
1.3	MS im optischen System	4
1.3.1	Anatomische Grundlagen des visuellen Systems	4
1.4	Die Rolle der Connexine und Pannexine bei der MS	10
1.4.1	Molekularer Aufbau der Kanalproteine	10
1.4.2	Connexine und Pannexine in der Retina	12
1.4.3	Connexine und Pannexine bei der MS	13
1.5	Zelluläre Degeneration – Ursachen der Krankheitssymptome im optischen System	15
1.5.1	T-Zell-Aktivierung und Autoantikörperbildung	16
1.5.2	Formen des Zelluntergangs im ZNS und visuellen System	17
1.5.3	Die Bystander-Hypothese	19
1.6	Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten der T-Zell-Aktivierung durch das Pharmakon Probenecid im Tiermodell	20
1.6.1	Das Pharmakon Probenecid	20
1.6.2	Tierexperimentelle Modelle der Multiplen Sklerose	21
1.6.3	Präventiver Therapieansatz mit PBN im EAE-Modell	23
2	ZIEL DER STUDIE - HYPOTHESEN	24
3	MATERIALIEN	25
3.1	Geräte und Materialien	25
3.2	Primärantikörper	27
3.3	Sekundärantikörper	27
4	METHODEN	28
4.1	Versuchstiere	28
4.2	Das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE)	28
4.2.1	Induktion der EAE	28
4.2.2	Das Therapieprotokoll mit PBN	29
4.2.3	Versuchstiergruppen	29
4.2.4	Score-Einteilung der klinischen Symptomatik	29
4.3	Organentnahme, Anfertigung der Präparate und Schnittverfahren	30
4.4	Färbungen	31
4.4.1	Immunfluoreszenz	31
4.4.2	Immunhistochemie	32
4.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
4.5	Mikroskopie und Dokumentation	34
4.6	Analyseverfahren und Datenerhebung	35
4.7	Statistik	36
5	ERGEBNISSE	37
5.1	Analyse der Effekte der EAE auf die Retina	37
5.1.1	Analyse der EAE-induzierten Symptome	37

5.1.2	Lichtmikroskopische Auswertung der H.E.-Färbung.....	39
5.1.3	Apoptose-Nachweis im Stratum ganglionare mittels CC3 (AEC-Färbung).....	40
5.1.4	Analyse des ganglionären Zellschadens mittels RBPMS-Immunfluoreszenz.....	42
5.1.5	Analyse der Cx36-Expression in der inneren plexiformen Schicht	45
5.1.6	Nachweis von Degeneration von Bestandteilen chemischer Ribbon-Synapsen der Sehsinneszellen.....	47
5.2	Analyse der Effekte der präventiven PBN-Therapie auf die Versuchstiere	49
5.2.1	Ergebnisse der erhobenen Paralyse-Grade der Tiere mit präventiver Gabe von PBN.....	49
5.2.2	Lichtmikroskopische Auswertung der H.E.-Färbung für die EAE/PBN-, EAE/Solvent und Kontrollgruppe	51
5.2.3	Reduktion apoptotischer Ganglienzellen in den Retinae der EAE/PBN-Gruppe	52
5.2.4	Ergebnisse der Auszählung intakter Ganglienzellen	54
5.2.5	Einfluss des PBN auf die Expression von Cx36	56
5.2.6	Einfluss von PBN auf den Erhalt struktureller Bestandteile der Ribbon-Synapsen.....	58
6	DISKUSSION.....	60
6.1	Pathophysiologische Veränderungen im visuellen System bei MS und unter EAE-Induktion	60
6.2	Die EAE-Induktion führt zu einer deutlichen klinischen Paralyse der Versuchstiere	61
6.3	Vergleichbarkeit der humanen mit der murinen Retina	63
6.4	Pathophysiologische Veränderungen in der Retina unter EAE-Induktion... 64	64
6.4.1	Degeneration von Bestandteilen elektrischer und chemischer Synapsen.....	66
6.4.2	Die komplexe Funktion des Connexin 36 in der Pathogenese der EAE in der Retina.....	70
6.5	Veränderungen der untersuchten retinalen Proteine bei anderen Erkrankungen.....	72
6.6	Therapeutischer Einsatz von Probenecid bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	73
6.6.1	Positiver Effekt von PBN auf die klinischen Symptome im Mausmodell.....	73
6.6.2	Reduktion der Apoptose von Ganglienzellen durch PBN	74
6.6.3	Effekte der PBN-Therapie auf das tatsächliche Ausmaß des Ganglienzellschadens.....	75
6.6.4	Verringerte Expressionsflächendichte des Cx36	78
6.6.5	PBN verhindert nicht die frühe Degeneration retinaler Synapsen-Proteine.....	78
7	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	80
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	82
9	DANKSAGUNG UND PUBLIKATIONEN.....	95

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose gehört zu den chronisch-degenerativen Erkrankungen des ZNS. Im Rahmen der neuropathologischen Krankheitsprozesse kommt es durch das patienteneigene Immunsystem zur zentralen Inflammation und Autoantikörperbildung. Folge ist eine fokale Degeneration der neuronalen Myelinscheiden an multiplen Stellen im ZNS (REALE, SANCHEZ-RAMON, 2017). In der Pathogenese der MS spielen intra- und interzelluläre Kanalproteine (Panx1 und verschiedene Connexin-Subtypen) eine bedeutende Rolle. Sie sind beispielsweise bei der Aktivierung zytotoxischer autoreaktiver T-Lymphozyten, bei der Vermittlung der Entzündungsreaktion an den Myelinscheiden und bei einer Fortleitung pro-inflammatorischer Botenstoffe in weitere Zellen beteiligt (ADAMSON, LEITINGER, 2014; MAIER et al., 2004; RIPPS, 2002; THOMPSON, 2015; WONG et al., 2014). Rund ein Drittel der Patienten mit MS entwickelt als Frühsymptom eine Neuritis des Nervus opticus, verschiedenartige Sehstörungen bis hin zum völligen Ausfall des Gesichtsfeldes unter Beteiligung der Retina (HEROLD et al., 2015; LARABEE et al., 2016; SYC et al., 2012). Die genauen Pathomechanismen dieser Mitbeteiligung des visuellen Systems sowie das Ausmaß der retinalen Läsion bei der MS sind aktuell jedoch noch nicht im Detail bekannt. Es wurde daher in dieser Arbeit in der ersten Hypothese postuliert, dass die durch die zentrale Inflammation induzierte axonale Schädigung im N. opticus die Apoptose retinaler Ganglienzellen zur Folge hat sowie sich eine Reduktion synaptischer Verbindungen innerhalb der Retina zeigt. Experimentell wurde in dieser Arbeit mit dem Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) gearbeitet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein möglicher neuroprotektiver Effekt des Pannexin1 Inhibitors Probenecid (PBN) auf die retinalen Neurone der Versuchstiere untersucht. Hypothese des zweiten Teils war, dass eine PBN-Intervention mit 100mg/kg Körpergewicht ab Tag eins nach EAE-Induktion eine Prävention der neuronalen Schädigung im Auge zur Folge hat. Es wurde angenommen, dass retinale Strukturproteine von elektrischen und chemischen Synapsen in der präventiv mit PBN behandelten Gruppe im Vergleich zur EAE-Gruppe in höherer Dichte immunologisch nachweisbar sein würden und weniger Zellen in eine EAE-induzierte Apoptose eintreten. In beiden Teilen dieser Arbeit wurde die Zahl der Ganglienzellen über den Nachweis des Ganglienzell-spezifischen Proteins RBPMS sowie der programmierte Zelltod über das Apoptose-assoziierte Protein Cleaved-Caspase-3 bestimmt. Connexin 36, das Gap junction Protein elektrischer Synapsen der Retina, sowie RIBEYE, exprimiert in den chemischen Ribbon-Synapsen der Retina, wurden analysiert, um die synaptische Verschaltung in der Retina bei EAE und unter Therapie zu untersuchen.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion der EAE im Tiermodell sowohl zu klinisch messbaren Paralysen der Versuchstiere führte als auch degenerative

Veränderungen mit signifikant verringerter Expression der untersuchten Proteine an neuronalen Zellen verschiedener Schichten der Retina stattfanden. Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich klinisch die Motorik der Versuchstiere signifikant unter präventiver PBN-Gabe verbesserte. Zudem traten unter Therapie mit PBN signifikant weniger Ganglienzellen in die Apoptose ein. Trotz PBN-Gabe kam es jedoch zum Verlust synaptischer Proteine im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammengenommen legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass nicht nur der optische Nerv und die Ganglienzellen im Rahmen des Krankheitsgeschehens der MS degenerieren, sondern auch synaptische Bestandteile weiterer retinaler Schichten geschädigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass präventiv verabreichtes PBN einen protektiven Effekt auf die Versuchstiere mit einem besseren motorischen Ergebnis unter EAE und einem geringeren Ganglienzellschaden im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe hat, es aber dennoch zur verringerten Expression synaptischer Proteine kommt.

Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS). In the process of the neuropathological genesis of this disease, the patient's own immune system initiates a central inflammation and generates autoantibodies, causing focal degeneration of neuronal myelin sheaths in multiple areas within the CNS (REALE, SANCHEZ-RAMON, 2017). The pathogenesis of MS is based mainly on intra- and intercellular protein channels (Panx1 and multiple subtypes of connexin-channels). These channels e.g. play an important role in the activation of cytotoxic T-lymphocytes, in passing of inflammatory reactions at the myeline sheath and for the transport of pro-inflammatory substances to bystanding cells (ADAMSON, LEITINGER, 2014; MAIER et al., 2004; RIPPS, 2002; THOMPSON, 2015; WONG et al., 2014). Approximately one third of MS-patients develop as initial symptom a neuromyelitis optica, i.e. a wide range of visual disorders up to a complete failure of the visual perceptive field including damage of the retina (HEROLD et al., 2015; LARABEE et al., 2016; SYC et al., 2012). It is still not certain how those pathomechanisms involving the visual system precisely work and the extent of retinal lesions are currently still unknown. Therefore, the first hypothesis of this thesis postulates that axonal damage of the optical nerve, caused by central inflammation, results in an apoptosis of retinal ganglion cells as well as in a reduction of retinal synaptic structures of multiple retinal layers. The research work for this thesis is based on the animal experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model.

The second part of this thesis deals with research examining a potential neuro-protective effect of Panx1 inhibitor PBN on retinal neurons of laboratory mice. This part is based on a hypothesis saying that a PBN intervention of 100mg/kg body weight injected at day one after an EAE induction can prevent neuronal damage in the animal's eye. It was assumed that an immunological staining would prove a higher density of structural retinal molecules of electrical and chemical synapses within a preventively treated PBN group, when compared with EAE-groups, and that a smaller number of cells would enter an EAE-induced apoptosis. In both parts of this thesis retinal ganglion cells were counted using the ganglion cell specific protein RBPMS. Apoptosis was analyzed using the apoptosis associated protein cleaved caspase-3. In order to examine retinal synaptic connections under EAE and under preventive treatment, connexin 36, the gap junction protein of retinal electric synapses, as well as RIBEYE, expressed in retinal chemical ribbon synapses, were analyzed.

In the first part of this thesis it could be demonstrated that an induction of EAE in an animal model leads to detectable paralyses of the animals as well as to degenerations with a significantly decreased expression of analyzed proteins in multiple layers of the retina. The second part of this thesis could prove that motoric results of animals preventively treated with

PBN increased significantly. Furthermore, under PBN-treatment a significant number of retinal ganglion cells were prevented from entering apoptosis. But yet, despite PBN treatment, synaptic proteins decreased in expression in comparison with the control group.

To sum up the results of this thesis, it may be presumed that during the pathogenesis of MS, lesions are not limited to the optic nerve and the retinal ganglion cells but degeneration also takes place in multiple retinal synaptic components. Additionally, it could be demonstrated that preventively applicated PBN has a neuro-protective effect on laboratory mice with a better motoric outcome under EAE induction, in comparison with groups without treatment. But still, depletion of expressed retinal synaptic proteins could not be prevented by this treatment.

Abkürzungen

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderalbumin)
Ca ²⁺	Calcium
CC3	Cleaved Caspase-3
CD	Cluster of Differentiation
Cx36	Connexin 36
DAPI	Diamidinphenylindol
H ₂ O dest	destilliertes Wasser
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
kD	kilo Dalton (Atomare Maßeinheit)
ml	Milliliter
M	Molar
Na ⁺	Natrium
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid
NGS	Normal Goat Serum (normales Ziegenserum)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Panx1	Pannexin 1
PBN	Probenecid
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBPMs	RNA-binding protein with multiple splicing
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der synaptischen Verschaltung in den Schichten der Retina	5
Abb. 2: Schematischer Aufbau der synaptischen „Ribbons“ mit den RIBEYE-Strukturen	7
Abb. 3: Schematischer Aufbau der synaptischen Verschaltung in der Retina	8
Abb. 4: Schematischer Aufbau der chemischen Ribbon Synapsen in der Retina	9
Abb. 5: Struktureller Aufbau der Connexine und Pannexine	11
Abb. 6: 6µm Schnitt durch den Bulbus in H.E.-Färbung.....	34
Abb. 7: Zeitlicher Kurvenverlauf der Score-Werte der Tiere der Gruppen EAE und Kontrolle	38
Abb. 8: Zeitlicher Kurvenverlauf der Score-Werte der Tiere der Gruppen EAE/Sc2 und Kontrolle	38
Abb. 9: Ausschnitt der Retina in H.E.-Färbung	40
Abb. 10: CC3 Immunhistochemie an Retinaschnitten	41
Abb. 11: CC3-immunpositive Zellen pro Retinaschnitt der Tiere der Gruppen EAE, EAE/Sc2 und Kontrolle.....	42
Abb. 12: Retinae der drei Versuchstiergruppen EAE, EAE/Sc2 und Kontrolle	43
Abb. 13: Anzahl RBPMS-immunpositiver Zellen pro Retinaschnitt.....	44
Abb. 14: Fluoreszenzbilder und in ImageJ ausgewertete Bilder der Cx36-Immunfluoreszenz	45
Abb. 15: Cx36-immunpositive Fläche pro Retinaanschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/Sc2 und EAE.....	46
Abb. 16: Fluoreszenzbilder und in ImageJ ausgewertete Bilder der RIBEYE-Immunfluoreszenzfärbung	47
Abb. 17: RIBEYE-immunpositive Fläche pro Retina Anschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/Sc2 und EAE	48
Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Score-Werte der Tiere der Gruppen EAE/Solvent, EAE/PBN und Kontrolle.....	50
Abb. 19: Ausschnitte der Retina in H.E.-Färbung.....	52
Abb. 20: CC3 Immunhistochemie an Retinaschnitten	53
Abb. 21: CC3-immunpositiven Zellen pro Retinaschnitt der Tiere der Gruppen EAE und Kontrolle, EAE/PBN und EAE/Solvent	54
Abb. 22: RBPMS-Immunfluoreszenz im Stratum ganglionare der Retinae	55
Abb. 23: RBPMS-immunpositive Ganglienzellen pro Retinaschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/PBN und EAE/Solvent	55
Abb. 24: Originalfluoreszenzbilder und in ImageJ ausgewertete Bilder der Cx36 Immunfluoreszenz ..	56
Abb. 25: Cx36-immunpositive Fläche pro Retinaanschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/PBN und EAE/Solvent.....	57
Abb. 26: Originalfluoreszenzbilder und in ImageJ ausgewertete Bilder der RIBEYE-Immunfluoreszenzfärbung.....	58
Abb. 27: RIBEYE-immunpositive Fläche pro Retina Anschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/PBN und EAE/Solvent	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	25
Tabelle 2: Lösungen/Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 3: Primärantikörper.....	27
Tabelle 4: Sekundärantikörper.....	27

1 Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose: Prävalenz, Inzidenz und Symptome der Erkrankung

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch-degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), welche heute noch nicht kausal therapierbar ist. Die Erkrankung wird auch als Encephalomyelitis disseminata bezeichnet, also als eine über verschiedene Regionen des ZNS verteilte Entzündung. Sie geht sowohl mit der Immigration peripherer autoreaktiver Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS, als auch mit einer Entzündungsreaktion durch aktivierte zentrale Mikroglia und einer fokalen Demyelinisierung einher (COMPSTON, COLES, 2008; DE LAERE et al., 2018; KAMINSKA et al., 2017).

Die Prävalenz der Erkrankung in Deutschland wird im Jahr 2017 auf 100.000 bis 200.000 geschätzt (SCHMEDT et al., 2017). Durch das Bundesversicherungsamt der Bundesrepublik Deutschland wird sie mit über 200.000 Erkrankten angegeben. Dabei liegt die gegenwärtige Inzidenz bei insgesamt 3,5-6,6 Erstdiagnosen pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland (SCHMEDT et al., 2017; Sondergutachten des Bundesversicherungsamtes (BVA) 2017). Mit diesen Zahlen liegt Deutschland im europäischen Mittel. Europaweit erkrankten durchschnittlich 4,5 von 100.000 Einwohnern pro Jahr (PUGLIATTI et al., 2006). Eine Metaanalyse globaler Daten von Koch-Henriksen und Sørensen zu Multiple Sklerose-Patienten, im Jahr 2010 im Fachjournal Lancet publiziert, zeigte weltweit eine steigende Inzidenz der Erkrankung, die bis heute anhält (KOCH-HENRIKSEN, SORENSEN, 2010). In nordeuropäischen Ländern sind Frauen deutlich häufiger betroffen als Männer, etwa im Verhältnis sieben zu eins (KOCH-HENRIKSEN, SORENSEN, 2010; PUGLIATTI et al., 2006).

Resultat der neuropathologischen Krankheitsprozesse ist eine fokale Degeneration der neuronalen Myelinscheiden an multiplen Stellen im ZNS. Daher der Name der Erkrankung Multiple Sklerose (MS). Das patienteneigene Immunsystem scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zu spielen, so dass die MS heute zu den Autoimmunerkrankungen gezählt wird (REALE, SANCHEZ-RAMON, 2017).

Durch diese zentrale Demyelinisierung und Sklerosierung können die Patienten eine Vielzahl verschiedener neurologischer Symptome entwickeln (ROSIK, ZAGOZDZON, 2017). Hierzu zählen Seh- und Sprachstörungen, Sensibilitätsverlust und Paralysen der Extremitäten bis hin zu schweren Tetraplegien und Spastiken (AL-SHARMAN et al., 2018; POGORZELSKI et al., 2004). Des Weiteren leidet ein hoher Anteil der Patienten im Krankheitsverlauf unter kognitivem Leistungsverlust (COTTER et al., 2018; DACKOVIC et al., 2016; RUET, BROCHET, 2018). Dieser führt unter anderem zu eingeschränkten verbalen und

nonverbalen Gedächtnisleistungen und Reaktionszeiten bis hin zu veränderten Persönlichkeitsmerkmalen der Patienten (COTTER et al., 2018; ROY et al., 2018).

Es gibt verschiedene Subtypen der MS mit unterschiedlicher Symptomausprägung und verschiedenen Verläufen (REESE et al., 2013). Der individuelle Krankheitsverlauf bei MS-Patienten ist sehr variabel. Allen gemeinsam ist eine organische Dysfunktion des ZNS, die zu den sensomotorischen oder kognitiven Beeinträchtigungen der betroffenen Patienten führt. Prinzipiell unterscheidet man zwischen einer durch akute Schübe geprägten Verlaufsform (schubweise remittierend und progredient) und einer chronisch progredienten (primär chronisch und sekundär chronisch) Verlaufsform (PUGLIATTI et al., 2006; REESE et al., 2013).

Die aktuelle Pharmakotherapie zielt in erster Linie auf eine Symptomkontrolle der Patienten ab. Die Behandlung richtet sich dabei mit einer immunmodulatorischen beziehungsweise immunsuppressiven Wirkung nach dem Krankheitsstadium und -verlauf der Patienten (CROSS, NAISMITH, 2014; GARCIA-RUIZ et al., 2017). Entsprechend unterscheidet man eine sogenannte Schubtherapie, die bei Patienten mit einem akut diagnostizierten Schub zum Einsatz kommt, von einer verlaufsmodifizierenden Basistherapie (DIAZ, 2017). Zur Therapie akuter inflammatorischer Schübe werden immunsuppressiv wirkende Medikamente wie verschiedene Glukokortikoide und Plasmaphereseverfahren eingesetzt (GOODIN, 2014; KIESEIER et al., 2003). Eine kausale Therapie der Schübe gibt es bisher noch nicht.

Zur Basistherapie, welche zur längerfristigen Suppression der Krankheitsaktivität und Symptome eingesetzt wird, zählen immunsuppressiv wirksame Interferone vom Beta-Typ, z.B. werden Interferon-beta-1a und -1b eingesetzt. Dimethylfumarat, Glatirameracetat, Teriflunomid, Mitoxantron und weitere Pharmaka kommen vor allem bei mildem bis moderatem Krankheitsverlauf zum Einsatz (TROJANO, AMATO, 2018). Des Weiteren kommt bei unzureichender Wirkung dieser Basistherapeutika eine sogenannte intensivierete Immuntherapie, auch als Eskalationstherapie bezeichnet, in Betracht. Hier werden z.B. spezifische monoklonale Antikörper, die u.a. gegen verschiedene pro-inflammatorische Faktoren gerichtet sind, eingesetzt (MONTALBAN et al., 2018). Zu diesen Ziel-Antigenen zählen Integrine sowie Rezeptormoleküle immunologisch aktiver Zellen, z.B. die Proteine „Cluster of differentiation“ (CD) 52 und CD20 (CROSS, NAISMITH, 2014). CD20 ist ein spezifisches B-Lymphozyten Oberflächenprotein, so dass der entsprechende monoklonale Antikörper gegen diese im Körper zirkulierende Zellpopulation gerichtet ist (ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH et al., 2018). Das Oberflächenantigen CD52 hingegen wird von einer kleinen Gruppe von Leukozyten in Lymphknoten und der Milz exprimiert, so dass der monoklonale Antikörper entsprechend lokal wirkt. Ein derzeit gängiges Pharmakon ist Natalizumab (ein Integrin-Inhibitor), wobei die Entwicklung neuer Substanzen sehr schnell voranschreitet (COHAN et al., 2018; KODA et al., 2018; SHIRANI, STUVE, 2018). Aktuell

werden viele verschiedene experimentelle Therapieansätze mit unterschiedlichen molekularen Angriffspunkten in der Pathogenese der MS experimentell und klinisch erforscht (GAJOFATTO, TURATTI, 2018; HAINZ et al., 2016).

1.2 Die Pathogenese der MS

In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass besonders eine Untergruppe des zellulären Immunsystems, und zwar die so genannten T-Helferzellen, eine Subpopulation der T-Lymphozyten, durch ihre Aktivierung die immunologische Krankheitskomponente verursacht (DUFFY et al., 2014; HAMMER et al., 2017). Dies geschieht, indem sie autoreaktiv gegen körpereigene zelluläre Strukturen gerichtet sind (DANIKOWSKI et al., 2017). Im Fall der MS besitzen diese autoreaktiven T-Lymphozyten die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und eine Immunreaktion mit Proteinen der Myelinscheiden auszulösen (DANIKOWSKI et al., 2017; LI et al., 2017a; SPENCER et al., 2018). Es kommt zu einer T-Zell-Invasion ins ZNS mit anschließender Entzündung. Betroffen sind zunächst die myelinisierenden Zellen (LUCCHINETTI et al., 2000) der zentralen Makroglia, also die Oligodendrozyten, welche eine physiologische Isolationsschicht um die Fortsätze der Nervenzellen, die Neuriten, bilden (LARABEE et al., 2016). Die autoimmune Entzündungsreaktion wirkt direkt schädigend auf Strukturen der Myelinscheiden. Des Weiteren sind autoimmune B-Zell-Subpopulationen aus dem ZNS (WEKERLE, 2017) an der Entzündungsreaktion beteiligt, indem sie mit den T-Zellen interagieren und Autoantikörper gegen Zellbestandteile glialer und neuronaler Zellen bilden (KRUMBHOLZ et al., 2012). Diese Autoantikörper verursachen im Zusammenspiel mit dem Komplementsystem ebenfalls zentrale Entzündungsherde mit Läsionen der Gliazellen (LUCCHINETTI et al., 2000). Mit fortschreitender Degeneration der Gliazellen werden die Neurone selbst geschädigt und unterliegen ebenfalls degenerativen Veränderungen. Sie treten in die Apoptose ein, den programmierten Zelltod, und die so entstandenen Lücken im Neuropil werden durch astrogliales Narbengewebe ersetzt (KASSUBEK et al., 2017; YATES et al., 2017). Es bilden sich verschiedene Entzündungsherde, welche teilweise unter Bildung einer Glianarbe abheilen. Neben der durch die Autoantikörper vermittelten Reaktion kommt es auch zur Aktivierung zentraler Mikroglia, also der zerebralen Immunzellen, sowie der Astrozyten, resultierend in weiterer Inflammation und Astrogliose (SOFRONIEW, VINTERS, 2010). Infolgedessen gehen immer mehr Neuronen zugrunde und fallen für die zentrale Reizweiterleitung und -verarbeitung aus. Diese fokale Demyelinisierung der neuronalen Axone und Dendriten führt zu einer unzureichenden Innervation der Zielorgane, was zu den für die Erkrankung charakteristischen neurologischen und psychologischen Symptomen führt (HELDNER et al., 2017; PATTI, VILA, 2014; SEHLE et al., 2011).

1.3 MS im optischen System

Rund ein Drittel der Patienten mit MS entwickelt als Frühsymptome Beeinträchtigungen des visuellen Systems, welche von verschiedenartigen Sehstörungen bis hin zum völligen Ausfall des Gesichtsfeldes mit Optikusneuritis (Entzündung des Nervus opticus) reichen können (BEHBEHANI et al., 2018; BRITZE et al., 2017; HEROLD et al., 2015; LARABEE et al., 2016; SARTORETTI et al., 2017). Im Rahmen dieser Arbeit interessieren primär die degenerative Zellschädigung im optischen System sowie präklinische Ansätze zur pharmakologischen Intervention (LARABEE et al., 2016; SYC et al., 2012).

Wie entsteht die zelluläre Degeneration im visuellen System, die unter anderem zu den genannten Frühsymptomen der MS führt?

1.3.1 Anatomische Grundlagen des visuellen Systems

Die Axone des Nervus opticus entstammen den Ganglienzellen im Stratum ganglionare der Retina. Innerhalb der Retina sind die Fasern unmyelinisiert; sie werden ab der Papille des Nervus opticus nach Durchtritt durch die Lamina cribrosa sclerae von Oligodendrozyten ummantelt (PERRY, LUND, 1990). Somit entspricht der optische Nerv einem axonalen Trakt zerebraler Neurone. Der Nerv ist speziell somatosensibel (somatoafferent).

Der zelluläre Aufbau der murinen und humanen Retina unterscheidet sich teilweise. Ein wichtiger Unterschied zwischen der murinen und humanen Retina ist die Anzahl an Subtypen der Zapfen, welche das polychromatische (Farb-) Sehen ermöglichen (PEICHL, GONZALEZ-SORIANO, 1994). Die synaptische Verschaltung zwischen den verschiedenen Schichten ist ansatzweise histologisch vergleichbar derer der humanen Retina; besonders die Synapsensubtypen sind die gleichen, weshalb die hier beschriebenen Merkmale der Retina sowohl als Grundlage dieser Arbeit dienen als auch auf den Menschen übertragen werden können (KOVACS-OLLER et al., 2017; SOHL et al., 2000)

Als phylogenetischer Teil des ZNS weist die Retina einen zehnschichtigen Bau auf (HOON et al., 2014). Neun dieser zehn Schichten bilden das Stratum nervosum, also den Teil der Retina, welcher das Licht detektiert, in ein elektrisches Potential (Sensorpotential) transduziert (Fototransduktion) und anschließend in eine elektrische Erregung transformiert. Die zehnte und äußerste retinale Schicht besteht aus dem einschichtigen Pigmentepithel (Stratum pigmentosum) und dient der Absorption der Lichtstrahlen. Nach Durchtritt durch die übrigen Retinaschichten können die vor dem Pigmentepithel gelegenen äußeren Segmente der Sehsinneszellen (Stratum segmentorum internum und externum, Stratum limitans externum und Stratum nucleare externum) die Photonen des Lichtes detektieren und transduzieren, also in ein neuronales Potential umwandeln. Die Erregungsweiterleitung durch Aktionspotentiale (Transformation) erfolgt über die weiteren Schichten des Stratum

nervosum, den sich daraus bildenden optischen Nerv und die Sehbahn zu zentralen Sehzentren (GROSSNIKLAUS et al., 2015; HOON et al., 2014).

Unter vereinfachten funktionellen Aspekten gliedert sich der Verschaltungsweg innerhalb der Retina in drei Neurone: Das erste Neuron sind die Fotorezeptoren, also Stäbchen und Zapfen. Das zweite Neuron sind die bipolaren Zellen, und das dritte die Ganglienzellen im Stratum ganglionare (MASLAND, 2001). Die Axone der Ganglienzellen bilden schließlich den optischen Nerv. Die Zellkerne der Fotorezeptoren (1. Neuron) liegen in der äußeren Körnerschicht (Stratum nucleare externum) der Retina. Sie stehen über chemische Synapsen, u.a. über sog. Ribbon Synapsen (von Engl. Ribbon = Band) in der äußeren plexiformen Schicht (Stratum plexiforme externum) mit den bipolaren Zellen (2. Neuron) in Kontakt. Die Zellkerne der bipolaren Zellen liegen wiederum in der inneren Körnerschicht (Stratum nucleare internum). Die Neuriten der bipolaren Zellen stehen in der inneren plexiformen Schicht (Stratum plexiforme internum) in synaptischer Verbindung mit den Ganglienzellen (3. Neuron) des Stratum ganglionare (PEICHL, GONZALEZ-SORIANO, 1994). Zur Veranschaulichung des mikroanatomischen Aufbaus der Retina diene hier Abbildung 1.

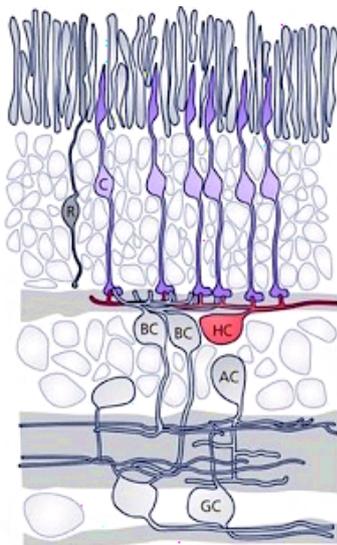


Abb. 1: Schematischer Aufbau der synaptischen Verschaltung in den Schichten der Retina

Gezeigt ist der vereinfachte Verschaltungsweg der für den Sehsinn elementaren Neurone innerhalb der Retina: Der obere Bildanteil zeigt die äußere, der untere die innere Retina. Das erste Neuron entspricht den Fotorezeptoren (Str. segmentorum int und ext, Stratum limitans externum und Stratum nucleare externum), hier in lila (C für engl. Cone = Zapfen) und schwarz (R für engl. Rod = Stäbchen) dargestellt. Das zweite Neuron sind die bipolaren Zellen (grau), deren Perikarya (BC) im Stratum nucleare internum liegen, und das dritte die Ganglienzellen (grau) mit ihren Perikarya (GC) im Stratum ganglionare. Des Weiteren ist die synaptische Verschaltung der Horizontalzellen (rot, HC) mit den Fotorezeptoren und den bipolaren Zellen im Stratum plexiforme externum zu sehen. Ebenfalls gezeigt wird die synaptische Verschaltung der amakrinen Zellen (grau, AC) mit den Ganglienzellen und bipolaren Zellen im Stratum plexiforme internum.

Bildquelle: (CHAPOT et al., 2017) Lizenznummer: 457422065146

Von Bedeutung für die Weiterleitung der Erregung ist die interzelluläre Kommunikation über Synapsen neuronaler Zellen zweier Schichten, zum einen der oben beschriebenen inneren plexiformen Schicht (multipolare und bipolare Ganglienzellen), zum anderen der äußeren plexiformen Schicht (Fotorezeptoren und bipolare Neurone). Zusätzlich wird die Erregungsweiterleitung durch amakrine Zellen und Horizontalzellen moduliert, deren Perikaryen beide in der inneren nukleären Schicht lokalisiert sind, und die ihre synaptischen Verbindungen in der äußeren plexiformen Schicht (Horizontalzellen) bzw. der inneren plexiformen Schicht (amakrine Zellen) ausbilden.

Die Retina verfügt über verschiedene Synapsensubtypen. Eine grobe Einteilung kann in chemische und elektrische Synapsen erfolgen. Zu ersteren werden auch die bereits erwähnten Ribbon-Synapsen zwischen bipolaren Zellen und Fotorezeptoren gezählt (STERLING, MATTHEWS, 2005; TOM DIECK, BRANDSTATTER, 2006). Zwischen erstem, zweitem und drittem Neuron findet sich jeweils eine synaptische Verschaltung mit glutamatergen chemischen Ribbon-Synapsen, welche die Reizweiterleitung zur inneren Retina innerhalb weniger Millisekunden ermöglichen, sowie Dyaden (synaptische Verbindung aus Präsynapsen der Bipolarzellen mit den Dendriten der amakrinen und Ganglienzellen) und konventionelle chemische Synapsen (KUO et al., 2016; STERLING, MATTHEWS, 2005; VON GERSDORFF et al., 1998). Ribbon Synapsen besitzen ein synaptisches Endknöpfchen, welches präterminal eine Vielzahl von Ribbon-Strukturen mit Neurovesikeln besitzt (SCHMITZ et al., 2000). Die Bandstrukturen der Ribbon Synapsen sind in der Plasmamembran der Präsynapse des synaptischen Endknöpfchens nahe des synaptischen Spalts verankert. Sie ragen ähnlich wie ein Band ins Zytoplasma des Endknöpfchens und bilden hier viele Bindungsstellen für Neurovesikel, welche über feine Filamente binden und schnell wieder freigesetzt werden können (STERLING, MATTHEWS, 2005). Diese Bandstrukturen werden aus vielen sog. RIBEYE-Makromolekülen aufgebaut (SCHMITZ et al., 2000). Ein RIBEYE-Makromolekül wird aus zwei Proteinuntereinheiten gebildet: der A-Domäne, welche das Zentrum des Ribbons stabilisiert, und der B-Domäne, welche fast identisch mit dem Transkriptions-Corepressor „C-terminal binding protein 2“ (CtBP2) ist, und sowohl NAD(H) als auch Synaptische Vesikel (SV) binden kann und hierdurch die SVs in wenigen Millisekunden gezielt zur Plasmamembran befördert (MAGUPALLI et al., 2008; SCHMITZ et al., 2000; SCHWARZ, SCHMITZ, 2017). Zwei RIBEYE-Makromoleküle wiederum setzen sich zu Dimeren zusammen, welche das Grundbauelement des Ribbons bilden (siehe Abb. 2).

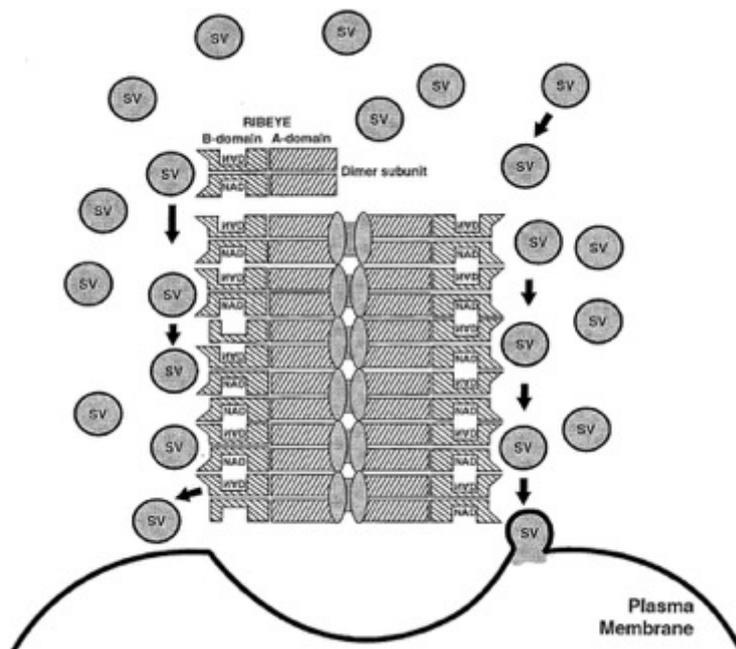


Abb. 2: Schematischer Aufbau der synaptischen „Ribbons“ mit den RIBEYE-Strukturen

Graphisch vereinfacht gezeigt ist der Aufbau der chemischen Synapse mit den „Ribbon“-Elementen. Dargestellt ist ein Ausschnitt des synaptischen Endknopfs mit der präsynaptischen Membran, einer Ribbon Struktur und synaptischen Neurovesikeln (SV). Der Ribbon-Komplex setzt sich aus Dimeren der RIBEYE Proteine zusammen. Ein jedes RIBEYE Protein wird durch zwei Domänen gebildet: die A-Domäne (Engl. A-domain) und die B-Domäne (Engl. B-domain), welche NAD und die Vesikel binden. An der Membran der Präsynapse ist ein fusionierendes Vesikel gezeigt, welches Neurotransmitter (grauer Vesikelinhalt) in den synaptischen Spalt freisetzt.

Bildquelle: (SCHMITZ et al., 2000) Lizenznummer: 4574220313691

Dieser Mechanismus des gezielten Transportes der SVs zur Plasmamembran ist für die schnelle Exozytose der Neurotransmitter an diesem Synapsentyp mitverantwortlich.

Der Neurotransmitter Glutamat wird Ca^{2+} -abhängig aus synaptischen Vesikeln der Fotorezeptoren und bipolaren Zellen ausgeschüttet (VON GERSDORFF et al., 1998). Die verschiedenen Subtypen der bipolaren Zellen können einem ON- und einem Off-Typ zugeordnet werden (DHANDE et al., 2018). Über die Subtypen der Ganglien- und amakrinen Zellen findet zudem bereits in der Retina eine Modulation der Reizweiterleitung statt (ICHINOSE et al., 2014; KEELEY, REESE, 2010). Auch Ganglienzellen können in ON- und Off-Typen unterteilt werden (DHANDE et al., 2018). Über chemische Synapsen werden zudem viele Fotorezeptoren und Bipolarzellen auf wenige retinale Ganglienzellen gebündelt (zelluläre Konvergenz) (siehe Abb. 3 und 4). Durch die Bündelung vieler Fotorezeptoren auf wenige nachgeschaltete Ganglienzellen entstehen sogenannte rezeptive Felder (ASARI, MEISTER, 2014). Bei dieser Konvergenz mehrerer Zellen auf eine Ganglionzelle sind auch elektrische Synapsen beteiligt. Sie bilden interzelluläre Verbindungen zwischen benachbarten Zellen einer Schicht aus, quasi als lateraler Verschaltungsweg (siehe Abb. 3

und 4). Durch elektrische Synapsen können Potentialänderungen einer Zelle direkt durch Ionenfluss auf die Nachbarzelle weitergeleitet werden (elektrische Transmission) und Zellgruppen in ihrer elektrischen Aktivität synchronisiert werden (CONNORS, LONG, 2004). Diese Synchronisation ermöglicht neben der Konvergenz vieler retinaler Zellen auf eine Ganglionzelle (KUO et al., 2016) auch eine sogenannte Rauschunterdrückung bei schwachen Lichtreizen.

Eine besondere Rolle bei der Reizweiterleitung über elektrische Synapsen sowie der inter- und intrazellulären Kommunikation der Zellen einer Schicht, spielen sogenannte Connexine (siehe Kapitel 1.4.1) (ROY et al., 2017; SCHWARZ et al., 1992; VEENSTRA, 1996).

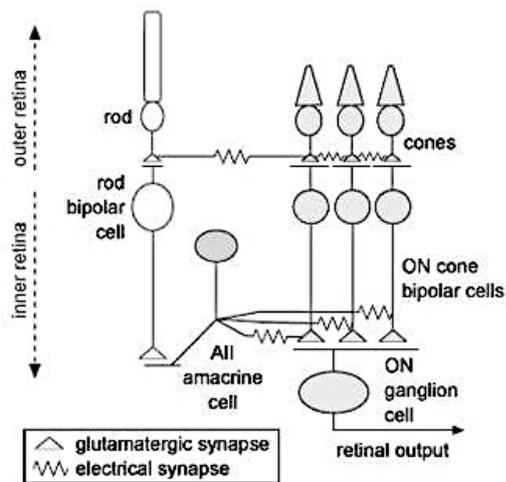


Abb. 3: Schematischer Aufbau der synaptischen Verschaltung in der Retina

Stark vereinfacht gezeigt ist der synaptische Verschaltungsweg in der inneren (Engl. inner) und äußeren (Engl. outer) Retina. Die chemischen glutamatergen Ribbon Synapsen der Fotorezeptoren (Engl. rod = Stäbchen, Engl. cones = Zapfen) werden durch das kleine Dreieck (\triangle) symbolisiert. Die chemischen Synapsen stehen in Kontakt mit den Dendriten der ON-Zapfen-bipolaren-Zellen (Engl. ON cone bipolar cells) und den Stäbchen-bipolar-Zellen (Engl. rod bipolar cell). Die Stäbchen-bipolaren Zellen stehen durch glutamaterge Synapsen über amakrine Zellen des All-Typs in Kontakt mit ON-Ganglienzellen (Engl. ON ganglion cells), deren Axone die Fasern des optischen Nervs bilden und die Reizweiterleitung zu höheren visuellen Zentren bewirken (Engl. retinal output). Mehrere ON-Zapfen-bipolare Zellen werden durch glutamaterge chemische Synapsen auf eine ON-Ganglionzelle konvergiert. Ebenfalls dargestellt durch eine gezackte Linie ($\sim\sim\sim$) sind die Verschaltungen durch elektrische Synapsen zwischen den Zellen einer Schicht: In der äußeren Retina zwischen den verschiedenen Fotorezeptoren und in der inneren Retina zwischen amakrinen und bipolaren Zellen. Die elektrischen Synapsen ermöglichen u.a. die Synchronisation der konvergierenden Zellen.

Bildquelle: (KUO et al., 2016).Lizenznummer: 4490230239961

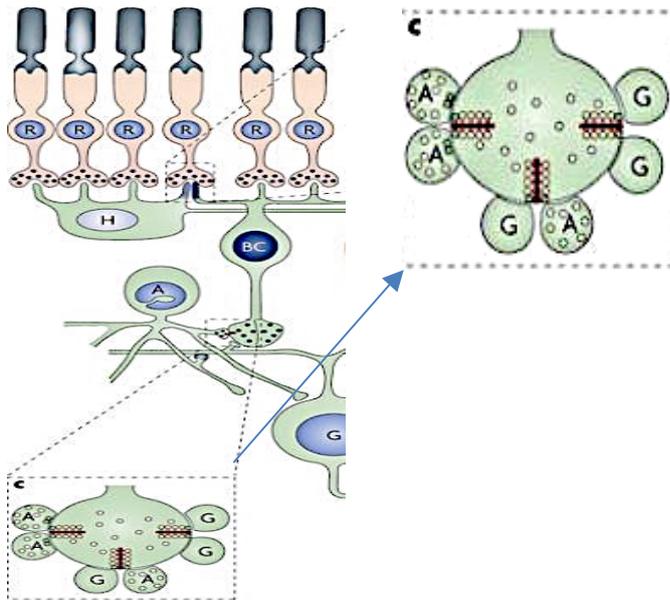


Abb. 4: Schematischer Aufbau der chemischen Ribbon Synapsen in der Retina

Stark vereinfacht gezeigt ist der synaptische Verschaltungsweg der chemischen Ribbon Synapsen in der Retina. Als schwarze Punkte dargestellt sind die synaptischen Vesikel in den rosafarbenen synaptischen Endknöpfchen der Stäbchen (R für Engl. rod = Stäbchen) und hellgrünen bipolaren Zellen (BC für Engl. bipolar cell). Ebenfalls in hellgrün dargestellt ist eine Horizontalzelle (H) und eine amakrine Zelle (A) sowie eine Ganglionzelle (G), jeweils mit blauem Zellkern. Abbildung C zeigt eine Ausschnittsvergrößerung eines synaptischen Endknöpfchens einer bipolaren Zelle, welches in synaptischem Kontakt mit Amakrinen (A) und Ganglienzellen (G) steht. Als kleine Kreise zu erkennen sind die Neurovesikel. Als kleine rote Bänder in der präsynaptischen Membran sind die Ribbon Strukturen zu erkennen. An ihnen sind viele Neurovesikel gebunden. Hierdurch wird die schnelle Exozytose vieler Vesikel und somit die schnelle Reizweiterleitung in die nachgeschaltete Zelle ermöglicht.

Bildquelle: (MATTHEWS, FUCHS, 2010).Lizenznummer: 4490240268608

1.4 Die Rolle der Connexine und Pannexine bei der MS

1.4.1 Molekularer Aufbau der Kanalproteine

Der molekulare Aufbau der Kanäle, die auch in der Retina die elektrischen Synapsen bilden, ist entscheidend für ihre Hauptfunktion als Verbindungsweg zwischen Extra- und Intrazellularraum (PANCHIN et al., 2000; WILLEBRORDS et al., 2017). Connexine (Cx) sind die Proteineinheiten dieser interzellulären Kanäle, der Gap junctions. Sechs zusammengelagerte Connexinproteine in einer Zellmembran bilden ein Connexon, das auch als Hemikanal bezeichnet wird (BEYER, BERTHOUD, 2018b). Der Begriff Hemikanal erklärt sich dadurch, dass ein Connexon erst in Verbindung mit einem weiteren Connexon einer benachbarten Zelle eine Gap junction-Verbindung, also den interzellulären Kanal, ausbildet. Über die Gap junctions können benachbarte Zellen verschiedene Ionen und Moleküle mit bis zu 1kD Molekulargewicht, z.B. Ca^{2+} , austauschen (BOND, NAUS, 2014; DECROCK et al., 2015).

Es gibt eine Vielzahl von Subtypen der Connexine, die generell nach ihrem Molekulargewicht bezeichnet werden. Eine weitere Nomenklatur (GJ System) gruppiert die Connexine nach den kodierenden homologen Sequenzen ihrer Untereinheiten (OSHIMA, 2014). Die Connexin-Subtypen weisen eine zelltypspezifische Verteilung auf und sind in fast allen Zellen des Organismus zu finden. Sie bilden sowohl interzelluläre als auch intrazelluläre Kanäle aus. Oligodendrozyten im ZNS weisen beispielsweise eine hohe Expression der Connexine Cx47, Cx32 und Cx29 auf, während in Astrozyten die Connexin-Proteine Cx43, Cx30 und Cx26 exprimiert werden (MEUNIER et al., 2017; YI et al., 2017).

Neben den Connexinen gehören auch Pannexine sowie Innexine der Gruppe der Gap junction-Proteine an. Während Innexine nur in Intervertebraten exprimiert werden, finden sich bei Vertebraten sowohl Connexine als auch Pannexine. Alle drei genannten Proteine zeigen deutliche strukturelle Homologien, wodurch sich auch ihre Funktionen stark ähneln (PANCHIN et al., 2000; WILLEBRORDS et al., 2017). Pannexine hingegen weisen neben vielen strukturellen Ähnlichkeiten auch Unterschiede zu den Connexinen und Innexinen auf (BEYER, BERTHOUD, 2018b). Beispielsweise besitzen die Proteine der Pannexine andere Aminosäure-Sequenzen als die Connexine (BEYER, BERTHOUD, 2018b). In höheren Vertebraten sind bisher drei Subtypen der Pannexine bekannt, die als Panx1, Panx2 und Panx3 bezeichnet wurden (BOND, NAUS, 2014; PENUELA et al., 2014a). Diese Subtypen kommen in unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen vor. Eine hohe Panx1-Expression wurde beispielsweise in Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen, Endothelzellen und T-Lymphozyten gezeigt (BRUZZONE et al., 2003; BUNSE et al., 2005; WILLEBRORDS et al., 2017; WILLECKE et al., 2002). Wie bei den Connexinen lagern sich auch bei Panx1 sechs

Proteine zu einem Kanal zusammen. Während die Connexone sowohl als Hemikanal als auch als interzellulärer Kanal fungieren, wurden für die Pannexin-Kanäle weder physiologisch noch ultrastrukturell interzelluläre Verbindungen gezeigt. Die Connexin- bzw. Pannexin-Proteine enthalten vier Transmembrandomänen (DAHL, MULLER, 2014; VALDEBENITO et al., 2018). Diese Domänen werden durch Proteinanteile verbunden, die aufgrund ihrer Lassoform als „Loops“ bezeichnet werden. Da der N- und der C-Terminus des Proteins intrazellulär liegen, besitzen Connexine und Pannexine zwei extrazelluläre (ELs) und einen intrazellulären Loop (IL) (DECROCK et al., 2015). Die extrazellulären Loops (EL1 und 2) vermitteln die extrazelluläre Bindung von verschiedenen Substanzen an den Kanal, und bei den Connexinen auch die Bindung zum Connexin der benachbarten Zelle. Ein struktureller Unterschied zwischen Connexinen und Pannexinen besteht unter anderem darin, dass der zweite EL der Pannexine glykosyliert ist, die der Connexine hingegen nicht (BENNETT et al., 2012; DECROCK et al., 2015) (siehe Abb.5). Decrock et al. und weitere Autoren nehmen an, dass dies der Grund dafür ist, dass Pannexine nicht zu Gap junction-Kanälen fusionieren können, wie es bei Connexinen der Fall ist. Pannexin-Kanäle verbinden somit das Zytoplasma mit dem extrazellulären Raum (DAHL, LOCOVEI, 2006). Dies konnte auch ultrastrukturell gezeigt werden (BECKMANN et al., 2016; MIHARA et al., 2013; SOSINSKY et al., 2011).

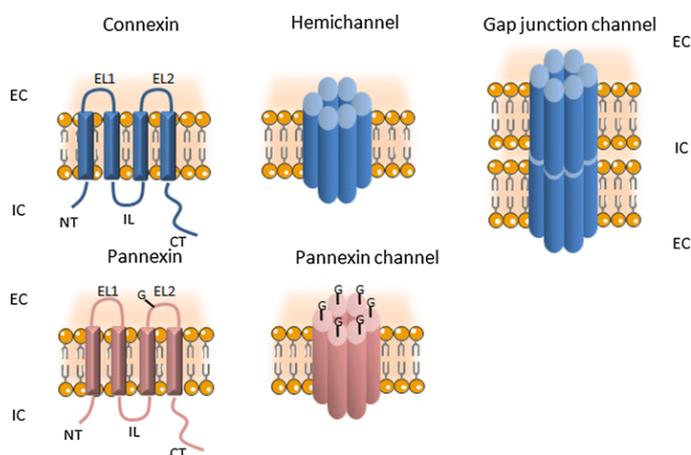


Abb. 5: Struktureller Aufbau der Connexine und Pannexine

Graphisch vereinfacht gezeigt sind in blau Connexin-Proteine und die durch sie gebildeten Connexone (hemichannel) bzw. Gap junction Kanäle (gap junction channel). Rot sind in der unteren Reihe die molekularen Strukturmerkmale eines Pannexin Moleküls gezeigt. Zu erkennen ist die Glykosylierung (G) des zweiten extrazellulären „Loops“ (EL2) bzw. des Pannexin-Kanals (pannexin channel) in der unteren Bildhälfte.

Bildquelle: (DECROCK et al., 2015) Lizenznummer: 4490231489234

Durch diese Proteinmodifikationen ergeben sich funktionelle Unterschiede der Kanäle: Ein entscheidender Unterschied zwischen Pannexin-Kanälen und Connexin-Kanälen besteht in ihrem physiologischen Grundzustand, welcher auch durch das Maß an Glykosylierung

reguliert wird. Gap junctions ermöglichen einen kontinuierlichen interzellulären Austausch, da sie in ihrer Grundkonformation geöffnet sind. Pannexin-Kanäle hingegen werden erst durch verschiedene Mechanismen geöffnet, um den Ein- oder Ausstrom von Molekülen zu ermöglichen (PENUELA et al., 2014b; WILLEBRORDS et al., 2017). Aktuell werden die verschiedenen Öffnungsmechanismen noch erforscht. Neben molekül- und ionengesteuerten Mechanismen existiert beispielsweise ein mechanisch getriggertter Öffnungsmechanismus für Panx1-Kanäle (MAKARENKOVA, SHESTOPALOV, 2014): Humane Erythrozyten reagieren auf mechanische Reize mit einer ansteigenden Freisetzung von ATP (BAO et al., 2004; LOCOVEI et al., 2006). Hierbei reagiert der Panx1-Kanal selbst als Sensor für den mechanischen Stimulus. Entsprechend handelt es sich bei Panx1 um einen mechanosensiblen Kanal (BAO et al., 2004; LOCOVEI et al., 2006). Des Weiteren können verschiedene Substanzen und Ionen den Konformationszustand des Kanals beeinflussen (BAROJA-MAZO et al., 2013; COTRINA et al., 1998; IGLESIAS et al., 2008; STOUT et al., 2002; YANG et al., 1994) (siehe Kap.1.4.3). Auch eine Reihe pathologisch induzierter Regulationsmechanismen sind bereits bekannt. Die Pannexine sind unter anderem für die zellulären Energielieferanten Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) durchgängig (WANG et al., 2013). Zudem leiten sie auch andere Moleküle wie etwa Neurotransmitter (z.B. Glutamat) und Eicosanoide (z.B. Prostaglandin E2/PGE2), wodurch sie an einem sehr weiten Spektrum physiologischer und pathologischer Funktionen beteiligt sind (VALDEBENITO et al., 2018). Einige dieser Faktoren wurden auch in der Pathogenese der MS beschrieben (siehe Kap. 1.4.3), so dass eine Interaktion mit den Gap junction Proteinen bei MS denkbar ist.

1.4.2 Connexine und Pannexine in der Retina

In der Mausretina konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere in der inneren und in der äußeren plexiformen Schicht das neuronale Cx36 exprimiert wird (SOHL et al., 1998; SOHL et al., 2000; SOHL et al., 2010). Cx36 wird spezifisch von einigen Neuronensubtypen exprimiert (CONDORELLI et al., 1998). Zudem ist es in der Retina ein wichtiges Protein für die neuronale Synchronisation bei der Reizweiterleitung von der äußeren zur inneren Retina (CONNORS, LONG, 2004; KUO et al., 2016). Neben Neuronen exprimieren auch die Gliazellen der Retina Connexine. Das gliale Cx43 wird von retinalen Müllerzellen, Mikrogliazellen und auch von den Pigmentepithelzellen exprimiert und ist das häufigste gliale Connexin in der Retina (DANESH-MEYER et al., 2016; GUO et al., 2016). Im Gegensatz zu neuronalem Cx36 dienen die glialen Connexine nicht der elektrischen Erregungsausbreitung, sondern dem Stoffaustausch und der interzellulären Kommunikation der Gliazellen (MILLS et al., 2001; SOHL et al., 2000). Die Expressionen der glialen und neuronalen Connexine werden durch pathologische Prozesse im ZNS und der Retina signifikant beeinflusst und

spielen in diesem Zusammenhang auch eine Rolle in der Pathogenese der MS im visuellen System, wie verschiedene Autoren postulieren (DANESH-MEYER et al., 2016; GUO et al., 2016).

Auch Pannexine werden in der Retina exprimiert; sowohl die Expression von Panx1 als auch Panx2 wurde beschrieben (DVORANTCHIKOVA et al., 2006; KURTENBACH et al., 2014; MAKARENKOVA, SHESTOPALOV, 2014; SOHL et al., 2005). Panx1 wird vor allem in den Ganglien-, Horizontal- und Amakrinen Zellen exprimiert, Panx2 vor allem in den Ganglienzellen (DVORANTCHIKOVA et al., 2006).

Die Expression von Panx1 in der Retina ist zwar deutlich geringer als die von Cx36, dennoch ist Panx1 für den Zellerhalt und geregelten Stoffaustausch von Molekülen sehr wichtig (SHESTOPALOV, SLEPAK, 2014). Auch die Pannexin-Expression und -Aktivität in der Retina unterliegt verschiedenen Botenstoffen in und um die Zellen. Im Auge scheint eine Hauptfunktion der Pannexine in der Regulation der ATP-Konzentration und Sekretion der exprimierenden Zelle zu bestehen, wobei auch eine Aktivierung des Panx1-Kanals im pathologischen Milieu, wie etwa bei einer akuten Infammation in der Retina, gezeigt werden konnte (KURTENBACH et al., 2014). Die physiologische Funktion von Panx1 und Panx2 in der Retina ist aktuell jedoch noch nicht abschließend im Detail geklärt.

1.4.3 Connexine und Pannexine bei der MS

Connexine und Pannexine weisen in den verschiedenen Gewebesubtypen im Organismus unterschiedliche Funktionen auf. Im ZNS konnte u.a. bereits eine Mitbeteiligung bei Zellproliferation und Differenzierung, aber auch beim Zelltod und der metabolischen Kopplung von Nachbarzellen nachgewiesen werden (KAR et al., 2012). In der Pathogenese der MS spielen diese interzellulären Kanalproteine (Panx1 und die verschiedenen Connexine) eine bedeutende Rolle. Sie sind beispielsweise bei der Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten (ADAMSON, LEITINGER, 2014) und bei der Vermittlung der Entzündungsreaktion an den Myelinscheiden und Axonen beteiligt (ALDSKOGIUS, KOZLOVA, 1998). So wird die Expression verschiedener Connexine und Pannexine während der Entzündungsreaktion hochreguliert, wodurch unter anderem zytotoxische Signale und Botenstoffe in die betroffenen Zellen weitergeleitet werden können. Einige Arbeiten weisen darauf hin, dass Connexine und Pannexine sich gegenseitig in ihrer Funktion und Expression beeinflussen (DECROCK et al., 2015): Beispielsweise verursacht eine höhere Pannexin-Expression, einhergehend mit höherem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, einen Abfall der Expression verschiedener Connexine. Es bilden sich weniger Gap junctions (GAJARDO-GOMEZ et al., 2016). Diese gegenseitige Regulation ist unter anderem entscheidend bei dem molekularen Ablauf der Zellschädigung neurodegenerativer Erkrankungen (GAJARDO-GOMEZ et al., 2016; PANCHIN et al., 2000). Adamson et al.

konstatieren eine zentrale Rolle des Panx1 als ATP-Kanal bei der immunologischen Antwort neurodegenerativer Erkrankungen wie der MS (ADAMSON, LEITINGER, 2014). Durch eine veränderte ATP-Sekretion kann die Aktivität des Inflammasoms, eines intrazellulären Proteinkomplexes, von Immunzellen wie Makrophagen über Panx1 aktiviert werden. Hierbei handelt es sich um einen wichtigen Schritt bei der Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten, resultierend in weiterer zentraler Entzündungsaktivität bei der MS (YONG et al., 2017; ZORZELLA-PEZAVENTO et al., 2013). In diesem Zusammenhang ist die pathologische Regulation der Panx1-Aktivität von besonderer Bedeutung: Es existieren unterschiedlich extrazellulär gesteuerte Öffnungsmechanismen, welche u.a. im entzündeten und degenerativ veränderten Gewebe nachgewiesen werden konnten. So führt ein pathologischer extrazellulärer Anstieg der Konzentration des Kations K^+ dazu, dass der Kanal in den Offen-Zustand übertritt (SILVERMAN et al., 2009). Auch weitere Kanäle sind beim Öffnungsmechanismus beteiligt, z.B. der ATP-abhängige (purinerge) P2X7-Rezeptor und der N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptor, welcher durch Methyl und Aspartat in seiner Konformation verändert wird (DAVIDSON et al., 2015; KRUMBHOLZ et al., 2012; LI et al., 2018). Der durch einen erhöhten ATP-Spiegel aktivierte P2X7-Rezeptor beeinflusst vor allem die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase (BOYCE, SWAYNE, 2017; DAHL et al., 2013; IGLESIAS et al., 2008; SONG et al., 2016). Bei Aktivierung des P2X7-Rezeptors kommt es zu einer hohen intrazellulären Konzentration an Ca^{2+} -Ionen, welche den geschlossenen Panx1 Kanal in den offenen Zustand bringt (BAROJA-MAZO et al., 2013; COTRINA et al., 1998; IGLESIAS et al., 2008; STOUT et al., 2002; YANG et al., 1994). Neben dem erhöhten Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle (BOYCE, SWAYNE, 2017; LUCCHINETTI et al., 2000) werden die Kanäle bei Stimulation der Zelle durch pro-inflammatorische Substanzen, wie etwa $TNF-\alpha$ und verschiedene Interleukine, häufiger geöffnet und in höherer Dichte exprimiert (BOYCE, SWAYNE, 2017; ORELLANA et al., 2009; WEKERLE, 2017; WONG et al., 2014). Gerade ein pathologischer Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle via Panx1 kann zu einer zytotoxischen Ca^{2+} -Überladung führen und die Zelle letal schädigen (SHESTOPALOV, SLEPAK, 2014). Letztlich führt also eine erhöhte Konzentration von extrazellulärem ATP über den P2X7-Rezeptor zu weiterem ATP Ein- und Ausstrom durch den geöffneten Panx1-Kanal (ADAMSON, LEITINGER, 2014; IGLESIAS et al., 2008; KRUMBHOLZ et al., 2012). Entsprechend wirkt ATP über die Pannexin- und P2X7-Kanäle autokrin auf die Zelle zurück; es handelt sich um eine positive Rückkopplung (DAHL, 2018; QIU et al., 2012).

ATP kann aber auch eine negative Rückkopplung auf den Panx1-Kanal haben und diesen inhibieren. Bei sehr hohen extrazellulären ATP-Konzentrationen tritt Panx1 in den impermeablen Konformationszustand über (DAHL, 2018; QIU, DAHL, 2009). Welcher Mechanismus einsetzt, ist dabei von der extrazellulären ATP-Konzentration abhängig: Leicht

erhöhte Konzentrationen aktivieren den Kanal über den Feedbackmechanismus durch P2X7; sehr hohe inhibieren ihn. Ein Erklärungsansatz hierfür sind zwei verschiedene Konformationen, in denen der Pannexin-Kanal vorliegen kann (DAHL, 2018; DAHL et al., 2013).

Es gibt aber auch innerzelluläre Effekte, die den Panx1-Kanal regulieren können. Beispielsweise kann es im Rahmen der Apoptose, zellulären Hypoxie oder Inflammation einer Zelle zum Öffnen des Kanals kommen, wenn verschiedene bei diesen Vorgängen freigesetzte Substanzen an den intrazellulären C-Terminus des Pannexinmoleküls binden (BOND, NAUS, 2014; FARIAS et al., 2017; GULBRANSEN et al., 2012; SILVERMAN et al., 2009; THOMPSON, 2015; VELASQUEZ, EUGENIN, 2014).

Die oben beschriebenen Vorgänge wurden bereits teilweise im visuellen System erforscht und nachgewiesen: Xia et al. haben herausgefunden, dass es nach mechanischer Schädigung in ödematös veränderten retinalen Ganglienzellen über einen Panx1-vermittelten erhöhten Ausstrom von ATP zu einer Überstimulation der P2X7-Rezeptoren kommt. Hierdurch sterben die Zellen schließlich apoptotisch ab (XIA et al., 2012). Dies wurde im Rahmen der Pathogenese der MS sowohl bereits im ZNS als auch am N. opticus nachgewiesen (BARZ et al., 2017; STIEBEL-KALISH et al., 2017). Diese Beobachtungen zeigen, dass Panx1 auch bei inflammatorischen Vorgängen im visuellen System aktiviert wird, wie sie bei der MS auftreten. Zudem ist Panx1 bei verschiedenen Mechanismen, wie der Aktivierung von Immunzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten beteiligt, und hat somit eine wichtige Funktion in verschiedenen Schritten der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen (siehe Kap.1.5) (ADAMSON, LEITINGER, 2014; VALDEBENITO et al., 2018; WILLEBRORDS et al., 2017).

1.5 Zelluläre Degeneration – Ursachen der Krankheitssymptome im optischen System

Im Detail ist der komplexe molekulare Pathomechanismus, welcher die zentrale Inflammation und Demyelinisierung bei der MS auslöst, noch nicht vollständig bekannt. So ist beispielsweise nicht gesichert, wie genau es zur autoreaktiven Aktivierung der Immunzellen gegen zelluläre Bestandteile des Myelins kommt. Eine molekulare Mimikry durch virale Infekte wird derzeit als eine der Möglichkeiten vermutet (LANGER-GOULD et al., 2017; WATAD et al., 2017). Andere Mechanismen, wie die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, konnten bereits in verschiedenen Studien belegt werden (siehe folgendes Kap.1.5.1).

1.5.1 T-Zell-Aktivierung und Autoantikörperbildung

Einige Komponenten der T-Zell Aktivierung, die an der entzündlichen Krankheitsgenese im ZNS beteiligt sind, sind bereits bekannt. CD4-positive T-Helferzellen reagieren, nachdem sie

in das ZNS eingewandert sind, mit zentralen B-Lymphozyten. Hierdurch werden u.a. Autoantikörper gegen bestimmte Glykoproteine der Oligodendrozyten gebildet (ANDROUTSOU et al., 2018; KRUMBHOLZ et al., 2012; LUCCHINETTI et al., 2000; WEKERLE, 2017). Zu diesen zählt das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), welches in der Membran der Oligodendrozyten vorkommt (KIM et al., 2015). Das MOG wirkt als spezifisches Epitop für Autoantikörper, welche durch die pathologische Aktivierungskaskade der T-Zellen und B-Zellen gebildet werden (ANDROUTSOU et al., 2018; HAVLA et al., 2017; LARABEE et al., 2016). Experimentell konnte diese Reaktion der Autoantikörper mit dem MOG-Protein besonders stark in Gliazellen um die Axone der optischen Nerven an Mäusen nachgewiesen werden. Dementsprechend scheinen besonders die neuronalen Zellen des visuellen Systems am Anfang des Krankheitsgeschehens beeinträchtigt zu sein (HAVLA et al., 2017).

Im gesunden Organismus sind die T-Zellen peripher, also außerhalb des ZNS, lokalisiert. Dort zirkulieren sie im Blutstrom oder ruhen in sekundären lymphatischen Organen und verschiedenen Geweben wie der Haut (YONG et al., 2017). Im Rahmen der physiologischen Immunantwort werden sie über eine Kaskade aktiviert, welche durch den Mediator ATP in Gang gesetzt wird und bei welcher auch der Panx1 Kanal beteiligt ist (ADAMSON, LEITINGER, 2014). Da Adenosin ein Purin ist, wird diese Aktivierungskaskade auch als purinerges Signalweg bezeichnet (MANOHAR et al., 2012). Bei der Endstrecke des purinergen Signalwegs werden größere Mengen an aktivierten Interleukinen (IL), darunter Interleukin-1 β , freigesetzt (OGURA et al., 2006). Interleukine wirken als Mediatorsubstanzen für entzündliche Immunreaktionen am Ort der T-Zell-Invasion (MANOHAR et al., 2012; PERRY, LUND, 1990). Vor allem eine hohe Konzentration an IL-1 β führt zu einer entzündlichen Reaktion im betroffenen Gewebe. Eine pathologisch erhöhte Ausschüttung von aktivem IL-1 β steht ebenfalls im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der MS (NADEAU-VALLEE et al., 2017; PELEGRIN, 2008). Im Verlauf der MS übertreten autoreaktive T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke und lösen an vielen Herden im ZNS eine zentrale Entzündungsreaktion aus. Daher ist die Aktivierung dieser T-Zellen ein entscheidender Schritt bei Erkrankungsbeginn.

Für die Aktivierungsschritte des purinergen Signalweges besitzen T-Zellen neben einer Vielzahl spezifischer Rezeptoren, welche auf eine erhöhte ATP-Konzentration reagieren, auch eine hohe Expression des Pannexin1(Panx1)-Kanals (MANOHAR et al., 2012; SHOJI et al., 2014). Im Rahmen der bereits beschriebenen positiven Rückkopplung kommt es durch die ATP-mediierte Stimulation des purinergen P2X7 Rezeptors der T-Zellen zu weiterer Freisetzung von ATP durch den Panx1 Kanal im ZNS (ATP induzierte ATP-Freisetzung) (DAHL, 2018). Zudem führt die langanhaltende Aktivierung von Panx1 in T-Zellen zum

Ausstrom von Interleukinen in das umliegende Gewebe (MANOHAR et al., 2012). Es kommt zu einer länger anhaltenden Entzündung. Letztlich führen u.a. auf diese Weise erhöhte extrazelluläre ATP-Konzentrationen zu neuronalem Zelltod, und letztlich zu großen Lücken im Neuropil mit Narben- und Plaque-Bildung im ZNS (KASSUBEK et al., 2017; YATES et al. 2017). Diese Prozesse wurden beide auch für die MS beschrieben. Daher widmet sich diese Arbeit ebenfalls der natürlichen und pathologischen Funktion sowie einer möglichen pharmakologischen Blockade des Panx1-Kanals.

1.5.2 Formen des Zelluntergangs im ZNS und visuellen System

In Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass nahezu 98% der an MS Verstorbenen eine Mitbeteiligung des optischen Systems aufwiesen, selbst wenn zu Lebzeiten keine charakteristischen visuellen Symptome angegeben worden waren (LUTZ et al., 2013; POGORZELSKI et al., 2004; SYC et al., 2012). Gesichert wurde diese Annahme unter anderem durch Obduktionsbefunde der Augen und mehrjährige longitudinale Studien an MS-Patienten (BEHBEHANI et al., 2018; GARCIA-MARTIN et al., 2017). Im Rahmen der Retrobulbärneuritis demyelinisieren die Axone des optischen Nervs. Dies kann sowohl zu einer primären Ausdünnung der Myelinschicht als auch zu einer retrograden Degeneration der retinalen Ganglienzellen führen (HUANG et al., 2018; LARABEE et al., 2016). Nachweisbar ist die Abnahme der Zelldichte unter anderem durch die Methode der „optical coherence tomography“ (OCT) bei MS-Patienten (BRITZE et al., 2017).

Als Mechanismus des Ganglienzelluntergangs werden derzeit verschiedene Pfade diskutiert. Einige Formen des Ganglienzelluntergangs sind bereits als direkte Folge der axonalen Schädigung nachgewiesen worden. Hierzu zählen Apoptose und Nekrose (BERKELAAR et al., 1994; HEROLD et al., 2015; HORSTMANN et al., 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Retrobulbärneuritis die retinale Mikroglia (Müller-Glia) aktiviert wird. Diese Zellen verändern sich durch die im Rahmen der zentralen Entzündung, beispielsweise durch die T-Zellen, und die daraufhin gebildeten Mediatorsubstanzen pathologisch und treten teilweise in die Nekroptose ein (HUANG et al., 2018). Bei der Nekroptose handelt es sich um eine Form des Zelltodes, die sowohl Mechanismen der Apoptose als auch Vorgänge der Nekrose aufweist (KUO et al., 2016; NEGRONI et al., 2017). Befinden sich die mikroglialen Zellen einmal in der Nekroptose, tragen sie ebenfalls zur Freisetzung pro-inflammatorischer Interleukine wie etwa IL-1 β und IL-8 bei (ICHINOSE et al., 2014; KEELEY, REESE, 2010; NEGRONI et al., 2017). Diese wiederum verstärken die inflammatorischen und degenerativen Effekte in retinalen Zellen, auf die nun die aus mehreren Zellpopulationen freigesetzten pro-inflammatorischen Signale einwirken (CONNORS, LONG, 2004; HUANG et al., 2018).

Wird letztlich die zentrale Entzündung über die Axone des optischen Nervs in die Ganglienzellkörper fortgeleitet und über nekroptotische Mikroglia und T-Zellen verstärkt, kommt es hier zu strukturellen Zellschäden, welche die physiologische Zellfunktion stark einschränken (HORSTMANN et al., 2013). Zu diesen Mechanismen zählt neben dem veränderten Zytokin-Spiegel im optischen Nerv und in der Retina auch oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion mit erhöhtem intrazellulären Ca^{2+} (ISLAM, 2017). Der oxidative Stress wird unter anderem durch Aktivitätssteigerung des NADPH-Oxidase-Komplexes ausgelöst (PYKA-FOSCIAK et al., 2018), welcher wiederum durch Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine und Faktoren wie dem Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und dem „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF κ -b) aktiviert wird (HUANG et al., 2018; MELANSON et al., 2009; PYKA-FOSCIAK et al., 2018).

Sind die betroffenen Zellen schließlich zu stark geschädigt, um ihren Stoffwechsel uneingeschränkt aufrechtzuerhalten, kommt es zur Nekrose oder Apoptose einzelner Zellen (MELANSON et al., 2009; ORRENIUS et al., 2003). Währenddessen setzen die Zellen ihrerseits intrazelluläre Bestandteile aus ihrem Zytoplasma frei. Zusammengefasst werden diese Faktoren als „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) bezeichnet, also als mit einer Schädigung assoziierte molekulare Muster (THORNTON et al., 2017). Durch diese pathologischen molekularen Partikel wird das Milieu in der direkten Umgebung der sterbenden Zelle zytotoxisch verändert und weitere Zellen werden beim Entzündungsprozess beteiligt. Hierzu zählen auch phagozytierende Zellpopulationen des Immunsystems, welche u.a. über o.g. Mediatorsubstanzen mit den geschädigten Zellen interagieren. Die Immunzellen phagozytieren das freigesetzte Zellmaterial und bewahren als anti-inflammatorischer Zelltyp Nachbarzellen vor weiterer molekularer Schädigung oder lösen in bereits vorgeschädigten Nachbarzellen die Apoptose aus (DRESCHERS et al., 2017; MOUNIER et al., 2013; THORNTON et al., 2017). Diese Form des programmierten Zelltods wird als Phagozytose-induzierter Zelltod (engl. phagocytosis induced cell death, PICD) bezeichnet und bewirkt unter anderem, dass die Zelle fragmentiert und kontrolliert zugrunde geht, ohne umliegende Gewebe durch freigesetzte intrazelluläre Bestandteile zu schädigen (DRESCHERS et al., 2017).

Von besonderer Bedeutung beim Signalweg der Apoptose sind Caspasen. Es handelt sich hierbei um Cystein-haltige Proteasen, welche durch Proteolyse Endstreckenkomponenten der Apoptosewege modifizieren. Dabei aktivieren sich die nachgeschalteten Proteasen selbst, indem sie eigene Bestandteile abspalten. Man nennt sie in enzymatisch aktiver Form daher „Cleaved Caspases“, kurz CC (von Engl. to cleave = abspalten). Bedeutend sind vor allem die Cleaved Caspasen 3 (CC3), 6 (CC6) und 7 (CC7), da sie direkt wichtige zelluläre

Moleküle verändern und dadurch die Apoptose induzieren (KOBAYASHI et al., 2007; LI et al., 2017b).

Die Induktion dieser apoptotischen Signalwege wurde bei axonalen Schäden in murinen Ganglienzellen nachgewiesen (BERKELAAR et al., 1994). Auch die zentrale Apoptose von Nervenzellen im ZNS bei MS Patienten gilt als gesichert (MANOGARAN et al., 2018).

Mit Blick auf diese Schädigungsmechanismen stellt sich die Frage, inwiefern die degenerativen Prozesse auch im tierexperimentellen Modell eine Apoptose in der Retina auslösen. Zudem interessiert, ob die hierdurch ausgelöste Degeneration auf das Stratum ganglionare begrenzt bleibt oder sich über die dichten Zellverbindungen zwischen den Schichten weiter in der Retina ausbreitet.

1.5.3 Die Bystander-Hypothese

Neben den primären Schädigungsmechanismen der verschiedenen retinalen Zellen werden auch indirekte Vorgänge erforscht, die zu einer vergrößerten primären Läsionszone oder weiteren an anderen Stellen im Gewebe auftretenden sekundären Läsionen führen. Für diese indirekte oder sekundäre Schädigung kommen verschiedene Mechanismen in Betracht. Verschiedene Arbeiten legen nahe, dass Gap junction Proteine nicht nur bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Entzündung im ZNS, sondern auch bei der sekundären (indirekten) Zellschädigung der immunologisch vermittelten Entzündungsreaktionen neurodegenerativer Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen (DAHL et al., 2013; KAR et al., 2012; PENUELA et al., 2014a). Wie bereits beschrieben, weisen retinale Zellen eine spezifische Connexinexpression auf: Cx43 wird von Gliazellen, neuronales Cx36 v.a. von Ganglien-, Horizontal- und Amakrinen Zellen exprimiert (GUO et al., 2016; KOVACS-OLLER et al., 2017). Diese Connexine und retinales Pannexin1 scheinen bei der Vermittlung toxischer Signale bei primär entzündlichen Erkrankungen der Retina wichtig zu sein. Diese Kanäle sind bei einer Fortleitung der Signale zur Zelldegeneration und Apoptose in weitere Zellen beteiligt (AKOPIAN et al., 2014; GULBRANSEN et al., 2012; KRANZ et al., 2013; THOMPSON, 2015; VALDEBENITO et al., 2018). Der gleiche Effekt wurde ebenfalls in der Retina bei primären entzündlichen Erkrankungen der Retina wie der Retinitis pigmentosa und bei degenerativen Vorgängen des Glaukoms beobachtet (AKOPIAN et al., 2017; BRITZE et al., 2017; RIPPS, 2002). Ebenso wird aktuell die Ausbreitung Degenerations-induzierender Faktoren bei primär neurodegenerativen ZNS-Erkrankungen über synaptische Verbindungen (trans-synaptisch) bis in die Retina diskutiert (MANOGARAN et al., 2018). Zu den assoziierten Erkrankungen zählen das klinisch isolierte Syndrom der Neuromyelitis optica sowie Frühstadien der MS (PUTHENPARAMPIL et al., 2017; TIAN et al., 2017).

Es gibt verschiedene Theorien, die einen Erklärungsansatz für diesen Effekt liefern. Eine davon ist die Bystander-Hypothese (Engl. to bystand = zuschauen, teilnehmen), laut der Zellen toxische Signale über Gap junction in benachbarte Zellen weiterleiten (AKOPIAN et al., 2014; KERMER et al., 1999; KIM et al., 2018; VALDEBENITO et al., 2018).

Die Autoren Ishii und Rohrer analysierten und diskutierten verschiedene molekulare Mechanismen, welche den Bystander-Effekt bei primär entzündlichen Erkrankungen in der Netzhaut, mit Fokus auf dem Pigmentepithel, vermitteln (ISHII, ROHRER, 2017). Die Bystander-Hypothese, oder zumindest der in ihr beschriebene Mechanismus, könnte ebenfalls einen möglichen Erklärungsansatz für eine frühe Ausdehnung retinaler Zellschädigung bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der MS liefern: Über die Neuriten der Ganglienzellen, welche den optischen Nerv bilden, wird die Zellschädigung retrograd bis zu den Perikaryen fortgeleitet. Diese degenerieren, treten in Apoptose oder Nekrose ein und leiten toxische Signale über Gap junction-Kanäle und Synapsen bis in äußere Zellschichten zu den Fotorezeptoren weiter (KERMER et al., 1999; PUTHENPARAMPIL et al., 2017; TIAN et al., 2017; VALDEBENITO et al., 2018). Aufgrund der dichten neuronalen Verbindungen über Gap junction in der Retina, besteht eine schnelle Ausbreitungsmöglichkeit von Ca^{2+} und weiteren Molekülen auf die bipolaren Zellen und über die äußere plexiforme Schicht in die Fotorezeptoren (ASARI, MEISTER, 2014; FARIAS et al., 2017; RIPPS, 2002; VALDEBENITO et al., 2018). Auf diesem Weg könnte es zur sekundären Ausdehnung der primär ganglionären Läsion über verschiedene Zellschichten in die äußere Retina kommen.

1.6 Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten der T-Zell-Aktivierung durch das Pharmakon Probenecid im Tiermodell

1.6.1 Das Pharmakon Probenecid

Probenecid (PBN) ist ein im klinischen Bereich eingesetztes Pharmakon in der Gichttherapie aus der Gruppe der kompetitiven Kanalinhhibitoren (CUNNINGHAM et al., 1981). Der therapeutische Effekt bei Gicht wird erreicht, da PBN die Rückresorption der organischen Harnsäure durch den OAT1 Transporter, einen Kanal für organische Säuren im renalen Tubulus System, inhibiert (ROBBINS et al., 2012). Zudem findet Probenecid seit vielen Jahrzehnten Einsatz zur Wirkungsverstärkung verschiedener Antibiotika (insbesondere von Penicillin), welche ebenfalls durch Kanalblockade länger im Organismus wirken können (CLARK et al., 2017). PBN ist nicht hochspezifisch für den OAT1 Kanal und wirkt auch an anderen Kanälen als Kanalblocker: Der Kanal P2X7 kann durch PBN über eine Regulation von ATP in einen anderen Konformationszustand überführt und so inaktiviert werden (BARTLETT et al., 2017; BHASKARACHARYA et al., 2014). Der Kationenkanal Transient receptor potential cation channel V2 (TRPV2) wird durch PBN hingegen aktiviert (MIHARA et al., 2013). Der Kanal ist termosensibel und reguliert Ionen-Transport in und aus der Zelle.

Vor ca. 10 Jahren wurden die Panx1-Kanäle (DAHL, 2018; DAHL et al., 2013) als pharmakologische Zielproteine von Probenecid identifiziert (SILVERMAN et al., 2008). Dabei beruht die inhibitorische Wirkung darauf, dass PBN die extrazellulären Loops des Panx1-Kanals bindet (XIA et al., 2012). Dieser Effekt ist relevant, da, wie bereits beschrieben, die Panx1-Kanäle an der Aktivierung und Aufrechterhaltung neuroinflammatorischer Erkrankungen beteiligt sind (DAHL, 2018; DAHL, MULLER, 2014; TONKIN et al., 2014). Durch die Blockade der Panx1- und P2X7-Kanäle wirkt PBN neuroprotektiv und reduziert nachweislich unter anderem den Anstieg von IL-1 β sowie das inflammatorisch bedingte Ödem der Gliazellen (XIA et al., 2012). Inflammatorisch bedingte neuronale Zellschädigung wurde in verschiedenen Studien im Modell der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) und Cuprizin-Modell an Versuchstieren nachgewiesen (CLAUDIO et al., 1990; HAINZ et al., 2017a; JIAN et al., 2016; MANOGARAN et al., 2018). Einige der Autoren setzten hier PBN ein, um die Zellschäden zu reduzieren (HAINZ et al., 2017a).

1.6.2 Tierexperimentelle Modelle der Multiplen Sklerose

Im Tiermodell gibt es verschiedene Möglichkeiten, die MS-assoziierte Pathologie zu imitieren (MCFARLIN et al., 1975; MELANSON et al., 2009). Anwendung finden sowohl die Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) als auch das Cuprizin-Modell (PRAET et al., 2014; ZHEN et al., 2017).

Im Cuprizin-Modell ist das Ziel, die Aspekte der Pathogenese der MS zu simulieren, die mit einer Demyelinisierung bei geringer zentraler Inflammation einhergehen (HAINZ et al., 2017b; RUTHER et al., 2017; TORRE-FUENTES et al., 2017). Bei Cuprizin, das oral verabreicht wird, handelt es sich um einen Chelator für Kupfer-Ionen, wodurch die Konzentration an frei verfügbaren Ionen nach Einnahme reduziert wird (ACS et al., 2013). Durch eine gesenkte Konzentration an Kupfer-Ionen im ZNS wird ein neurotoxischer Effekt erzielt, die Expression der 5-Lipoxygenase gesteigert sowie ein Subtyp des Inflammasoms, das sogenannte Nlrp3, aktiviert (YOSHIKAWA et al., 2011). Es entstehen vor allem in den Oligodendrozyten toxisch veränderte Mitochondrien, wodurch die Zellen massiv geschädigt werden und degenerieren (ACS et al., 2013).

Im EAE-Modell hingegen steht die Imitation der inflammatorischen Komponente der MS im Vordergrund (ROBINSON et al., 2014). Den Versuchstieren wird ein Peptidbestandteil des MOG-Proteins (Aminosäuren 35-55) injiziert. Dieses spielt auch eine zentrale Rolle als Epitop der Autoantikörper in der Pathogenese der MS. Im Tiermodell wird die Antikörperbildung gegen MOG durch ein Adjuvans und ein Toxin induziert und verstärkt. Die infolge der Autoimmunreaktion stattfindende Inflammation und anschließende zelluläre Degeneration ist sowohl klinisch anhand von verschiedenen somatomotorischen

Ausfallerscheinungen als auch post mortem im Gewebe des ZNS nachweisbar (MCFARLIN et al., 1975; MELANSON et al., 2009). In dieser Arbeit wurde das EAE-Modell angewendet, um die möglichen Folgen der Inflammation und Degeneration in Nervus opticus und Retina untersuchen zu können (HORSTMANN et al., 2013; MANOGARAN et al., 2018). Die Autoren Masayuki et al. stellten verschiedene experimentelle Methoden zur Erforschung retinaler Zelldegeneration mit Blick auf den zugrundeliegenden Pathomechanismus und die daraus resultierenden Läsionsformen im ZNS gegenüber. Die EAE induziert im ZNS eine reaktive Immunantwort durch Mikroglia und Astrozyten (MANOGARAN et al., 2018). Durch diese Aktivität kommt es als Folge der Entzündung zu einem indirekten sekundären Zellschaden (NIWA et al., 2016). Manogaran et al. postulieren einen ähnlichen Pathomechanismus mit sekundärem Zelluntergang im optischen System bei der MS, wobei sowohl bei der MS als auch bei der EAE Pannexine in der Pathogenese nachweislich beteiligt sind (BEHBEHANI et al., 2018; LUTZ et al., 2013; MANOGARAN et al., 2018). Aus diesem Grund eignet sich das EAE-Modell im Vergleich zu den anderen experimentellen Ansätzen besonders gut zur Analyse der sekundären Läsion im ZNS und optischen System, sowie einer möglichen pharmakologischen Intervention mit möglicher Verringerung der Läsionszone durch den Panx1-Inhibitor PBN.

1.6.3 Präventiver Therapieansatz mit PBN im EAE-Modell

Die EAE hat seit Jahrzehnten in vielen Studien zur Erforschung der MS-Anwendung gefunden (MCFARLIN et al., 1975). Gerade die immunologischen Aspekte mit ihren neurologischen Folgeerscheinungen wie etwa neuromuskulären Paralysen konnten mit diesem Modell gut induziert und analysiert werden (PYKA-FOSCIAK et al., 2018). Auch der Einsatz von PBN als potentiell Pharmakon in der MS-Therapie wurde bereits im EAE-Modell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PBN, wenn es bereits teilweise paralysierten Tieren verabreicht wird, signifikant das klinische Fortschreiten der Symptome abmildert und die Überlebenszeit der Tiere verbessert (HAINZ et al., 2016). Ebenso kann durch die EAE eine Neuritis optica in den Versuchstieren induziert und mit den pathologischen Befunden im visuellen System bei MS-Patienten verglichen werden (MANOGARAN et al., 2018). Unter EAE kommt es u.a. sowohl zur partiellen Demyelinisierung des Nervus opticus als auch zu messbarem Verlust von dessen Axonen. Zudem konnte eine signifikante Abnahme der retinalen Ganglienzellen unter EAE nachgewiesen werden (HORSTMANN et al., 2016; HORSTMANN et al., 2013). Entsprechend sind unter EAE sowohl Läsionen des ZNS als auch des optischen Systems nachweisbar, wie sie ebenfalls bei der MS auftreten. PBN wurde bereits experimentell im visuellen System als Pannexin-Blocker erfolgreich eingesetzt, um einen mechanisch getriggerten pathologischen ATP-Ausstrom aus isolierten retinalen Ganglienzellen in Zellkulturen zu reduzieren (XIA et al., 2012). Ein therapeutischer Einsatz von systemisch verabreichten PBN im visuellen System unter EAE ist dagegen bisher noch nicht wissenschaftlich untersucht worden.

In dieser Arbeit wurde im Tiermodell der EAE die Paralyseentwicklung der Versuchstiere, eine Schädigung der neuronalen Zellen und Synapsen in der Retina sowie eine mögliche protektive Interventionsmöglichkeit durch PBN untersucht: In einem präventiven Therapieansatz wurde den Versuchstieren PBN in einer Dosis von 100mg/kg Körpergewicht injiziert; Start der Therapie war Tag eins nach EAE-Induktion.

2 Ziel der Studie - Hypothesen

1. Die EAE verursacht klinisch messbare Symptome der Versuchstiere, welche auf Demyelinisierung und Inflammation im ZNS zurückzuführen sind. Die daraus resultierende Schädigung der Axone kann retrograd in deren Zellkörper weitergeleitet werden. In der Retina degenerieren die Ganglienzellen und unterliegen dem Zelltod. Unklar ist jedoch, ob sich die degenerativen Veränderungen innerhalb der Retina ausbreiten oder auf die Ganglienzellen beschränkt bleiben. Entsprechend der Bystander-Hypothese könnten Gap junction-Kanäle für die Ausbreitung in benachbarte Zellschichten der Retina mitverantwortlich sein.

Es wird daher in dieser Arbeit postuliert, dass die EAE-induzierte axonale Schädigung im N. opticus die Apoptose retinaler Ganglienzellen zur Folge hat. Über den Nachweis des Ganglienzell-spezifischen Proteins RBPMS sowie das Apoptose-assoziierte Protein Cleaved-Caspase-3 soll die Zahl der Ganglienzellen unter EAE bzw. in Kontrolltieren bestimmt werden. Connexin 36, das Gap junction-Protein elektrischer Synapsen, sowie RIBEYE, exprimiert in den chemischen Ribbon-Synapsen der Retina, werden analysiert, um die synaptische Verschaltung in der Retina bei EAE zu untersuchen. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass sich die EAE-induzierte Läsion im optischen Nerv in abnehmender Zahl retinaler Ganglienzellen sowie in einer Reduktion synaptischer Verbindungen innerhalb der Retina zeigt.

2. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein möglicher neuroprotektiver Effekt des Pannexin-1-Inhibitors Probenecid (PBN) auf die retinalen Neurone der Versuchstiere untersucht werden. Eine frühe pharmakologische Intervention mit Probenecid (100mg/kg Körpergewicht ab Tag eins nach EAE-Induktion) mildert die einsetzende Paralyse (Hainz et al., 2016, sowie diese Arbeit). Hypothese dieses Teils der Arbeit ist, dass die PBN-Intervention eine Prävention der neuronalen Schädigung im Auge zur Folge hat, d.h. dass weniger retinale Zellen in eine EAE-induzierte Apoptose eintreten. Zudem wird angenommen, dass die retinalen Strukturproteine Connexin 36, RIBEYE und RBPMS in der präventiv mit PBN behandelten Gruppe im Vergleich zur EAE-Gruppe in höherer Dichte immunologisch nachweisbar sein werden.

3 Materialien

3.1 Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Observer Z.1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Halogenlampe (HXP 120C)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kryostat Leica CM1950	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM 2500	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Microm HM 350	Heidelberg Instruments, Heidelberg, Deutschland
Wärmeschrank INB 300	Memmert, Schwabach, Deutschland
Lösungen/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)	Abcam, Cambridge, UK
Aceton 100% 400ml	ZCHL, Universität des Saarlandes, Campus Saarbrücken, Deutschland
Avidin	Abcam, Cambridge, UK
Benzoessäuremethylester	ZCHL, Universität des Saarlandes, Campus SB
Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Citratpuffer (Trinatriumcitrat-Dihydrat und Zitronensäure-Monohydrat)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dakopen®	DAKO, Hamburg, Deutschland
DAPI Fluoromount G	Southern Biotech, Eching, Deutschland
Deckgläser 24×60mm + 24×50mm	Zentralmagazin Universitätsklinikum des Saarlandes, Deutschland
Eisessig (Essigsäure)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eosin y	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	ZCHL, Universität des Saarlandes, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylinlösung nach Ehrlich	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hooke kit™ MOG35-55/CFA Emulsion PTX	Hooke Laboratories Inc., Lawrence, MA, USA
Immersionsöl Immersol™ Zeiss 518F	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Ketaminhydrochlorid Injektionslösung	Pfizer, Berlin, Deutschland
Mikrotomklingen	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Natriumchloridlösung 0.9%	Braun AG, Melsungen, Deutschland
Ziegenserum (Normal Goat Serum, NGS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Paraffin Roti-Plast	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS (NaCl, KCL, Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O, KH ₂ PO ₄)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Probenecid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eindeckmedium Roti HistoKit	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streckblättchen	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Streptavidin/POD	Abcam, Cambridge, UK
Gewebeeinfriermedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound)	Sakura Finetek Europe, Staufen, Deutschland
Triton X100	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylazinhydrochlorid Injektionslösung	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Xylol Isomerengemisch	ZCHL, Universität des Saarlandes, Campus Saarbrücken, Deutschland

3.2 Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Rabbit Anti Cleaved Caspase 3 (D175, Lot No 0043)	Cell Signaling Technologie, Danvers, USA
Rabbit Anti RBPMS (ab194213, Lot No GR259991-15)	Abcam, Cambridge, UK
Mouse Anti Ribeye (C2D9, 09.02.2015)	Univ.-Prof. Dr. med. F. Schmitz, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland
Rabbit Anti Cx36 (GJA9, Lot No QA214232)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

3.3 Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor® Goat Anti Rabbit 568nm (A11034, Lot No 1753597)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Alexa Fluor® Goat Anti Mouse 568nm (A11001, Lot No 1753597)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Goat Anti Rabbit IgG Biotin (ready to use)	Abcam, Cambridge, UK

4 Methoden

4.1 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere dieser Arbeit waren weibliche Mäuse des Stamms C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Zum Zeitpunkt der EAE-Induktion waren die Tiere 10 bis 12 Wochen alt. Die Euthanasierung erfolgte zu Versuchsende nach 22 Versuchstagen. Die Behandlung und Untersuchung der Tiere wurden durch Frau Dr. rer. nat. Nadine Hainz durchgeführt. Gehalten wurden die Tiere entsprechend des Tierschutzgesetzes in der Tierhaltung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes. Für die Versuche lag eine Genehmigung des Landesamtes für Verbraucherschutz des Saarlandes vor (TVV 05/2013).

Die Tiere wurden randomisiert den verschiedenen Studiengruppen zugeteilt. In dieser Arbeit wurde Gewebe von 17 der 30 für dieses Experiment zugeteilten Mäusen analysiert, welche in fünf Behandlungsgruppen (Kapitel 4.2.3) unterteilt waren.

4.2 Das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE)

Das EAE-Modell basiert auf einer experimentell induzierten Antikörperbildung der Versuchstiere gegen ein injiziertes Peptid des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (Aminosäuren 35-55; MOG-Peptid). Hierdurch findet eine autoimmune Reaktion gegen körpereigenes Myelin statt, welche zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt (HANSON et al., 2018).

4.2.1 Induktion der EAE

Am Tag 0 wurde die EAE induziert. Hierzu wurde das Hooke Kit EK 2110 (Hooke Laboratories Inc., MA, USA) verwendet. Den Tieren (n=25) wurde insgesamt 200µl MOG-Emulsion subcutan (s.c.) gespritzt; dabei wurden je 100µl in den oberen und unteren Rückenbereich appliziert. Diese Emulsion wird in fertig vorgefüllten Spritzen geliefert und enthält ein Polypeptid, bestehend aus den Aminosäuren 35 bis 55 des MOG (MOG 35-55), und Freudschem Adjuvans (10mg/ml). Das Adjuvans verstärkt die Reaktion der Immunzellen gegen das MOG-Peptid und fördert so die Antikörperbildung durch die B-Zellen. Zudem erfolgte nach 2-4h sowie nach weiteren 24h jeweils eine Injektion des inaktivierten bakteriellen Bordetella Pertussis Toxins (250ng in 200µl PBS i.p.). Einer weiteren Gruppe von Tieren (n=5) wurden nur das Adjuvans und das Pertussis Toxin appliziert. Diese Tiere bildeten die sogenannte Sham Gruppe (von Engl. sham = Schein; hier: Scheinbehandlung) und dienten als Kontrolltiere für die EAE-Induktion.

4.2.2 Das Therapieprotokoll mit PBN

Diesen Tieren (n=7) wurde wie oben beschrieben eine EAE induziert. Ab Tag 1 nach Immunisierung erhielten die Tiere über einen Zeitraum von 21 Tagen täglich eine Probenecid-Injektion in den Peritonealraum (i.p.). Appliziert wurden 100 mg/kg KG in Solvent (EAE-PBN). Eine weitere Versuchsgruppe (n=7) erhielt nach EAE-Induktion nur das entsprechende Lösungsmittel (Solvent), um mögliche Reaktionen der Tiere auf das Lösungsmittel zu erfassen. Die Solvent-Lösung hatte einen physiologischen pH Wert von 7,2-7,5 und enthielt 2250 µl 1 M Tris Lösung, 450 µl 2N NaOH (v/v), 37,5 µl 2N HCl und 12 ml 0,9% NaCl in H₂O dest. gelöst. Es wurden jeweils 200 µl PBN in Solvent bzw. nur das Solvent injiziert.

4.2.3 Versuchstiergruppen

Vor Beginn des Versuchsprotokolls wurden die Tiere in fünf Versuchsgruppen randomisiert unterteilt:

- 1) Kontrollen: Diese Tiere erhielten eine „Sham-Induktion“, bestehend aus Adjuvans und Pertussis Toxin-Injektion an Tag 0 und PTX an Tag 1.
- 2) EAE: Diese Gruppe wurde MOG-immunisiert und erhielt keine Therapie. Die Tiere wurden bei Erreichen vordefinierter Abbruchkriterien (Gewichtsverlust >20% bzw. Lähmung einer vorderen Extremität) oder spätestens nach 22 Tagen euthanasiert.
- 3) EAE/Solvent: Diese ebenfalls EAE-induzierten Tiere erhielten eine tägliche i.p. Injektion des Lösungsmittels (Solvent) ab Tag 1 nach EAE-Immunisierung für die Dauer von 21 Tagen.
- 4) EAE/PBN: Den EAE-induzierten Tieren dieser Gruppe wurde PBN in einer Dosierung von 100 mg/kg KG i.p. täglich injiziert. Die Gabe erfolgte ab Tag 1 nach EAE-Immunisierung über einen Zeitraum von 21 Tagen.
- 5) EAE/Score2: In diesen Tieren wurde ebenfalls eine EAE induziert. Sie wurden euthanasiert, sobald sie eine Hemiplegie der hinteren Extremität (d.h. Score 2; s.u.) ausbildeten.

4.2.4 Score-Einteilung der klinischen Symptomatik

Um den Scoreverlauf zu dokumentieren, wurden alle Tiere täglich auf neu aufgetretene und fortbestehende klinische Symptome untersucht. Der Grad der motorischen Beeinträchtigung wurde mittels eines Score-Systems erfasst: Dabei stand ein Score von 0 für keine Symptome, ein Score von 0,5 für eine Parese der Schwanzspitze, ein Score von 1 für eine komplette Schwanzparese, 1,5 für eine Schwanzparese mit leichter Plegie der hinteren Extremität, 2 für eine Hemiplegie der hinteren Extremität und ein Score von 2,5 für eine

beidseitige Plegie der hinteren Extremität. Tiere mit Score 3 hatten eine komplette bilaterale schwere Hinterbeinlähmung. Bei Score 3,5 trat, zusätzlich zur bilateralen Plegie der hinteren Extremität, eine beginnende Lähmung eines Vorderbeines auf. Bei Score 4 zeigten die Tiere eine Tetraplegie. Bei Eintreten des Todes (einschließlich bei Tötung der Tiere aufgrund des Erreichens der vordefinierten Abbruchkriterien) wurden die Tiere mit Score 5 belegt.

4.3 Organentnahme, Anfertigung der Präparate und Schnittverfahren

Die Versuchstiere wurden intraperitoneal mit Ketamin (100mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach Ausbleiben der Reflexe wurden die Tiere mittels Organentnahme getötet. Die Augen wurden entnommen und 1) als kompletter Bulbus in einheitlicher Lage (anterior-posteriore Ausrichtung) in Tissue-Tek O.C.T. eingebettet, in der Gasphase eines mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewar-Gefäßes eingefroren und schließlich bei -80°C kryokonserviert, und 2) in Paraffin eingebettet. Dafür wurden die Augen für 24h bei 4°C in phosphatgepufferter 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Nach der Fixierung wurden diese zunächst für weitere 24h in PBS gewaschen und durchliefen dann eine Alkoholreihe beginnend mit 70% 2-Propanol, anschließend 80% 2-Propanol, 90% 2-Propanol, 2 Stufen 100% 2-Propanol, 2 Stufen Benzoessäuremethylester und schließlich 2 Stufen auf 65°C erwärmtes, flüssiges Paraffin. Danach wurden die Gewebe ebenfalls in einheitlicher Lage ausgerichtet und mit flüssigem Paraffin in Metallförmchen zu Blöckchen gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Präparate bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Für die weitere histologische Analyse der entnommenen Gewebe wurden Schnittpräparate angefertigt, entweder am Kryostat oder am Mikrotom (s.u.).

Kryoschnitte der in Tissue-Tek O.C.T. eingebetteten Augen wurden am vorgekühlten Kryostat der Firma Leica angefertigt. Insgesamt wurden Serienschnitte von mindestens drei Präparaten pro Gruppe angefertigt. Pro Auge wurde eine Serie von fünf (Kryo-)Objektträgern von jeweils drei Schnitten angefertigt. Unter einer Schnittserie versteht man eine fortlaufende Schnittabfolge durch ein kontinuierlich geschnittenes Gewebe, bei der jeweils der nächste Schnitt auf den Folgeobjektträger aufgetragen wird. Hierdurch kann pro Objektträger ein Überblick über die gesamten geschnittenen Gewebeschichten gewonnen werden, wodurch die anatomischen Strukturen besser nachverfolgt werden können. Die Schnittachse lag transversal durch die Bulbi der Mäuse, so dass Querschnitte durch alle anatomischen Schichten des präparierten Auges entstanden. Dabei wurde die Schnittführung jeweils unter dem Mikroskop in hoher Kontrasteinstellung an einem Testschnitt pro Serie überprüft. Ziel war eine Schnittführung auf Höhe der Makularegion bzw Zone hoher Fotorezeptordichte um die Fovea centralis über die gesamte Serie. Während des Schneidevorgangs der

Kryopräparate lag die Temperatur zwischen -15°C und -19°C bei einer Schnittdicke von $6\mu\text{m}$.

Die Paraffinblöcke der entnommenen Augen wurden ebenfalls bei einer Schnittdicke von $6\mu\text{m}$ am Mikrotom der Firma Microm Heidelberg (HM 350) geschnitten. Auch hier wurden Serienschnitte (zehn Objektträger) von mindestens drei Augen je Versuchstiergruppe angefertigt. Zur Verdeutlichung der so entstandenen Gewebepreparate siehe Abbildung 6 (Kap. 4.5).

Die Kryo- und Paraffinschnitte wurden jeweils über eine halbe Stunde bei 36°C auf der Wärmeplatte getrocknet, anschließend lichtgeschützt bei Raumtemperatur (Paraffinschnitte) bzw bei 4°C im Kühlschrank (Kryoschnitte) gelagert und die Kryoschnitte innerhalb von 14 Tagen für die in dieser Arbeit beschriebenen Färbungen genutzt.

4.4 Färbungen

4.4.1 Immunfluoreszenz

Das Verfahren der Immunfluoreszenz wurde für drei verschiedene Antikörper an Kryoschnittserien durchgeführt. Die jeweils verwendeten Primäantikörper waren gegen RBPMS, Cx36 und RIBEYE gerichtet. Der grundsätzliche Ablauf der Färbung war für alle drei Antikörper gleich: Die Objektträger wurden zunächst für 10 Minuten bei -20°C in 100% Aceton fixiert. Danach wurden sie dreimal hintereinander für jeweils zehn Minuten in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) gestellt. Nach diesen Waschschrinen wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde in 10% Ziegenserum (normal goat serum; NGS) und 0,1% Triton in PBS inkubiert. Der Schritt diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie der Permeabilisierung der Zellen. Die Schnitte wurden mit einem Dakopen® umrandet, welcher eine Flüssigkeitsbarriere für Lösungen darstellt und diese so an den Schnitten hält. Als nächstes wurden die Primäantikörper in ihrer entsprechenden ausgetesteten Verdünnung in 10% NGS und 0,1% Triton Blockierlösung angesetzt: rabbit anti-RBPMS 1:500, rabbit anti-Cx36 1:100 und mouse anti-RIBEYE 1:100. Jeweils $50\mu\text{l}$ der entsprechend verdünnten Antikörper wurden auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4°C für etwa 16 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgten drei jeweils zehn Minuten andauernde Waschschrine in PBS. Anschließend wurden die Objektträger erneut blockiert, um unspezifische Bindungen der Sekundäantikörper zu verhindern. Hierzu wurden die Schnitte in 0,2% BSA (Bovine Serum Albumin) gelöst in PBS für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Sekundäantikörper aufgetragen und für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur zur Antikörperbindung belassen. Die Sekundäantikörper waren 1:3.000 in 0,2% BSA in PBS verdünnt. In den

Färbeserien mit Cx36 und RBPMS wurde ein Alexa 568-gekoppelter Sekundärantikörper (goat anti-rabbit) verwendet. Bei der RIBEYE-Färbung kam ein Alexa 568-gekoppelter Sekundärantikörper (goat anti-mouse) zum Einsatz. Abschließend wurden die Objektträger erneut in zwei Waschschritten von jeweils 10 Minuten mit PBS im Dunkeln gewaschen. Zuletzt wurden die Objektträger mit je 50 μ L DAPI Fluoromount G Lösung pro Objektträger eingedeckt und über Nacht im Dunkeln trocknen gelassen. Die so angefertigten Präparate wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.4.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)

Die Detektion mittels AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) wurde zur Anfärbung der aktiven Protease Cleaved Caspase 3 (CC3) in apoptotischen Ganglienzellen im Rahmen einer immunhistochemischen Färbung verwendet. Es wurden insgesamt 15 Objektträger mit je drei Paraffinschnitten gefärbt. Als Positivkontrolle wurden Paraffinschnitte einer murinen Milz mitgeführt. Die Färbung wurde durch Frau Caroline Bickelmann (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Leitung Univ.-Prof. Dr. M. Menger) durchgeführt.

Zu Beginn wurden die Schnitte zwecks Entparaffinierung für 30 Minuten bei 70°C auf eine Wärmeplatte gestellt. Darauf folgte eine absteigende Alkoholreihe mit folgenden Substanzen: Dreimal für jeweils 8 Minuten wurden die Schnitte in Xylol gestellt. Danach zweimal hintereinander für 5 Minuten in 100% Ethanol und abschließend jeweils für 3 Minuten in 90%, dann 80% und schließlich in 70% Ethanol. Es folgte ein 5-minütiger Waschschriff in H₂O dest. Anschließend wurden die entparaffinierten Schnitte für 15 Minuten in Zitratpuffer (0,01 M) bei 600 Watt in die Mikrowelle gegeben. Nachdem die Schnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen konnten, wurden sie abermals für 5 Minuten in H₂O dest. gewaschen. Anschließend wurden endogene Peroxidasen für 10 Minuten mit H₂O₂ (3%) deaktiviert, so dass AEC als natürliches Substrat der Meerrettich-Peroxidase (HRP) nur durch diese und nicht unspezifisch durch endogene Peroxidasen aktiviert wurde. Es folgte ein weiterer Waschschriff für 5 Minuten in H₂O dest. und anschließend für ebenfalls 5 Minuten in PBS. Anschließend wurden die Präparate für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 3% NGS in PBS blockiert. Danach wurden sie dreimal hintereinander für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen und für 15 Minuten zunächst mit Avidin geblockt und mit PBS gewaschen und anschließend mit Biotin ebenfalls für 15 Minuten geblockt. Abschließend erfolgte der letzte Waschschriff des ersten Tages durch abermals drei Mal 5 Minuten PBS. Nach dem Waschschriff wurde der Primärantikörper Rabbit Anti Cleaved Caspase 3 (Cell Signaling Technology D175, Lot No 0043) in der Verdünnung 1:100 in PBS auf die Schnitte pipettiert

und über Nacht für etwa 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Vormittag erfolgten zunächst wieder drei 5-minütige Waschschriffe der Objektträger in PBS. Anschließend wurde die Sekundärantikörper-Lösung mit Goat Anti Rabbit IgG Biotin unverdünnt (ready to use; Abcam) auf die Schnitte gegeben und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten erneut drei 5-minütige Waschschriffe in PBS. Nun schloss sich eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Streptavidin/POD (in PBS, ready to use) an. Dieses wurde mit PBS in drei Fünf-Minuten-Schritten abgespült. Nun wurde das entscheidende Substrat der Färbung, das AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) der Firma Abcam auf die Schnitte pipettiert und unter dem Mikroskop der Farbumschlag kontrolliert. Sobald die gewünschte rötliche Farbtintensität der CC3-positiven Zellen erreicht worden war, wurde die Reaktion mit H₂O dest. für alle Schnitte einheitlich gestoppt. Schließlich wurde die Kernfärbung durch Hämalaun durchgeführt, das Präzipitat des AEC durch Abstoppen in H₂O dest. fixiert und danach mit H₂O dest. gespült. Nach einem 8-minütigen „Bläuen“ in Leitungswasser erfolgte ein Farbumschlag des Hämalaun von rötlich zu bläulich. Abschließend wurden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt und für mindestens 16 Stunden getrocknet.

4.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung dient der strukturellen Anfärbung der verschiedenen Zellschichten der Augen zum morphologischen Vergleich. Für die H.E.-Färbung wurden Objektträger der gleichen Serie verwendet, aus der auch die AEC-Immunhistochemie angefertigt wurde. Die Paraffinpräparate wurden zunächst in einer in der Konzentration absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Für jeweils 5 Minuten wurden die Schnitte in einer Färbeschaukel zunächst drei Mal in Xylol gegeben, dann zweimal in 100% 2-Propanol, und jeweils nacheinander in 90% 2-Propanol und 80% 2-Propanol. Die entparaffinierten Schnitte wurden direkt aus der 80% 2-Propanol Lösung für 5,5 Minuten in Hämatoxylin nach Ehrlich gegeben. Danach wurden die Schnitte solange in H₂O dest. gespült, bis die überschüssige Farbe entfernt war bzw. die Schnitte keine weitere Farbe mehr an das Wasser abgaben. Nun folgte ein 12-minütiges Wässern der Schnitte unter fließendem Leitungswasser. Nach dem dadurch erfolgten Farbumschlag waren die Hämatoxylin-gefärbten Zellkerne blau gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Sekunden in H₂O dest. gereinigt. Als nächstes erfolgte die Gegenfärbung des Zytoplasmas durch 0,1 % Eosin in H₂O dest., versetzt mit zwei Tropfen Eisessig. Durch anschließendes 20-faches Eintauchen der Färbeschaukel für jeweils ca. eine Sekunde in 90% 2-Propanol wurde die gewünschte Farbtintensität des Eosins erreicht. Danach erfolgte die Fixierung der Färbung durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Hierzu wurden die gleichen Substanzen wie zur Entparaffinierung, allerdings in umgekehrter Reihenfolge, verwendet: Zweimal 5 Minuten wurden die Schnitte in 100% 2-

Propanol inkubiert, dann dreimal 5 Minuten in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit etwa 50 μl Roti-Histokitt-Lösung eingedeckt und für mindestens 16 Stunden unter dem Abzug trocknen gelassen.

4.5 Mikroskopie und Dokumentation

Die Mikroskopie der angefärbten Schnitte erfolgte samt Fotodokumentation für die spätere Auswertung innerhalb von 14 Tagen nach der Färbung. Bis dahin lagerten die Schnitte der Immunfluoreszenz bei 4°C im Kühlschrank, alle anderen bei 16-18°C (RT). Verwendet wurde das Fluoreszenzmikroskop Observer Z.1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Alle intakten Ganglienzellkörper einer Schnittserie, sichtbar gemacht durch die RBPMS-Färbung, wurden unter Verwendung des EC Plan-APO 40x/1,3 Oil (Carl Zeiss) Objektivs am Mikroskop direkt ausgezählt. In der späteren Auswertung konnte so ihre Verteilung pro Retinaquerschnitt ausgewertet werden.

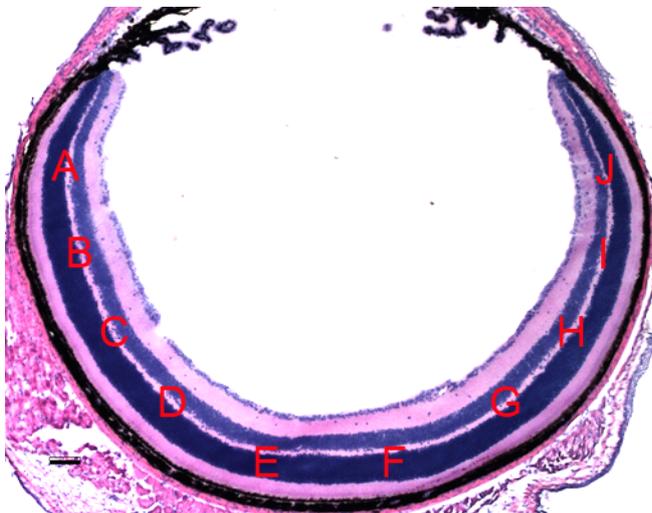


Abb. 6: 6 μm Schnitt durch den Bulbus in H.E.-Färbung

Gezeigt ist ein Schnitt in H.E.-Färbung durch den Bulbus, aufgenommen unter Verwendung des 5x Objektivs des Mikroskops Leica DM 2500 sowie der auf dem Mikroskop montierten Kamera Leica DEC 290 HD. Zu erkennen sind die einzelnen Schichten der Retina. Die Zellkerne stellen sich hier als blaue Bänder dar, die weiteren Schichten des Stratum nervosum in pink. Mit A-J sind die einzelnen Bildausschnitte, wie sie mit dem 20-fach Objektiv für die Immunfluoreszenz-Färbungen aufgenommen worden sind, bezeichnet. Maßstab 100 μm

Abschließend wurden die immunhistochemisch gefärbten Retinae fotografiert. Dabei wurde ein ganzer Schnitt durch neun bis zwölf jeweils aneinandergrenzende Bildausschnitte (siehe Abbildung 6) unter Verwendung des EC Plan-Apochromat 20x (Carl Zeiss) Objektivs und des Software Programms AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) fotografiert. Zu Anfang einer Fotoreihe wurde jeweils für eine ganze Färbeserie eine einheitliche Belichtungszeit bestimmt und beibehalten. Das Aufnahmelicht wurde durch eine im Mikroskop integrierte Halogenlampe (HXP 120C, Carl Zeiss) sowie Filter 43HE für rotes Licht (entsprechend der verwendeten

Sekundärantikörper im 568 nm Lichtspektrum) und Filter 49HE für blaues Licht (zur Darstellung der DAPI Zellkern Färbung) der Firma Carls Zeiss generiert.

Für die Fotografie der HE und AEC-Immunhistochemie kamen das Mikroskop Leica DM 2500 sowie die auf dem Mikroskop montierte Kamera Leica DEC 290 HD zum Einsatz. Es wurden jeweils lichtmikroskopische Aufnahmen unter Verwendung des Objektivs (0.40, PH1, $\infty/0.17/D$) 20x für die HE- und AEC-Färbung sowie unter Verwendung des (0.65, PH2, $\infty/0.17/D$) Objektivs 40x für die AEC-Färbung gemacht.

4.6 Analyseverfahren und Datenerhebung

Die Daten der Färbungen wurden durch verschiedene Methoden erhoben:

Für die Färbungen CC3 (AEC Färbung) und RBPMS (Immunfluoreszenz) wurde die Zahl der immunpositiven Zellen pro Schnitt am Mikroskop ausgezählt. Ausgewertet wurden nur gut erkennbare RBPMS-Zellen bzw. CC3-immunpositive Ganglienzellen. Zudem erfolgte exemplarisch eine Fotodokumentation der entsprechenden Färbungen.

Für die Färbungen RIBEYE und Cx36 erfolgte die Auswertung mithilfe der Computersoftware ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) (HAINZ et al., 2017b), an Hand ihrer Signalfäche pro Flächeneinheit der Retina vermessen. Es wurden Einzelaufnahmen der verschiedenen retinalen Abschnitte ohne überlappende Bildbereiche erstellt. Ausgewertet wurden dabei nur die Bilder der zentralen Retinaregion, welche der humanen Makularegion entsprechen, und nicht die Randbereiche um die Pars plana-Region, welche nur wenige Sehsinneszellen besitzt und höhere natürliche Expressionsschwankungen der untersuchten Proteine unter den Wildtyptieren aufweist (SOHL et al., 1998; STRIEDINGER et al., 2005). Analysiert wurden in dieser Arbeit für das Cx36 die immunpositiven Bereiche der inneren plexiformen Schicht und für das RIBEYE die in der äußeren plexiformen Schicht. Es wurden jeweils mehrere Schnitte verschiedener Tiere (mindestens $n=3$ pro Gruppe) ausgewertet und jeweils die gleichen Abschnitte der Retina miteinander verglichen. Hieraus ergab sich die entsprechende Datenmenge für die spätere statistische Auswertung. Um systematische Fehler durch die schwankende Signalintensität der Einzelbilder zu minimieren, wurde für die gesamte Serie ein Threshold-Wert im Computerprogramm festgelegt und für jedes Bild gleich eingestellt (Signalintensität als Schwarz-Weiß-Kontrast). Anschließend wurde die Bildfläche manuell auf das jeweilige Signalfeld der entsprechenden Färbung reduziert und so der Hintergrund des Bildes ausgeschnitten. Hierdurch wurde dieser in der anschließenden Messung nicht miterfasst und nur die angefärbten immunpositiven Bereiche ausgemessen. Der Flächenanteil des Immunsignals des Threshold-Bildes wurde dann im Programm ImageJ als prozentualer Flächenanteil berechnet. Die Auswertung erfolgte verblindet in zufälliger Reihenfolge der Einzelbilder und wurde abschließend den Versuchsgruppen zugeordnet.

4.7 Statistik

Die statistische Auswertung der gemessenen und ausgezählten Werte erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Bei dem hier angewendeten Studiendesign handelt es sich um eine RCT (randomisiert-kontrollierte) Studie, welche unverbundene quantitativ stetige Zielvariablen entsprechend der One-Tail-Arbeitshypothesen untersucht. Für die immunhistochemischen Färbungen zu CC3, Cx36, RIBEYE und RBPMS wurde wie folgt vorgegangen. Zunächst erfolgte für alle erhobenen Daten ein Test auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov Test. Da die erhobenen Daten der immunologischen Färbungen nicht normalverteilt waren, fand hier entsprechend der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test für nicht normalverteilte unverbundene quantitative stetige Merkmale Anwendung. Es wurden immer mindestens drei verschiedene Gruppen analysiert. Ziel war es, zunächst herauszufinden, ob es Unterschiede zwischen den verschiedenen Daten der Gruppen gab. Zudem wurden durch die deskriptive Statistik die Streu- und Lageparameter bestimmt. Mittels des anschließend angewendeten Dunn`s multiple comparisons Tests wurden die genauen statistischen Unterschiede berechnet.

Für die klinische Symptomentwicklung der Tiere waren die jeweiligen Score-Werte an jedem Versuchstag erhoben und verglichen worden. Für den Vergleich zwischen Kontrolle und EAE (Abb.7) sowie Kontrolle und EAE/Sc2 (Abb.8) wurde mittels Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung getestet. Da die Daten nicht normalverteilt waren und jeweils nur zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, fand der Mann-Whitney-Test für One-Tail-Hypothesen Anwendung. Für den Vergleich der Gruppen Solvent, EAE/PBN und Kontrolle (Abb.18) wurden die Daten mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Da die Daten nicht normalverteilt waren, fand hier entsprechend der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test für nicht normalverteilte unverbundene quantitative stetige Merkmale Anwendung. Die Berechnungen erfolgten separat für jeden Tag des Experiments.

Das Signifikanzniveau für alle Daten dieser Arbeit wurde auf $p < 0,05$ (5%) gesetzt. Für die entsprechend ermittelten signifikanten p-Werte wurde in dieser Arbeit folgende Illustration verwendet: * entspricht $0,01 < p < 0,05$; ** entspricht $0,001 < p \leq 0,01$; *** entspricht $0,0001 < p \leq 0,001$.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der Effekte der EAE auf die Retina

Bereits in der frühen Pathogenese der MS ist das visuelle System der Patienten durch eine Entzündung des Nervus opticus, eine Retrobulbärneuritis sowie Ganglienzelldegeneration in der Retina mitbeteiligt (BEYER, BERTHOUD, 2018a; BRUZZONE et al., 2003; HUANG et al., 2018; LARABEE et al., 2016; SYC et al., 2012). Verschiedene Arbeiten legen nahe, dass es nicht bei dieser primären Läsion im Stratum ganglionare bleibt (AKOPIAN et al., 2014; AKOPIAN et al., 2016; FRANTSEVA et al., 2002), sondern es zu weiteren sekundären oder parallel auftretenden Schäden in der Retina kommt. Laut der Bystander-Hypothese könnten sich neurotoxische Moleküle über Kanalproteine in benachbarte Zellschichten der Retina ausbreiten und dort zu einer degenerativen Abnahme der Synapsendichte führen und das Expressionsmuster verschiedener Zellproteine verändern (DAVIDSON et al., 2015; ISHII, ROHRER, 2017; OU et al., 2016; STRIEDINGER et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde hypothetisch angenommen, dass die EAE im Tiermodell zu vergleichbaren Effekten wie die MS führt und es ebenfalls zur neuronalen Zellschädigung in der Netzhaut kommt. Hierzu wurde über Detektion der Cleaved-Caspase-3 Apoptose in retinalen Zellen untersucht (CUBILLA et al., 2013). Zudem kann mittels Anfärbung der Ganglienzellen über das RNA-binding protein with multiple splicing (RBPMS) das Ausmaß des durch die EAE induzierten Ganglienzellschadens quantifiziert werden. Des Weiteren ist es möglich, mit Hilfe der Analyse der Connexin 36- (elektrische Synapsen und wichtiges Gap junction-Protein der Retina) und RIBEYE- (chemische Synapsen der Fotorezeptoren) Expression den konsekutiven Untergang von retinalen synaptischen Verbindungen zu untersuchen, welche elementar für den Sehvorgang sind. Es interessiert hier zudem, wie sich die zellulären Strukturen in der Netzhaut durch die EAE verändern. Hierdurch wäre es möglich, die pathophysiologischen Mechanismen neurodegenerativer Erkrankungen, die zu sekundären Läsionen und größeren primären Läsionszonen in der Retina führen, besser zu verstehen.

5.1.1 Analyse der EAE-induzierten Symptome

Zunächst wurde der Effekt der EAE-Induktion auf die Motorik der Tiere untersucht. Es wurde angenommen, dass es durch die Induktion der EAE zu messbaren Paralysen der Tiere kommt. Die gemessenen Paralysegrade wurden für den Zeitraum des Experimentes als Score-Werte festgehalten und ausgewertet. Es wurden hier die Daten aller Versuchstiere des Experimentes statistisch ausgewertet. Siehe hierzu die nachfolgenden Abbildungen 7 und 8.

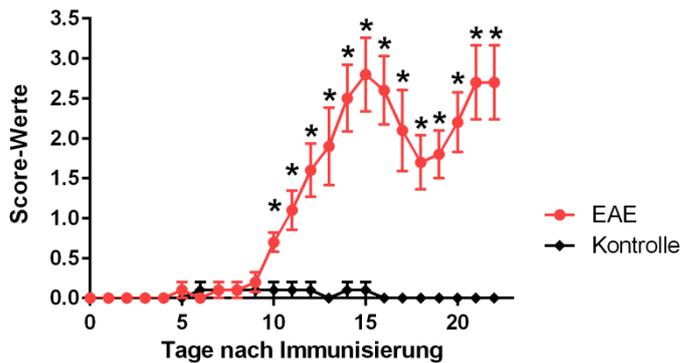


Abb. 7: Zeitlicher Kurvenverlauf der Score-Werte der Tiere der Gruppen EAE und Kontrolle

Abgebildet ist der zeitliche Verlauf der Score-Werte der EAE-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 0 der EAE-Induktion. Aufgetragen sind jeweils die täglich erreichten Mittelwerte (rote Punkte für die EAE-Tiere und schwarze Rauten für die Kontrollgruppe) mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM) und signifikante Unterschiede der Score-Werte der Kontrolltiere an einem Behandlungstag im Vergleich zur EAE-Gruppe ($*p < 0,05$). Ab Tag 10 unterschied sich die EAE-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe.

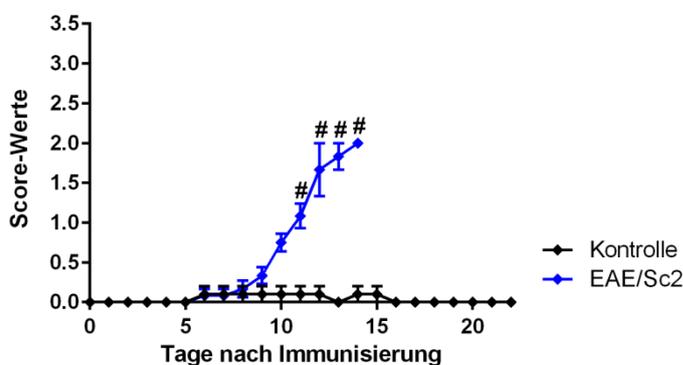


Abb. 8: Zeitlicher Kurvenverlauf der Score-Werte der Tiere der Gruppen EAE/Sc2 und Kontrolle

Abgebildet ist der zeitliche Verlauf der Score-Werte der EAE/Sc2-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 0 der EAE-Induktion. An Tag 14 erreichten die EAE-Tiere im Mittel einen Score von 1,8. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie zur Organentnahme euthanasiert. Aufgetragen sind jeweils die täglich erreichten Mittelwerte (blaue Rauten für die EAE/Sc2-Tiere und schwarze Rauten für die Kontrollgruppe) mit dem jeweiligen Standardfehler (SEM); sowie signifikante Unterschiede der Score-Werte der Kontrolltiere an einem Behandlungstag im Vergleich zur EAE/Sc2-Gruppe ($\#p < 0,05$).

Wie den Diagrammen zu entnehmen ist, wiesen die Messungen der motorischen Reaktion der EAE-Tier-Gruppe nach der EAE-Induktion auf eine sich entwickelnde Paralyse hin: Die EAE-Gruppe erreichte an Tag 22 nach EAE-Induktion im Mittelwert einen Score von 2,58, was einer beidseitigen Lähmung der hinteren Extremität entspricht. Nach 11 Versuchstagen zeigten einige der EAE-Tiere als erstes Symptom die Paralyse des Schwanzes (Score 0,5). Ab diesem Tag bis zum Ende des Experimentes unterschied sich die EAE-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) und zeigte einen durchgehend schwereren klinischen Verlauf.

Die EAE/Sc2 Gruppe unterschied sich ebenfalls ab Tag 11 durchgehend signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Der Mittelwert der Scores der EAE/Sc2 Gruppe an Tag 14 lag bei 1,8. Die klinische Symptomausprägung der beiden hier analysierten EAE-Gruppen verlief während der ersten 14 Tage nach EAE-Induktion nahezu parallel; dann jedoch erreichten die Tiere der EAE/Sc2 Gruppe innerhalb weniger Tage (Tag 14 ± 1) Score 2 und wurden entsprechend aus dem Versuch genommen. Somit konnte ein Zeitpunkt bestimmt werden, an welchem die Tiere ähnlich weit fortgeschrittene Symptome zeigten. Durch die Induktion der EAE zeigten die Tiere eine typische Symptomatik der Motorik, wie sie auch in früheren Studien nachgewiesen werden konnte (ROBINSON et al., 2014).

Nachdem die klinische Symptomatik der Tiere untersucht und analysiert worden war, wurde die Analyse der retinalen Neurone, welche potentiell über retrograde Degeneration des N. opticus und sekundäre Pathomechanismen geschädigt werden, durchgeführt.

5.1.2 Lichtmikroskopische Auswertung der H.E.-Färbung

In der ersten Hypothese dieser Arbeit wurde angenommen, dass in der Retina ein struktureller Zellschaden durch die EAE über den optischen Nerv und aktivierte retinale Immunzellen induziert wird. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der H.E.-Färbung dienten dazu, mögliche morphologische Veränderungen in den Retinae nachzuweisen. Es konnten alle Schichten der Netzhaut in der H.E.-Färbung dargestellt und beurteilt werden. Exemplarisch sind hier fotografische Abbildungen der H.E.-Färbung der Retinae aus den Versuchsgruppen Kontrolle, EAE und EAE/Sc2 aufgeführt (Abb. 9)



Abb. 9: Ausschnitt der Retina in H.E.-Färbung

Exemplarisch sind drei Ausschnitte in H.E.-Färbung von Retinae der Kontroll-Gruppe (A) der EAE- (B) und der EAE/Sc2 (C)-Gruppe gezeigt. Die verschiedenen Schichten der Retina sind mit römischen Zahlen eingetragen: I=Ganglienzellen, II=Innere plexiforme Schicht, III=Innere Körnerschicht, IV=Äußere plexiforme Schicht, V=Äußere Körnerschicht, VI=Innensegmente (Fotorezeptoren), VII=Außensegmente (Fotorezeptoren), VIII=Pigmentepithel. Abgebildet sind jeweils zentrale Retinaausschnitte. Die Zellkerne stellen sich in der H.E.-Färbung als dunkelblaue Körnerstrukturen dar. Die weiteren Schichten des Stratum nervosum stellen sich in pink dar. Maßstab in A für A-C 100 µm.

In den Fotografien der jeweiligen Schnitte ließen sich im Vergleich der Einzelbilder Veränderungen in der Zelldichte und -morphologie sowie der Geschlossenheit des Zellverbandes im Stratum ganglionare und teilweise auch in weiteren retinalen Schichten beobachten. Allerdings konnten in der H.E.-Färbung die einzelnen Zelltypen mikroskopisch nicht genau bestimmt werden, so dass keine eindeutige Auszählung etwa der Ganglienzellen möglich war. Die größte Homogenität im Erscheinungsbild zeigten lichtmikroskopisch die Schnitte der Kontrolltiere. Die anderen Gruppen wiesen teilweise Veränderungen wie etwa eine geringere Zelldichte im Stratum ganglionare und vermehrt dislozierte Zellen zwischen den einzelnen Laminae auf (exemplarisch in Abb. 9 C zu erkennen). Allerdings traten diese Abweichungen in unterschiedlichem Ausmaß auf, so dass morphologische Veränderungen in den einzelnen Versuchsgruppen nicht mit gleicher Häufigkeit zu finden waren.

5.1.3 Apoptose-Nachweis im Stratum ganglionare mittels CC3

Zum Nachweis von Apoptose in der Retina wurde immunhistochemisch CC3 angefärbt und mittels der AEC(3-Amino-9-Ethylcarbazol)-Detektion sichtbar gemacht. Bei AEC handelt es sich um ein natürliches Substrat der Meerrettich-Peroxidase, das durch Redoxvorgänge in ein Präzipitat umgewandelt wird und fest bindet (WAGNER, 1975) (siehe Methoden Kap. 4.4.2 Immunhistochemie). Das Präzipitat ist rot gefärbt und lässt sich so per Lichtmikroskopie nachweisen und fotografisch dokumentieren. Die mikroskopische Auswertung der CC3-immunpositiven Zellen pro Retinaanschnitt (gesamte Retina im Transversalschnitt, verblindet ausgezählt) ergab Folgendes: In den verschiedenen Schnitten waren je nach Gruppe unterschiedlich viele CC3-immunpositive Zellen im Stratum ganglionare zu erkennen (absolute Zahlen), nicht jedoch in anderen retinalen Schichten. Es wurden mehrere Schnitte pro Retina und Tier ausgezählt. Die Zellen waren eindeutig auszählbar und von den CC3-immunnegativen Zellen zu unterscheiden (Vgl. Abb. 10).

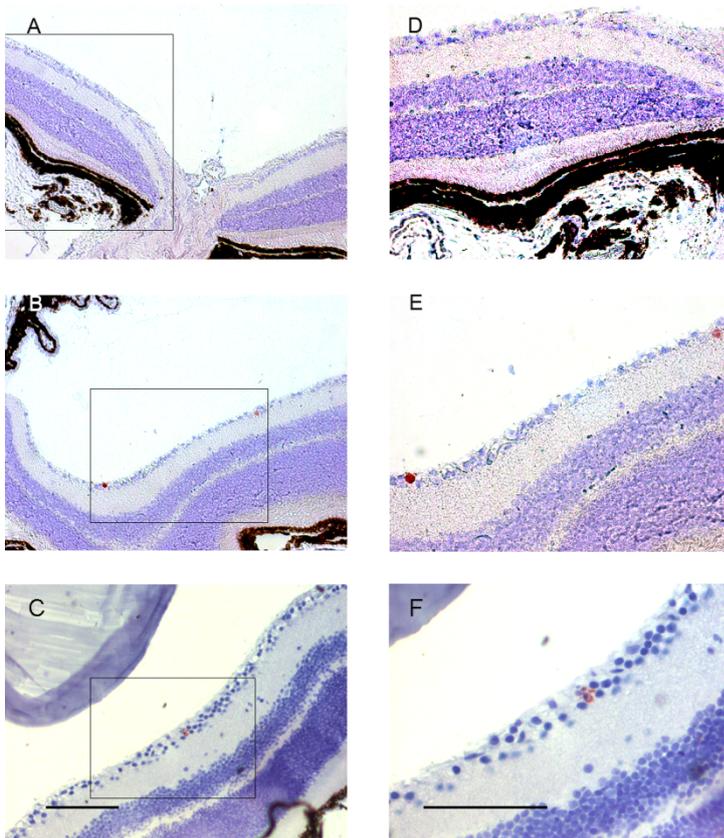


Abb. 10: CC3 Immunhistochemie an Retinaschnitten

Bild A und D zeigen einen Ausschnitt eines Retinaschnittes der CC3-Immunhistochemie eines Kontrolltiers. Bild A zeigt das Areal des Austritts der Ganglienzell-Axone in den N. opticus. Bei Bild D handelt es sich um Aufnahmen in einer höheren Vergrößerung desselben Retinaabschnittes. Bild B und E zeigen die Retina eines EAE-Tieres (E zeigt einen Ausschnitt aus B). Im Stratum ganglionare sind zwei CC3-immunpositive Zellen in rot zu erkennen. Die restlichen CC3-immunnegativen Zellkerne stellen sich in allen Bildern blau-lila dar. Die Bilder C und F zeigen ein EAE/Sc2-Tier (F zeigt einen Ausschnitt aus C). Die CC3-immunpositiven Zellen stellen sich unter dem Lichtmikroskop hell- bis dunkelrot dar. In Abbildung F ist die apoptotische Fragmentierung eines Zellkernes einer CC3-immunpositiven Ganglienzelle zu erkennen. Maßstab 100 μm in C für A-C und 100 μm in F für D-F.

Die untersuchten Kontrolltiere wiesen keine CC3-immunpositiven Zellen auf. Die EAE-Gruppe hingegen wies zwischen einer und vier CC3-positiven Zellen pro Retinaschnitt auf. Es wurden mehrere komplette Retinaschnitte pro Tier mikroskopisch verblindet ausgezählt. Die Ergebnisse der Quantifizierung der CC3-immunpositiven Zellen in den Retinae sind in Abbildung 11 gezeigt.

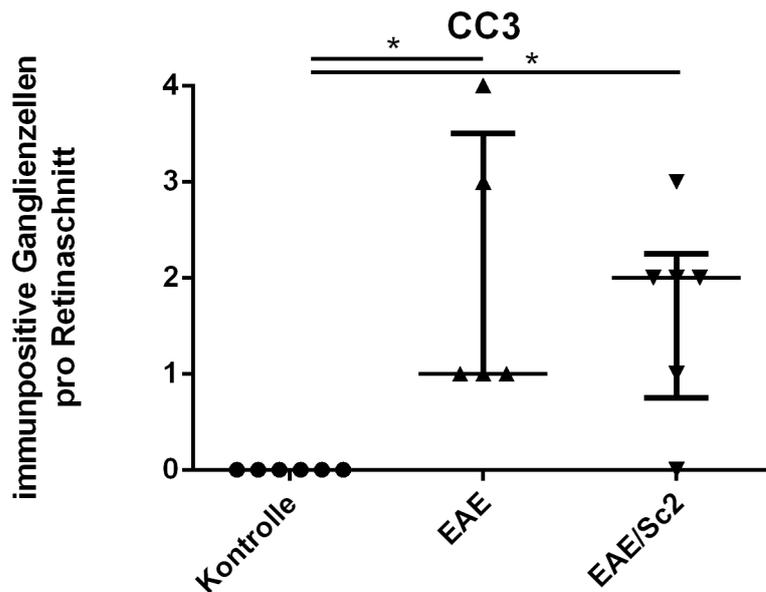


Abb. 11: CC3-immunpositive Zellen pro Retinaschnitt der Tiere der Gruppen EAE, EAE/Sc2 und Kontrolle

Abgebildet sind die CC3-immunpositiven Zellen pro Retinaschnitt als Marker für apoptotischen Zelltod im Stratum ganglionare (absolute Zahlen, schwarze Punkte und Dreiecke). Gezeigt ist der Median, so wie die 25% und 75% Perzentile mehrerer Retina-Schnitte pro Tier. Sowohl in der EAE-Gruppe als auch in der EAE/Sc2-Gruppe sind signifikant mehr CC3-immunpositive Ganglienzellen vorhanden als in der Kontrollgruppe (* $p < 0,05$).

Die EAE-Gruppe wies einen Median von 1 und maximal 4 CC3-immunpositive apoptotische Zellen pro Retinaschnitt im Stratum ganglionare auf, während es keine CC3-immunpositiven Zellen bei der Kontrollgruppe gab. Auch die EAE/Sc2-Gruppe wies einen Median von 2 und maximal 3 CC3-immunpositive apoptotische Zellen auf. Der p-Wert war $< 0,05$. Somit unterscheiden sich die EAE-Gruppe und die EAE/Sc2-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe.

5.1.4 Analyse des ganglionären Zellschadens mittels RBPMS-Immunfluoreszenz

Um das Ausmaß des Ganglienzelluntergangs durch die EAE in der Retina zu bestimmen, wurden die mit Antikörpern gegen den spezifischen Ganglienzellmarker RBPMS markierten Zellen ausgezählt. RBPMS wird nur in retinalen Ganglienzellen exprimiert und steht für „RNA-binding protein with multiple splicing“, kurz RBPMS (RODRIGUEZ et al., 2014). Das Protein besitzt ein RNA-Erkennungssegment, an welches RNA-Stränge gebunden und gespliced werden können. Das RBPMS-Protein ist durch homologe Sequenzen zwischen Maus und Mensch in beiden Spezies spezifisch in den Ganglienzellen zu finden (OBARA et al., 2016; RODRIGUEZ et al., 2014). Das RBPMS-Protein ist sowohl im Nucleus, den Nucleoli als auch im Zytoplasma der Ganglienzellen enthalten (OBARA et al., 2016). Amakrine Zellen und Mikroglia, welche sich ektop auch im Stratum ganglionare befinden

können, exprimieren hingegen kein RBPMS (RODRIGUEZ et al., 2014). Diese Eigenschaften machen RBPMS zu einem geeigneten Ganglienzellmarker in der murinen Retina.

Es wurde jeweils ein kompletter intakter Retinaschnitt pro Tier von Ora serata zu Ora serata mikroskopisch verblindet ausgezählt. Die Ganglienzellen waren in der RBPMS-Immunfluoreszenz durch ihre rot angefärbten Somata mit stark fluoreszierendem Nucleus zu erkennen. In den durch die EAE geschädigten Retinae konnte man eine deutlich geringere Anzahl intakter Ganglienzellen erkennen. Exemplarisch für die Ergebnisse der RBPMS-Immunfluoreszenz siehe Abbildung 12.

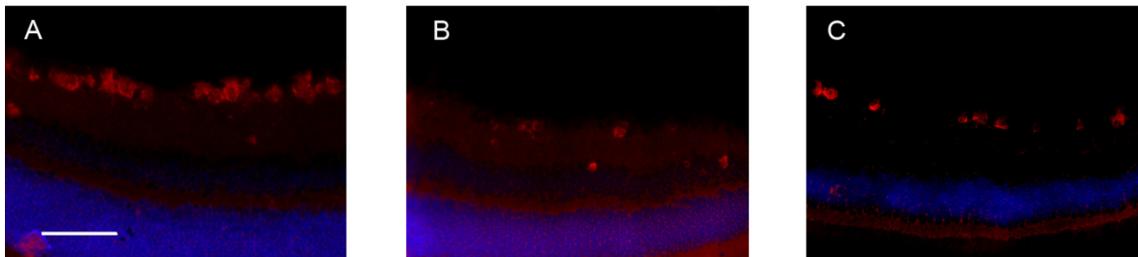


Abb. 12: Retinae der drei Versuchstiergruppen EAE, EAE/Sc2 und Kontrolle

Die Bilder A, B und C zeigen fluoreszenzmikroskopische Ausschnitte von Retinanschnitten eines Kontrolltiers (A), eines EAE-Tieres (B) und eines EAE/Sc2-Tieres (C). Die RBPMS-immunpositiven Ganglienzellen stellen sich unter dem Fluoreszenzmikroskop hell- bis dunkelrot dar. Zu erkennen ist ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der immunpositiven Zellen der verschiedenen Tiere. Die DAPI-gefärbten Zellkerne der inneren Körnerschicht stellen sich als blaues Band leuchtend dar. Maßstab 100 μm in A für A-C.

Die absoluten Zellzahlen pro Retinaanschnitt wurden für die verschiedenen Gruppen graphisch in Abbildung 13 aufgetragen.

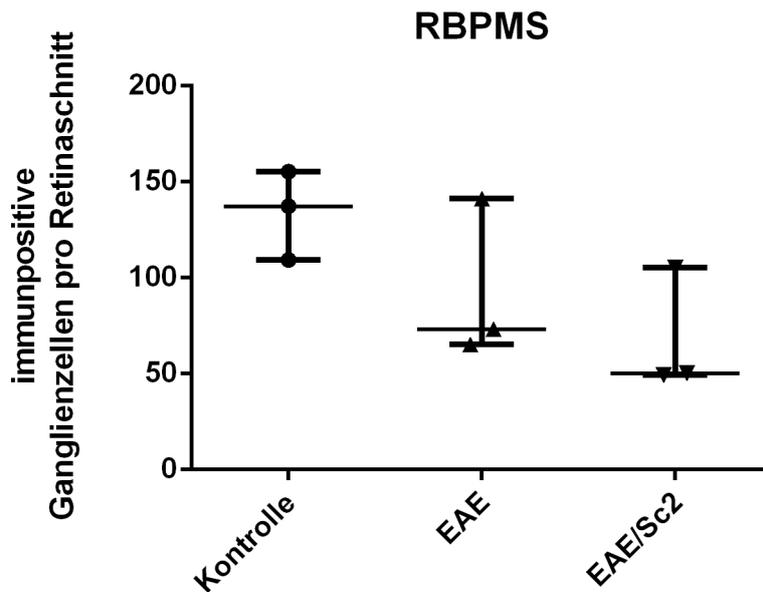


Abb. 13: Anzahl RBPMS-immunopositiver Zellen pro Retinaschnitt

Abgebildet ist die absolute Anzahl RBPMS-immunopositiver Ganglienzellen pro einem Retinaanschnitt der drei Gruppen: Kontrolle (schwarze Punkte), EAE (schwarze Dreiecke mit Spitze nach oben) und EAE/Sc2 (schwarze Dreiecke, nach unten gerichtet). Ein Punkt im Diagramm entspricht dabei dem berechneten Median der Summe aller ausgewerteten Schnitte. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane sowie die 25% und 75% Perzentile einer jeden Gruppe.

Die Mediane der beiden Versuchsgruppen, in denen EAE induziert wurde, lagen deutlich unter dem der Kontrolltiere. Der Median der Kontrollgruppe lag bei 137 Zellen, bei der EAE-Gruppe bei 73 Zellen, und die EAE/Sc2-Gruppe hatte einen Median von 50 intakten Zellen pro Retinaschnitt. Wie in der Graphik erkennbar, gab es in der EAE-Gruppe einen Wert von 141 RBPMS-immunopositiven Zellen. Ebenfalls zeigte ein Tier der EAE/Sc2-Gruppe sehr hohe Werte von 105 Zellen. Dieser Wert liegt über der 25%-Perzentile der Kontrollgruppe.

Die statistische Analyse mit dem nonparametrischen Kruskal-Wallis-Test ergab, dass der exakte p-Wert bei 0,1321 lag und sich somit die EAE-Tiere nicht signifikant von den Kontrolltieren unterschieden ($p > 0,05$). Dennoch zeigen die Differenzen zwischen den Werten der Mediane der drei Gruppen eine Richtung der Rohdaten zu deutlich weniger intakten Ganglienzellen der EAE-Tiere und EAE/Sc2-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Entsprechend geben diese Daten einen Hinweis dafür, dass neben Apoptose noch weitere Mechanismen der Zelldegeneration in der inneren Retina stattfinden, resultierend in einer geringeren Ganglienzellzahl. Weniger Ganglienzellen im Stratum ganglionare könnten in einer Abnahme der Synapsen davorliegender Neurone, etwa den bipolaren Zellen in der inneren plexiformen Schicht, resultieren.

5.1.5 Analyse der Cx36-Expression in der inneren plexiformen Schicht

Die mögliche Abnahme elektrischer Synapsen in der inneren plexiformen Schicht der Retina und gegebenenfalls Änderungen in der Connexin-Expression unter EAE wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen Cx36 gerichteten Primärantikörper analysiert. In der Retina wird das neuronale Cx36 sowohl in der inneren als auch in der äußeren plexiformen Schicht exprimiert (SOHL et al., 1998; SOHL et al., 2010). Der Fokus dieser Arbeit lag auf der inneren plexiformen Schicht. Bereits beim optischen Vergleich der Aufnahmen der Färbung waren Unterschiede in der Signalintensität und der Dichte innerhalb der Connexin-Verteilung zwischen den EAE-Gruppen und den Kontrolltieren zu erkennen. Die Cx36-Immunfluoreszenz war als hellrot gefärbte Zone in den Retinae zu erkennen und deutlich von den anderen Schichten abgrenzbar (siehe Abb. 14).

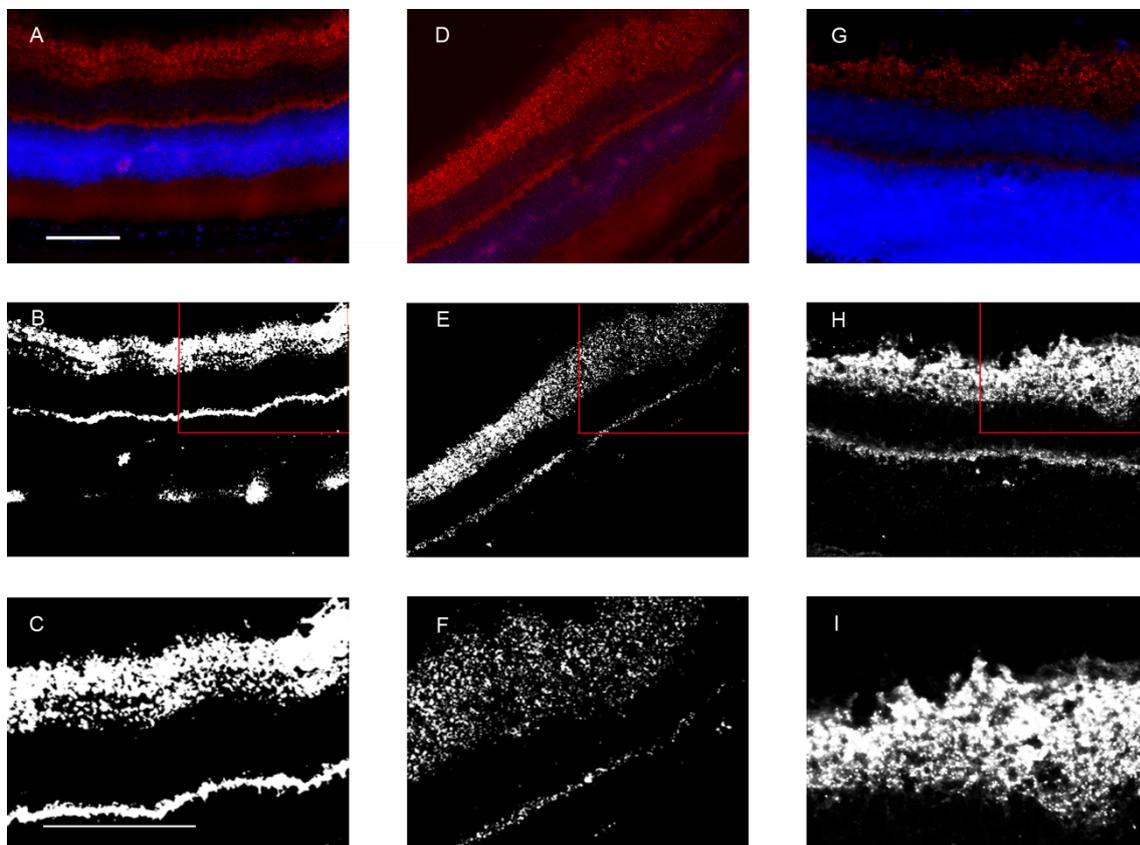


Abb. 14: Fluoreszenzbilder und in ImageJ ausgewertete Bilder der Cx36-Immunfluoreszenz

Gezeigt sind exemplarische Aufnahmen der Cx36-Immunfluoreszenzen sowie der Threshold Bilder (gedeckelte Signalstärke) für die anschließende Auswertung in ImageJ. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder A, D und G zeigen Ausschnitte von Retinaschnitten eines Kontrolltiers (A), eines EAE-Tieres (D) und eines EAE/Sc2-Tieres (G). Die Cx36-immunpositiven Areale der plexiformen Schichten stellen sich hellrot leuchtend dar. Die DAPI-gefärbten Zellkerne der inneren Körnerschicht sind als leuchtendes blaues Band zu erkennen. Die Bilder B, E und H zeigen die Threshold Bilder A, D und G. In den sogenannten Threshold-Bildern stellen sich die Cx36-immunpositiven Areale weiß dar. Bei den Bildern C, F und I handelt es sich um

Ausschnittsvergrößerungen von B, E und H. Es sind deutliche Unterschiede in der Flächendichte der Cx36-Expression zu erkennen. Maßstab 100µm in A für A-H und in C für C-I.

Die statistische Analyse ergab deutliche Unterschiede des medianen Flächenanteils des Cx36 in der inneren plexiformen Schicht. Somit lagen die Werte der EAE-Tiere (Median) etwa bei der Hälfte des Flächenanteils der Kontrolltiere (siehe Abb.15). Es wurden hier spezifisch die Flächensignale der inneren plexiformen Schicht ausgewertet.

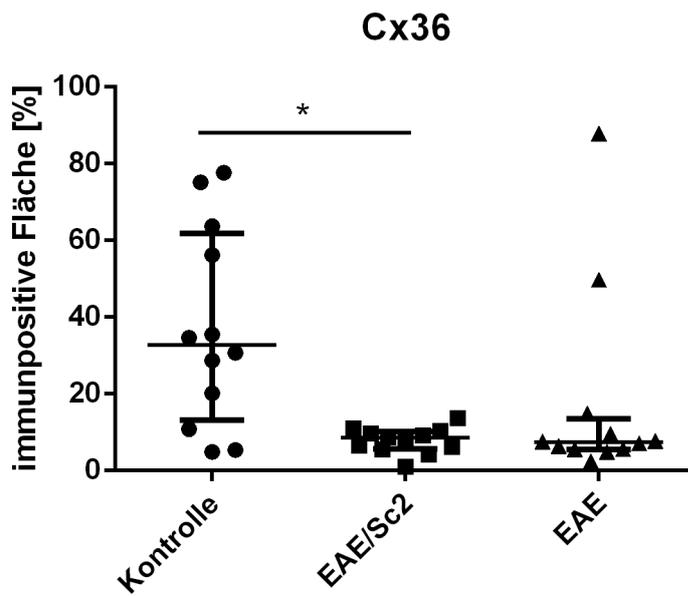


Abb. 15: Cx36-immunpositive Fläche pro Retinaanschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/Sc2 und EAE

Dargestellt ist die prozentuale Cx36-immunpositive Fläche (Expression des Cx36) pro gemessenem Abschnitt der inneren plexiformen Schicht der Retinaanschnitte (jeweils als schwarze Punkte, Quadrate und Dreiecke gezeigt). Aufgetragen sind die Mediane sowie die 25% und 75%-Percentile der Gruppen Kontrolle, EAE/Sc2 und EAE. Zwischen den Gruppen Kontrolle und EAE/Sc2 besteht ein signifikanter Unterschied (*p-Wert <0,05).

Wie dem Diagramm zu entnehmen ist, gab es sowohl innerhalb der Kontroll- als auch der EAE-Gruppe eine sehr hohe Streubreite der einzelnen Messwerte. Der Median der Kontrollgruppe lag bei 32,59%, bei der EAE-Gruppe lag er bei 7,25% immunpositivem Flächenanteil. Deutlich homogener um den Median von 8,48 % immunpositivem Flächenanteil der inneren plexiformen Schicht waren die Messwerte in der EAE/Sc2-Gruppe verteilt. Somit lagen die Werte der EAE-Tiere (Median) etwa bei der Hälfte des Flächenanteils der Kontrolltiere. Die Kontrolle unterschied sich signifikant (p-Wert <0,05) von der EAE/Sc2-Gruppe. Entsprechend zeigen die Daten eine Abnahme der neuronalen elektrischen Synapsen in der inneren plexiformen Schicht, also der inneren Synapsenzone der bipolaren Zellen, unter EAE.

5.1.6 Nachweis der Degeneration chemischer Ribbon-Synapsen der Sehsinneszellen

Zum Nachweis einer möglichen Veränderung der chemischen Synapsen wurde das Protein RIBEYE der Ribbon-Strukturen innerhalb der Präsynapsen der Fotorezeptoren analysiert. Die Synapsen der Fotorezeptoren besitzen in der Präsynapse eine funktionell wichtige Bandstruktur (daher der englische Name „Ribbon Synapse“ = Band-Synapse), die eine Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran ermöglicht (SCHWARZ, SCHMITZ, 2017). Diese Fusion wiederum führt zur Neurotransmitterfreisetzung (WANG et al., 2018). Ein molekularer Bestandteil der Ribbon-Strukturen ist das bereits in der Einleitung (Kap.1.3.1) beschriebene Strukturprotein RIBEYE (SCHMITZ et al., 2000).

Im Zuge der quantitativen Datenanalyse konnte festgestellt werden, dass die EAE zu einer ausgeprägten Abnahme der RIBEYE-immunpositiven Fläche der chemischen Ribbon Synapsen führt. Die RIBEYE-Immunmarkierung ist als breites Band rot-fluoreszierender Strukturen in der äußeren plexiformen Schicht zu erkennen. Diese entspricht der Synapsenzone der Fotorezeptoren mit den bipolaren Zellen. Die Unterschiede in der Verteilungsdichte innerhalb der drei in diesem Teil untersuchten Gruppen sind in der unten gezeigten Fluoreszenz-mikroskopischen Abbildung zu erkennen (Abb. 16).

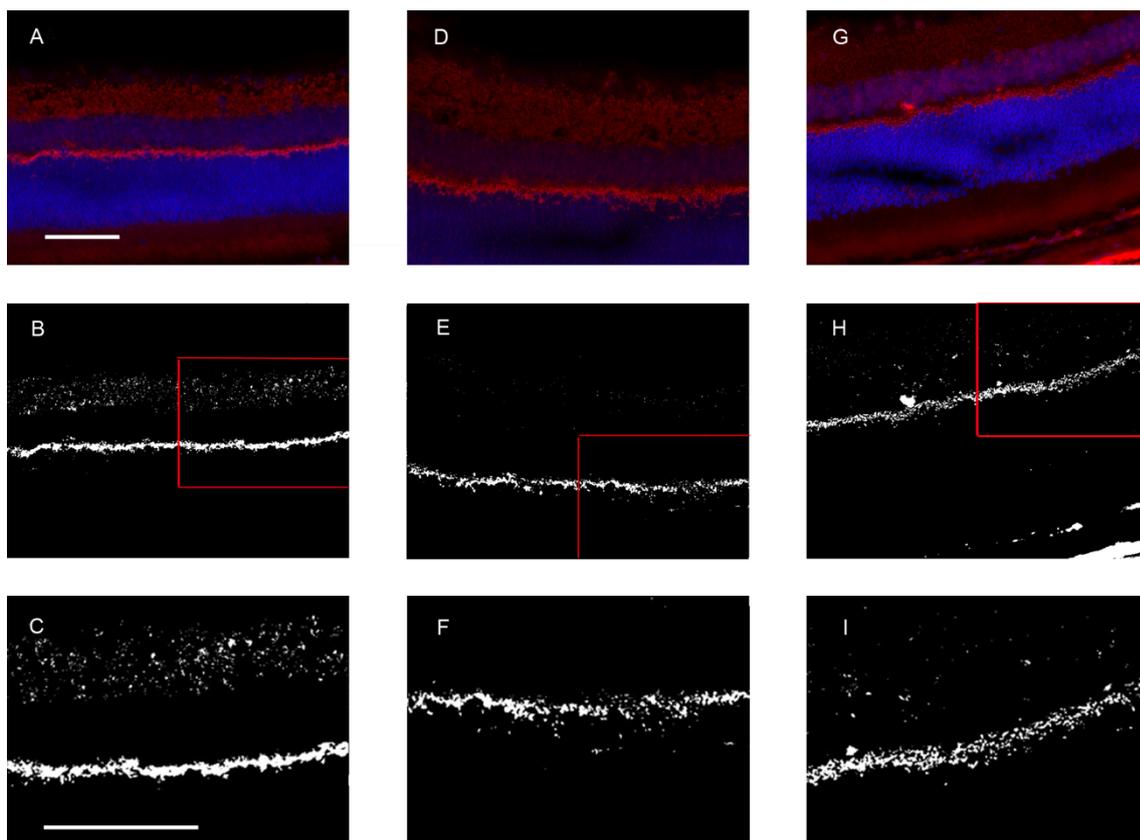


Abb. 16: Fluoreszenzbilder und in ImageJ ausgewertete Bilder der RIBEYE-Immunfluoreszenzfärbung

Exemplarisch dargestellt ist die RIBEYE-Immunfluoreszenz (rot in A, D, G) sowie die entsprechenden Threshold-Bilder für die anschließende Auswertung in ImageJ (weiß in B-I). Die

fluoreszenzmikroskopischen Bilder A, D und G zeigen Ausschnitte von Retinaschnitten eines Kontrolltiers (A), eines EAE-Tieres (D) und eines EAE/Sc2-Tieres (G). Hier stellen sich die RIBEYE-immunpositiven Areale in der äußeren plexiformen Schicht unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen hellrot leuchtend dar. Die DAPI-gefärbten Zellkerne der inneren Körnerschicht sind als leuchtendes blaues Band zu erkennen. Die Bilder B, E und H zeigen die in ImageJ ausgewerteten Bilder A, D und G (Threshold-Bilder). Hier stellen sich die RIBEYE-immunpositiven Areale weiß dar. Bei den Bildern C, F und I handelt es sich um Ausschnittsvergrößerungen der Bilder B, E und H. Es sind deutliche Unterschiede in der Signalstärke der Fläche des RIBEYE-Immunsignals zwischen den Gruppen zu erkennen. Maßstab 100µm in A für A-H und in C für C-I..

Die Mediane der RIBEYE-Quantifizierung wiesen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen auf. Während der Median der Kontrolltiere bei 65,31% der gemessenen immunpositiven Fläche lag, wiesen die Gruppen EAE und EAE/Sc2 Mediane zwischen 38,47% und 37,71% auf. Die statistische Analyse der vermessenen Flächenanteile des RIBEYE-Proteins an der äußeren plexiformen Schicht ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,0001$). Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 17 veranschaulicht.

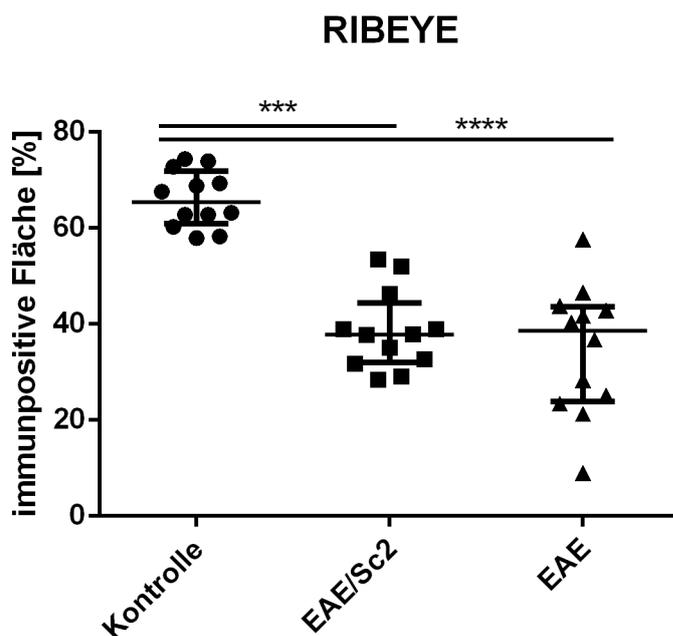


Abb. 17: RIBEYE-immunpositive Fläche pro Retina-Anschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/Sc2 und EAE

Dargestellt sind die prozentualen Flächenanteile der immunpositiven RIBEYE-Strukturen in der äußeren plexiformen Schicht der inneren Retinaabschnitte d bis g der drei Gruppen Kontrolle (schwarze Kreise), EAE/Sc2 (schwarze Quadrate) und EAE (schwarze Dreiecke). Graphisch abgebildet sind jeweils die Mediane, sowie die 25% und 75% Perzentile der Messwerte (***) ($p < 0,0001$).

Die ausgewerteten Daten zeigen einen klaren Effekt der EAE auf die immunologisch nachweisbare Expression des RIBEYE-Proteins und somit auch der Ribbon-Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der RIBEYE-Expression unter EAE. Entsprechend ist von einer Abnahme der Bestandteile chemischer Synapsen in der äußeren Retina unter EAE auszugehen.

Die Auswertungen des ersten Ergebnisteils zeigten, dass als Folge der EAE in den Ganglienzellen Apoptose induziert wird und sich die absolute Ganglienzellzahl im Vergleich zu Kontrolltieren reduziert. Des Weiteren wurden sowohl signifikant weniger Cx36-Proteine der elektrischen Synapsen als auch RIBEYE-Proteine der chemischen Synapsen bei EAE nachgewiesen, was für einen Synapsenverlust bis in die äußere Retina sprechen könnte. Ein möglicher Pathomechanismus mit sekundärem Zelluntergang im optischen System bei der MS bzw. EAE bezieht eine pathologische Aktivität von Pannexinen mit nachgeschalteter zellulärer Schädigungskaskade mit ein (BEHBEHANI et al., 2018; LUTZ et al., 2013; MANOGARAN et al., 2018). Eine Beteiligung der Pannexine bei den pro-inflammatorischen Prozessen im EAE-Modell, sowie eine mögliche pharmakologische Intervention durch den Panx1-Inhibitor PBN im ZNS sind bereits Gegenstand aktueller Forschung (HAINZ et al., 2017b; LUTZ et al., 2013). Über präventive Gabe von PBN konnte die Entwicklung klinisch messbarer motorischer Paralysen signifikant reduziert und das Fortschreiten der Symptome im Vergleich zu nicht-behandelten Tieren reduziert werden (HAINZ et al., 2016). Im zweiten Ergebnisteil wurde daher nach präventiver (vor Einsetzen der EAE-Symptomatik) Gabe von Probenecid (PBN) analysiert, ob der im ersten Teil nachgewiesene Ganglienzelluntergang sowie der Synapsen- bzw Proteinverlust unter EAE durch PBN beeinflusst werden kann.

5.2 Analyse der Effekte der präventiven PBN-Therapie auf die Versuchstiere

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein möglicher Effekt des Pannexin1-Inhibitors Probenecid (PBN) untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der Analyse der pharmakologischen Effekte einer protektiv-applizierten Dosis von 100mg/kg Körpergewicht PBN.

5.2.1 Ergebnisse der erhobenen Paralyse-Grade der Tiere mit präventiver Gabe von PBN

Zunächst wurde der Score-Verlauf über die einzelnen Tage des Versuchszeitraums der Versuchsgruppen EAE/PBN (Therapie) und EAE/Solvent (Solvent-Gabe) miteinander und jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Tiere der EAE/PBN-Gruppe erhielten ab Tag 1 nach EAE-Induktion tägliche PBN-Injektionen, während Tieren der EAE/Solvent-Gruppe das Lösungsmittel injiziert wurde. Die Entwicklung der klinischen Symptome über den Versuchszeitraum von 22 Tagen zeigte zwischen den Versuchstiergruppen deutliche

Unterschiede: Die Tiere der EAE/Solvent-Gruppe zeigten klinisch einen signifikant schwereren Verlauf, d.h. einen höheren motorischen Score-Wert mit stärkeren Paralysen, als die Tiere der EAE/PBN-Gruppe. Der Vergleich zu den Kontrolltieren, in denen keine EAE induziert wurde, zeigte, dass die Scores beider EAE-Gruppen, behandelt (EAE/PBN-Gruppe) und unbehandelt (Solvent-Gruppe) höher waren – jedoch lagen die Scores der PBN-Gruppe näher bei den Kontrollen als die der Solvent-Gruppe (Abbildung 18).

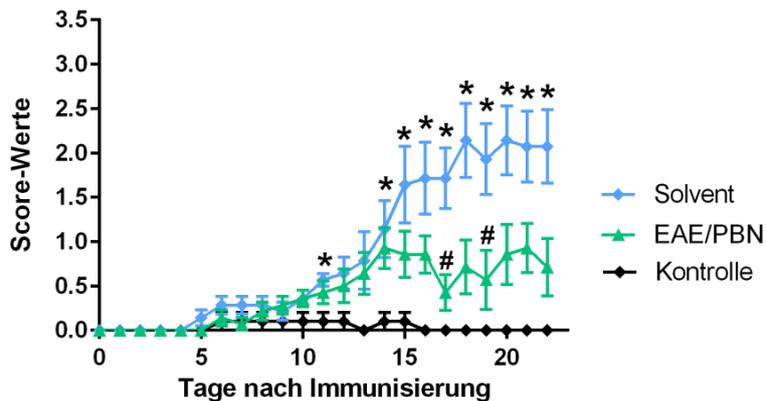


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Score-Werte der Tiere der Gruppen EAE/Solvent, EAE/PBN und Kontrolle

Abgebildet ist der zeitliche Verlauf der Score-Werte der Solvent-Tiere und EAE/PBN-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 0 des Experiments. Aufgetragen sind jeweils die täglich erreichten Mittelwerte der einzelnen Gruppen (blaue Rauten für die Solvent-Tiere, grüne Dreiecke für die EAE/PBN Tiere und schwarze Rauten für die Kontrolle) mit dem jeweiligen Standardfehler sowie signifikante Unterschiede der Score-Werte aller Tiere an jeweils einem Behandlungstag zwischen der Solvent-Gruppe und der Kontrollgruppe (*) sowie zwischen der Solvent- und EAE/PBN-Gruppe (#). Zwischen der Solvent- und der Kontrollgruppe bestanden signifikante Unterschiede an Tag 11 und durchgehend ab Tag 14 (*). Zwischen der EAE/PBN- und der Solvent-Gruppe bestanden an den Tagen 17 und 19 ebenfalls signifikante Unterschiede (# p<0,05).

Anhand der Abbildung lässt sich erkennen, dass die Kontrolltiere über die gesamte Versuchsdauer einen Score von 0 bis maximal 0,5 aufwiesen. In den EAE-Gruppen traten erste klinische Symptome ab Tag 5 auf. Der Score der Solvent-Tiere stieg ab Tag 14 rasch an und erreichte an Tag 22 einen Mittelwert von 2,5 +/-0,4. Dies bedeutete, dass die Tiere zu diesem Zeitpunkt eine beidseitige Plegie der hinteren Extremität aufwiesen. An Tag 11 und ab Tag 14 bis Tag 22 unterschieden sich die Gruppen EAE/Solvent und Kontrolle signifikant voneinander (p<0,05). In der EAE/PBN-Gruppe war dieser Anstieg im Score deutlich vermindert. Auch nach 22 Behandlungstagen bildeten die Tiere der EAE/PBN-Gruppe lediglich einen durchschnittlichen Score von 0,5 (Mittelwert) aus, was einer Lähmung der Schwanzspitze entspricht. An den Tagen 17 und 19 unterschied sich die EAE/PBN-Gruppe signifikant (p<0,05) von der Solvent-Gruppe, jedoch nicht von der Kontrollgruppe.

Es konnte ein positiver Einfluss der protektiven Therapie auf die Ausprägung der klinischen Symptome der EAE erkannt werden. Die Solvent-Gruppe hingegen erreichte beispielsweise an Tag 17 einen durchschnittlichen Score von 1,71 (Mittelwert) und unterschied sich sowohl signifikant von der Kontroll- als auch von der PBN-Gruppe wohingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und PBN-Gruppe gefunden werden konnten.

Aufgrund dieser signifikanten Ergebnisse des protektiven Einsatzes von PBN auf die klinische Symptomatik und somit das ZNS erfolgte anschließend die Analyse eines möglichen Effektes auf die Degeneration des Nervus opticus sowie dessen Zellkörper im Stratum ganglionare. Daher wurden mögliche protektive Effekte des PBN auf die Retina untersucht. Es wurde überprüft, ob a) die durch die EAE verursachte Apoptose der Ganglienzellen durch PBN verhindert oder verringert werden kann, und b) die degenerative Ausbreitung in weitere retinale Zellschichten abgeschwächt werden kann.

Maßgebend für den Grad der zellulären Schädigung ist die Dichte der synaptischen Verbindungen, die im ersten Teil der Ergebnisse bei den EAE-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmt worden war. Die zweite Arbeitshypothese stützt sich auf die Annahme, dass der durch die EAE in der Retina induzierte strukturelle Zellschaden sowie die einsetzende Apoptose von Ganglienzellen durch protektive Gaben von PBN reduziert werden kann. Es wurde angenommen, dass eine frühe pharmakologische Intervention, welche ab dem ersten Versuchstag erfolgte, die einsetzende Degeneration retinaler Neuronen und den Untergang der synaptischen Verbindungen verringern könnte. Die Messung der Effektstärke des Pharmakons erfolgte durch Analyse der Flächendichte des retinalen Synapsen-Proteins RIBEYE sowie des Cx36 und durch Auszählung der RBPMS-markierten Ganglienzellen. Zudem wurde die Anzahl CC3-immunpositiver apoptotischer Zellen in der Netzhaut erfasst. Die Daten wurden zwischen der Kontrollgruppe, der EAE-Gruppe und der EAE/Solvent-Gruppe verglichen. Es wurde angenommen, dass in der mit PBN behandelten Gruppe im Vergleich zur EAE- und Solvent-Gruppe die gemessenen Strukturen in höherer Dichte immunologisch nachweisbar sind bzw. weniger apoptotische Zellen nachweisbar sein würden. Zudem wurde angenommen, dass durch die Therapie die Dichte an Cx36-immunpositiven Gap junctions verändert werden könnte.

5.2.2 Lichtmikroskopische Auswertung der H.E.-Färbung für die EAE/PBN-, EAE/Solvent und Kontrollgruppe

Von den Augen der Tiere aller drei Gruppen wurden zunächst Kryoschnitte mittels H.E. gefärbt und mikroskopisch miteinander verglichen. Beim Vergleich fielen Unterschiede bei der Zelldichte im Stratum ganglionare auf. Die Anzahl der Zellen unterschied sich, wobei einige Augen innerhalb der Gruppen unterschiedlich viele Zellen aufwiesen. Es konnte keine

klare Aussage anhand der Abbildungen getroffen werden, zumal in der H.E.-Färbung nicht zwischen Ganglienzellen und ektopen amakrinen Zellen unterschieden werden konnte. Beispielbilder der histologischen Färbung sind in Abbildung 19 dargestellt. In den Retinae aller drei Versuchsgruppen sind alle Retinaschichten erkennbar.

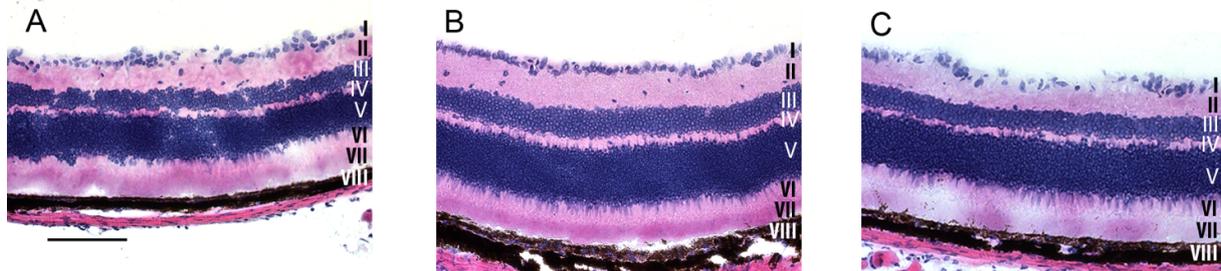


Abb. 19: Ausschnitte der Retina in H.E.-Färbung

Exemplarisch sind drei H.E.-gefärbte Ausschnitte der Retinae aus der Kontrollgruppe (A) sowie den EAE/PBN- (B) und EAE/Solvent- (C) Gruppen gezeigt. Die verschiedenen Schichten der Retina sind mit römischen Zahlen eingetragen: I=Ganglienzellen, II=Innere plexiforme Schicht, III=Innere Körnerschicht, IV=Äußere plexiforme Schicht, V=Äußere Körnerschicht, VI=Innensegmente (Fotorezeptoren), VII=Außensegmente (Fotorezeptoren), VIII=Pigmentepithel. Abgebildet sind jeweils zentrale Retinaausschnitte. Die Zellkerne stellen sich in der H.E.-Färbung als dunkelblaue Körnerstrukturen dar. Die weiteren Schichten des Stratum nervosum stellen sich in pink dar. Maßstab in A für A-C: 100 μ m.

5.2.3 Reduktion apoptotischer Ganglienzellen in den Retinae der EAE/PBN-Gruppe

Die CC3-Immunhistochemie (AEC-Färbung) wurde zum Nachweis apoptotischer Zellen in den Retinae angewandt. Immunpositive Zellen zeigten sich ausschließlich im Stratum ganglionare.

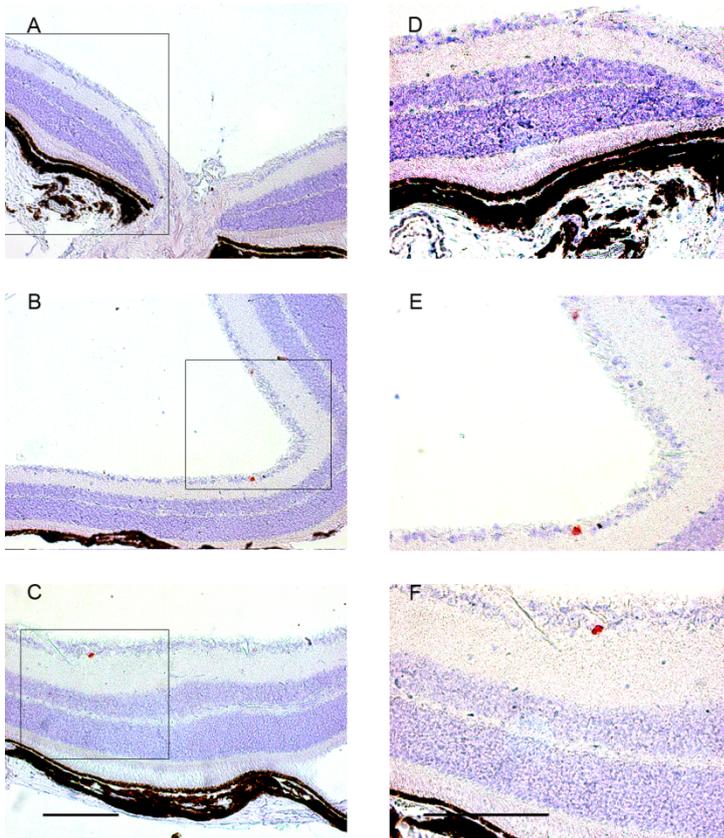


Abb. 20: CC3-Immunhistochemie an Retinaschnitten

Gezeigt ist eine CC3-immunhistochemische Färbung an der Retina eines Kontrolltieres (A, D), eines EAE/PBN-Tieres (B, E) sowie eines EAE/Solvent-Tieres (C, F) in jeweils niedriger (A, B, C) und hoher (D, E, F) Vergrößerung (separat aufgenommen). CC3-immunpositive Zellen (rot) sind ausschließlich im Stratum ganglionare zu erkennen. Alle anderen Zellkerne sind blau-lila gefärbt; das Zytoplasma jeweils blass rosa. Maßstab in C für A-C: 100 μm ; Maßstab in F für D-F 100 μm .

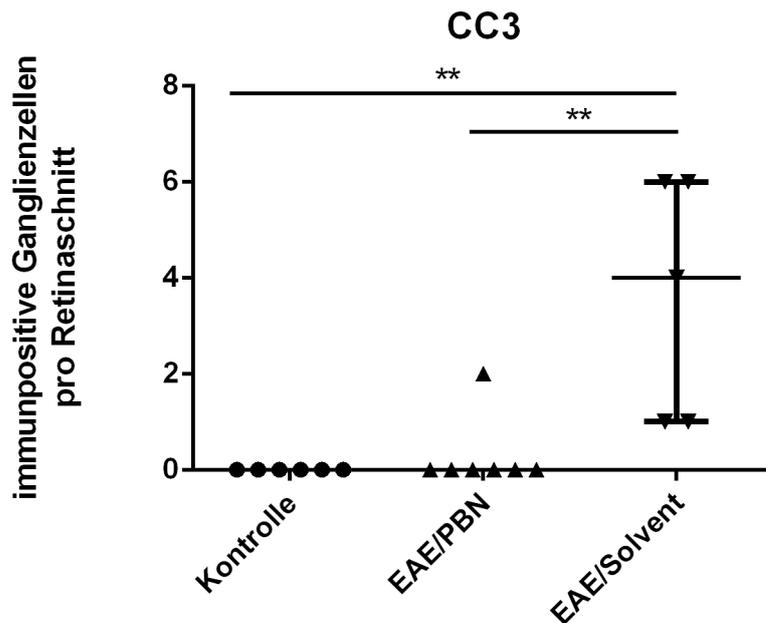


Abb. 21: CC3 immunpositiven Zellen pro Retinaschnitt der Tiere der Gruppen EAE und Kontrolle, EAE/PBN und EAE/Solvent

Aufgetragen ist die Anzahl CC3-immunpositiver apoptotischer Zellen pro Retinaschnitt (absolute Zahlen) der Kontroll- (schwarze Punkte), EAE/PBN- (schwarze Dreiecke) und EAE/Solvent-Gruppen (schwarze Dreiecke). Dargestellt sind jeweils die Mediane sowie die 25% und 75%-Perzentile. ** $p < 0,01$.

Die mikroskopische Auszählung der Zellen in mehreren ganz ausgezählten CC3-immunhistochemisch gefärbten Retinaschnitten zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Auszählung erfolgte verblindet. In den Kontrolltieren war keine Apoptose retinaler Ganglienzellen detektierbar. Die EAE hingegen induzierte Apoptose in Ganglienzellen (siehe Kap. 5.1.3), und die Applikation des Solvents (EAE/Solvent) reduzierte die Apoptoserate nicht (vgl. Abb. 21). In dieser Gruppe lag der Median bei 4 CC3-immunpositiven Zellen pro Tier. Im Vergleich dazu wies die EAE/PBN-Gruppe nur ein Tier mit CC3-immunpositiven Zellen in nur einem Schnitt auf und der Median der EAE/PBN-Gruppe lag entsprechend bei 0.

Es unterschieden sich die Kontroll- von der EAE/Solvent-Gruppe, so wie die EAE/PBN-Gruppe von der EAE/Solvent-Gruppe signifikant. Zwischen der Kontroll- und der EAE/PBN-Gruppe konnte hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was ein Hinweis für die anti-apoptotischen Effekte des PBN sein könnte, wohingegen das Solvent keine entsprechenden Effekte zeigte.

5.2.4 Ergebnisse der Auszählung intakter Ganglienzellen

Die Auszählung der RBPMS-immunpositiven Ganglienzellen im Stratum ganglionare der EAE/PBN-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der EAE/Solvent-Gruppe spiegelte

die veränderte Apoptoserate wieder und ergab Unterschiede in der absoluten Anzahl der Zellen in den ausgezählten Retinaschnitten (kompletter Schnitt). Es wurde jeweils ein kompletter intakter Retinaschnitt pro Tier von Ora serata zu Ora serata mikroskopisch verblindet ausgezählt (exemplarisch siehe Abb.22).

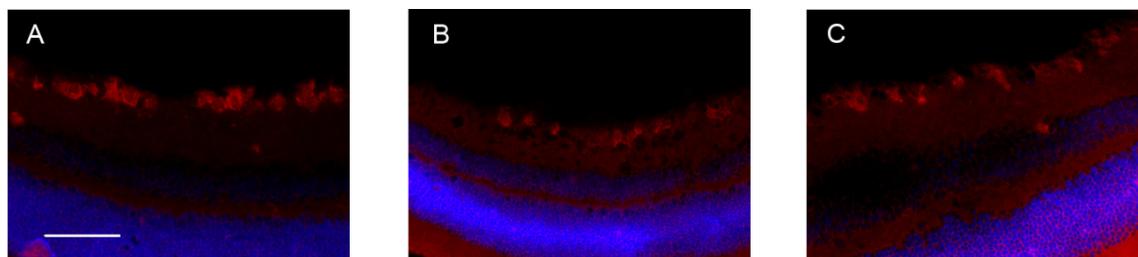


Abb. 22: RBPMS-Immunfluoreszenz im Stratum ganglionare der Retinae

Die Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von RBPMS-gefärbten Retinaschnitten eines Kontrolltiers (A), eines EAE/PBN-Tieres (B) und eines EAE/Solvent-Tieres (C). Die RBPMS-immunpositiven Ganglienzellen stellen sich unter dem Fluoreszenzmikroskop hell bis dunkel rot dar. Zu erkennen ist ein Unterschied in der Anzahl der roten immunpositiven Ganglienzellen der verschiedenen hier exemplarisch gezeigten Schnitte (Kontrolle, EAE/PBN, EAE/solvent). Die DAPI-gefärbten Zellkerne der inneren Körnerschicht stellen sich als blaues Band leuchtend dar. Maßstab 100 μ m in A für A-C.

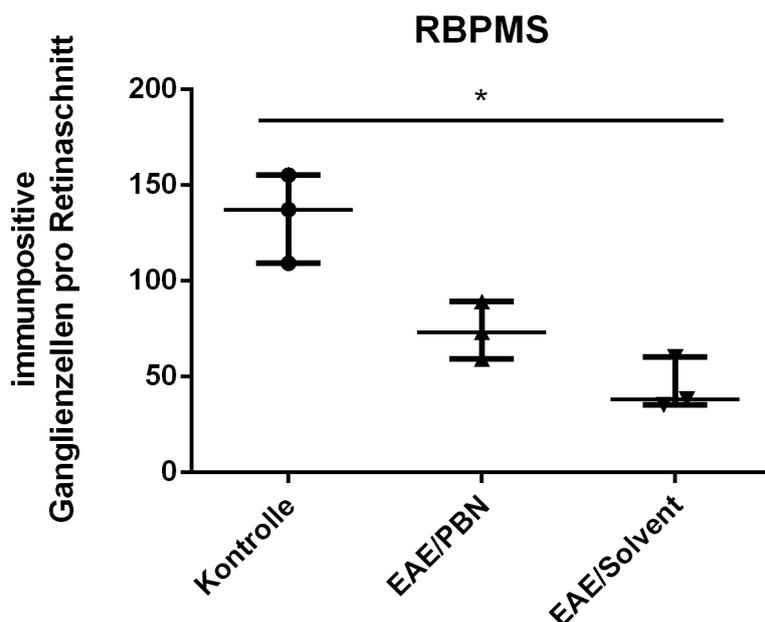


Abb. 23: RBPMS-immunpositive Ganglienzellen pro Retinaschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/PBN und EAE/Solvent

Dargestellt sind die absoluten Ganglienzellzahlen pro einem Retinaschnitt der Tiere der Kontroll- (schwarze Punkte), EAE/PBN- (schwarze Dreiecke), und EAE/Solvent-Gruppen (schwarze Dreiecke). Abgebildet sind jeweils die Mediane, die 25% und 75%-Perzentilen sowie signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (* $p < 0,05$).

Die Quantifizierung der Daten ergab deutliche Unterschiede in der Anzahl immunpositiver RBPMS-Zellen pro Retinaschnitt: Der Median lag in den Kontrolltieren bei 137 Zellen, in

EAE/PBN-Tieren bei 73 Zellen und in Tieren der EAE/Solvent-Gruppe bei 38 intakten Zellen pro Retina.

Die EAE/Solvent-Gruppe wies signifikant weniger intakte Ganglienzellen auf als die Kontrollgruppe, vergleichbar mit den Werten der EAE-Gruppe (siehe Kap.5.1.4). Die EAE/PBN-Gruppe zeigte nur eine geringfügig höhere Zahl RBPMS-immunpositiver Zellen, der sich von den Werten der EAE/Solvent-Gruppe nicht signifikant unterschied. Interessant ist jedoch, dass auch zu den Werten der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied mehr vorlag, was auf einen – wenn auch leichten – Effekt des PBN auf das Überleben retinaler Ganglienzellen hinweist.

5.2.5 Einfluss des PBN auf die Expression von Cx36

Zur Analyse des Einflusses von PBN auf die durch die EAE induzierte Abnahme von elektrischen und chemischen Synapsenproteinen in der Retina wurden die beiden Proteine Cx36 und RIBEYE untersucht und ihre Expression in der inneren und äußeren plexiformen Schicht zwischen den EAE/PBN-, Kontroll- und EAE/Solvent-Gruppen verglichen. Zunächst wurde die Cx36-Färbung ausgewertet. Exemplarisch sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz in Abb. 24 gezeigt.

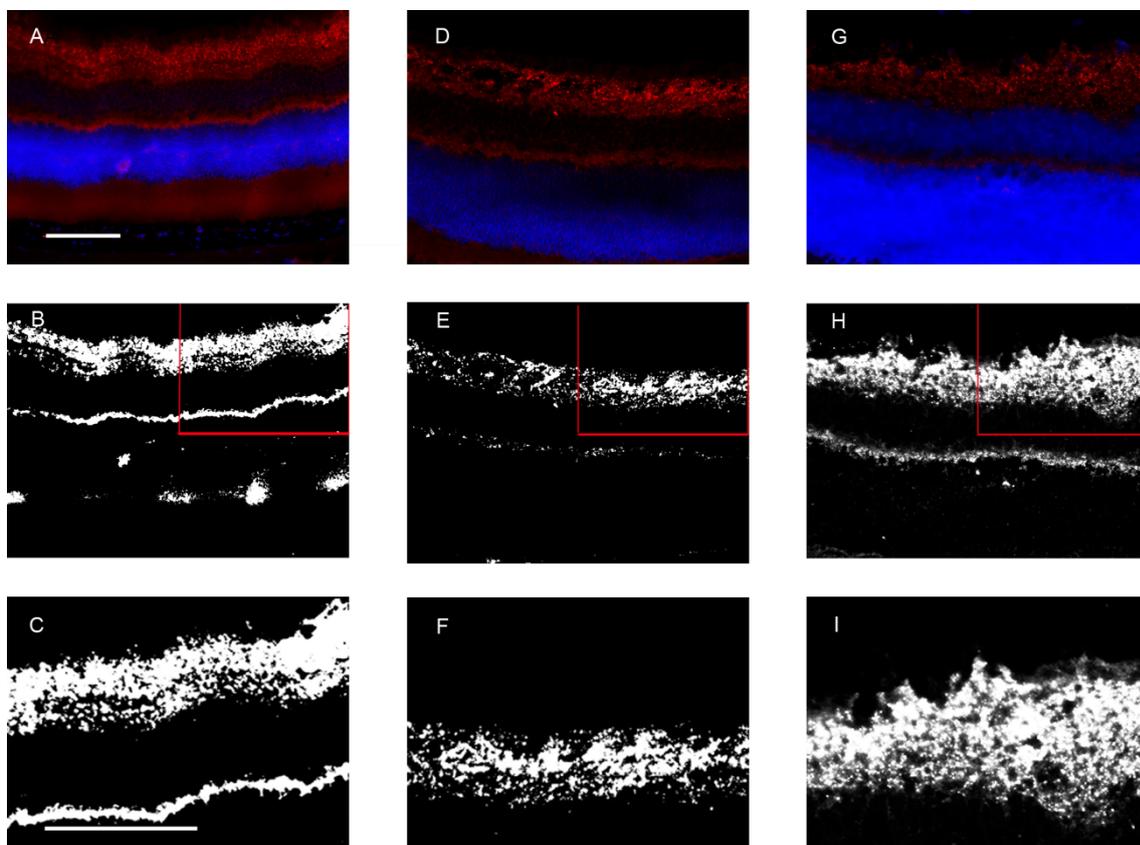


Abb. 24: Originalfluoreszenzbilder und in ImageJ ausgewertete Bilder der Cx36 Immunfluoreszenz

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Cx36-Immunfluoreszenz sowie der Threshold-Bilder für die anschließende Auswertung in ImageJ. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder A, D und G zeigen jeweils Ausschnitte von Retinaschnitten eines Kontrolltiers (A), eines EAE/PBN-Tieres (D) und eines EAE/Solvent-Tieres (G). Die Cx36-immunpositiven Areale in der inneren plexiformen Schicht stellen sich rot dar. Die DAPI-gefärbten Zellkerne der inneren Körnerschicht sind als blaues Band zu erkennen. Die Bilder B, E und H zeigen die für die Auswertung in ImageJ veränderten Bilder A, D und G, gespeichert als umgewandelte schwarz-weiße Threshold-Bilder. Hier stellen sich die Cx36-immunpositiven Areale weiß dar. Bei den Bildern C, F und I handelt es sich um Ausschnittsvergrößerungen der Bilder B, E und H. Bereits optisch sind deutliche Unterschiede in der Verteilung des Cx36-Immunsignals zu erkennen. Maßstab 100µm in A für A-H und in C für C-I.

Bereits bei Betrachtung der Fotos konnten deutliche Unterschiede in der Verteilung des Cx36-Immunsignals zwischen den Tieren der EAE/PBN-Gruppe und der Kontrollgruppe erkannt werden, welche sich ebenfalls durch die Quantifizierung (siehe Abb. 25) bestätigen ließen.

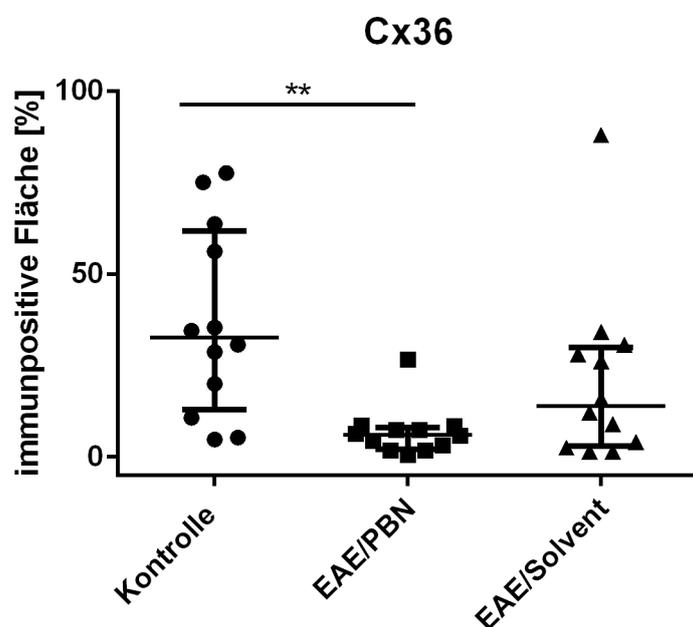


Abb. 25: Cx36-immunpositive Fläche pro Retinaanschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/PBN und EAE/Solvent

Abgebildet ist der prozentuale Flächenanteil des Connexin36-Immunsignals pro gemessenem Abschnitt der inneren plexiformen Schicht der Retinaanschnitte der Kontroll- (schwarze Punkte), EAE/PBN (schwarze Quadrate) und EAE/Solvent- (schwarze Dreiecke) Gruppen. Dargestellt ist jeweils der Median sowie die 25% und 75%-Percentile. Es besteht ein signifikanter Unterschied (** $p < 0,01$) zwischen der EAE/PBN und der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der EAE/Solvent-Gruppe unterschieden sich in dieser Messung nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von Cx36 unter Einfluss der EAE (EAE/Solvent) abnahm. Die Applikation von PBN beeinflusste diesen Aspekt der retinalen Veränderungen scheinbar nicht bzw. führte zu niedrigeren Werten als in der Kontrolle: Die Tiere der EAE/PBN-Gruppe wiesen signifikant weniger

Cx36-Immunfluoreszenz auf als die Kontrollgruppe, zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zur EAE/Solvent-Gruppe.

5.2.6 Einfluss von PBN auf den Erhalt struktureller Bestandteile der Ribbon-Synapsen

Die mikroskopische Analyse der RIBEYE-Immunfluoreszenz zeigte deutliche Unterschiede in der RIBEYE-immunpositiven Flächenexpression in der untersuchten äußeren plexiformen Schicht. Bereits lichtmikroskopisch waren Unterschiede zu sehen. Besonders gut sind diese in den vergrößerten Bildern der in ImageJ ausgewerteten Threshold-Bilder zu erkennen (siehe Abb. 26). Subjektiv unterschied sich die EAE/PBN-Gruppe optisch am meisten von der Kontrollgruppe, wohingegen sich die EAE/PBN-Gruppe weniger von der EAE/Solvent-Gruppe unterschied. Dieser erste Eindruck konnte durch die statistische Analyse der Daten bestätigt werden.

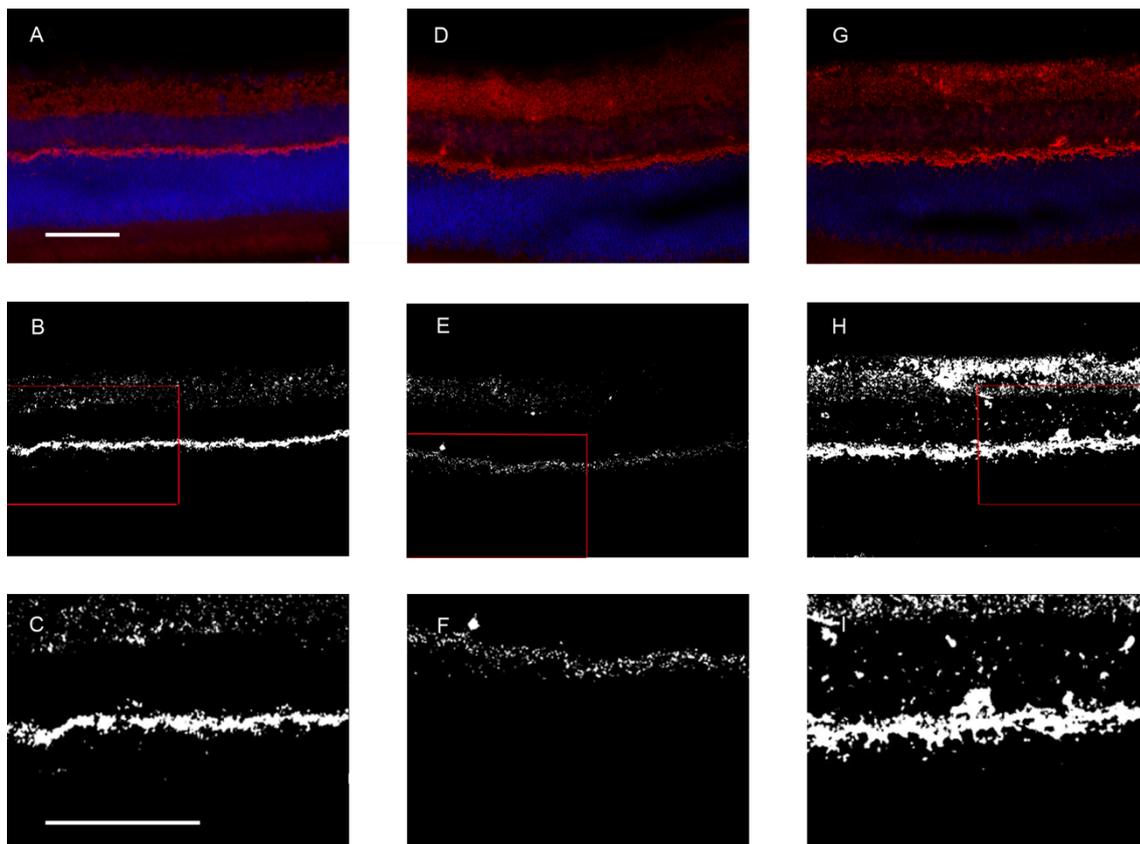


Abb. 26: Originalfluoreszenzbilder und in ImageJ ausgewertete Bilder der RIBEYE-Immunfluoreszenzfärbung

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der RIBEYE-Immunfluoreszenz sowie der Threshold-Bilder für die anschließende Auswertung in ImageJ. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder A, D und G zeigen Ausschnitte von Retinaschnitten eines Kontrolltiers (A), eines EAE/PBN-Tieres (D) und eines EAE/Solvent-Tieres (G). Hier stellen sich die RIBEYE-immunpositiven Areale in der

äußeren plexiformen Schicht, unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen, hellrot leuchtend dar. Die DAPI-gefärbten Zellkerne der inneren und äußeren Körnerschichten sind als leuchtende blaue Bänder zu erkennen. Die Bilder B, E und H zeigen die für die ImageJ-Auswertung umgewandelten Threshold-Bilder aus A, D und G. Hier stellen sich die RIBEYE-immunpositiven Areale in weiß dar. Bei den Bildern C, F und I handelt es sich um Ausschnittsvergrößerungen der Bilder B, E und H. Es sind deutliche Unterschiede in der Signalstärke pro Fläche des RIBEYE zu erkennen. Maßstab 100µm in A für A-H und in C für C-I.

Die Auswertung der RIBEYE-Immunfluoreszenz zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der EAE/PBN-Gruppe mit einem p-Wert von 0,0008. Zwischen der EAE/Solvent- und der Kontrollgruppe bestand aufgrund der hohen Streubreite der Einzelwerte in der Solvent-Gruppe kein signifikanter Unterschied, siehe exemplarisch Abb. 27.

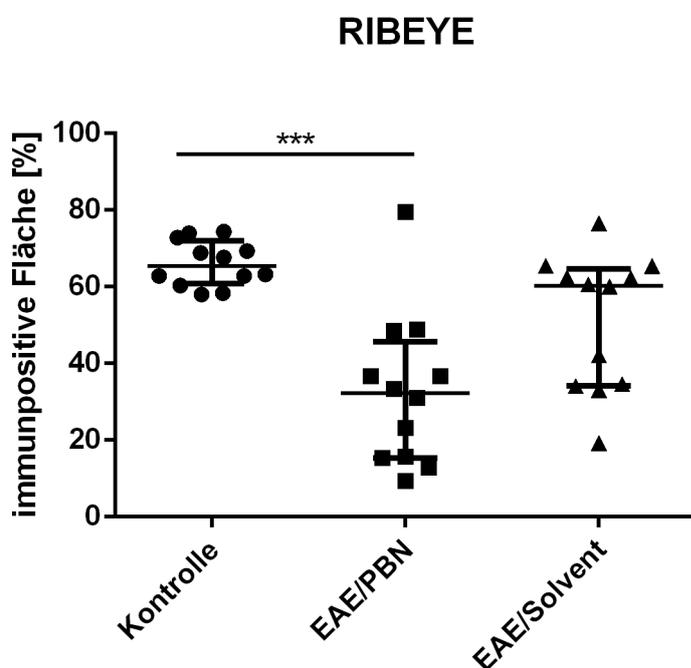


Abb. 27: RIBEYE-immunpositive Fläche pro Retinaanschnitt der Tiere der Gruppen Kontrolle, EAE/PBN und EAE/Solvent

Dargestellt ist der prozentuale Flächenanteil des immunpositiven RIBEYE-Signals in der äußeren plexiformen Schicht der Kontroll-, PBN- und Solvent-Gruppen. Abgebildet sind jeweils der Median, die 25% und die 75%-Perzentile. Eingezeichnet ist zudem ein signifikanter Unterschied der Expression der EAE/PBN- zur Kontrollgruppe (** $p < 0,001$).

Anhand der Ergebnisse konnte kein signifikanter Unterschied in der RIBEYE-Expression durch die Gabe von PBN im Vergleich zum Solvent gefunden werden. Vielmehr unterschied sich die EAE/PBN-Gruppe signifikant von den gesunden Kontrolltieren. Diese Ergebnisse sind ähnlich wie die der Auswertung der Cx36-Immunfluoreszenz.

6 Diskussion

6.1 Pathophysiologische Veränderungen im visuellen System bei MS und unter EAE-Induktion

Ein Großteil der Patienten entwickelt im Verlauf einer MS-Erkrankung Symptome im visuellen System: Bereits als Frühsymptom ist die Retrobulbärneuritis, einhergehend mit Inflammation der Nervi optici, bei durchschnittlich einem Drittel der Betroffenen ophthalmologisch oder in der Bildgebung festzustellen (MANOGARAN et al., 2018; SYC et al., 2012). Verschiedene Studien legen nahe, dass über die gesamte Krankheitsdauer bei über 90% der MS-Patienten eine Demyelinisierung und Atropie der optischen Nerven einsetzt (BEHBEHANI et al., 2018; HEROLD et al., 2015; LARABEE et al., 2016; SARTORETTI et al., 2017). Des Weiteren ist bekannt, dass diese degenerativen Veränderungen der Axone der Nervi optici von Patienten zu einer retrograden Schädigung der retinalen Ganglienzellkörper führen (BEHBEHANI et al., 2018; HUANG et al., 2018; LARABEE et al., 2016). Aktuell diskutieren einige Autoren aber auch das Auftreten von dysfunktionalen Veränderungen mit strukturellen Läsionen der äußeren Schichten der Retina unabhängig von einer vorausgehenden Optikusneuritis (siehe Kap. 6.4.1), wobei der genaue Pathomechanismus aktuell noch Gegenstand der Forschung ist (DEMBLA et al., 2018; HANSON et al., 2018). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung dieser degenerativen Veränderungen der verschiedenen Schichten der Retina im Tiermodell. Zunächst wurde ein zu den Fragestellungen dieser Arbeit passendes Modell der MS gesucht. Je nach Modell können verschiedene Krankheitsaspekte besonders gut erforscht und nachvollzogen werden. Da in dieser Arbeit der Fokus auf dem visuellen System lag, wurden erprobte Modelle in Betracht gezogen, die das Krankheitsgeschehen im visuellen System besonders gut abbilden: Die Optikusatrophie, einhergehend mit Demyelinisierung und retinaler Zellschädigung, kann in verschiedenen MS-Modellen sehr gut reproduziert werden, etwa mit dem bereits beschriebenen Cuprizon-Modell (siehe Kap. 1.6.2) (ARAUJO et al., 2017). Das Cuprizon-Modell basiert auf einer primär toxischen Schädigung im ZNS, welche eine von einer Immunreaktion unabhängige Demyelinisierung des Nervus opticus induziert (SACHS et al., 2014). Sowohl im Cuprizon- als auch im EAE-Modell konnte in verschiedenen Messverfahren eine Abnahme der axonalen Faserstärke und Läsionen im Myelinmantel der Nn. optici nachgewiesen werden (KHAN et al., 2014; LIN et al., 2017; SACHS et al., 2014). Das EAE-Tiermodell bildet im Gegensatz zum Cuprizon-Modell u.a. die immunologischen und entzündlichen Krankheitskomponenten der MS mit Autoantikörperbildung durch B-Zellen ab: In einer zweiten Phase nach Induktion kommt es zur Autoimmunreaktion gegen körpereigene Proteine, wie etwa gegen das MOG-Protein

(POL et al., 2019). Hierdurch entstehen Entzündungsherde im Gewebe der Tiere, u.a. in motorischen Zentren des ZNS und dem visuellen System, welche auch mikroanatomisch nachgewiesen werden können (DANESH-MEYER et al., 2016; DUFFY et al., 2014; GUO et al., 2016; HEROLD et al., 2015; HORSTMANN et al., 2013). Die Tiere bilden auch eine mikroanatomisch nachweisbare Optikusneuritis mit Läsionen im Stratum ganglionare der Retina aus (HORSTMANN et al., 2013; LARABEE et al., 2016). Daher wurde in dieser Arbeit das EAE-Modell angewendet, um eine postulierte indirekte (sekundäre) immunologisch mitverursachte Schädigung von Zellen und Proteinen in verschiedenen Schichten der Retina untersuchen zu können.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass durch die EAE, wie auch bei der MS, retinale Ganglienzellen dem Zelltod unterliegen. Es waren in der Ergebnisauswertung apoptotische Zellen gefunden worden. Das tatsächliche Ausmaß des Ganglienzellschadens wurde durch den spezifischen Ganglienzellmarker RBPMS und den Apoptosemarker CC3 quantifiziert. Des Weiteren wurde in der ersten Arbeitshypothese postuliert, dass eine mögliche Schädigung nicht auf das Stratum ganglionare begrenzt bleiben würde, sondern als Zeichen früher degenerativer Effekte weiterer Zellschichten auch die Synapsen des sinnesphysiologisch ersten (Fotorezeptoren) und zweiten (bipolare Zellen) Neurons betreffen würde. Zur Analyse wurden sowohl Proteine elektrischer Synapsen (das neuronale Cx36) als auch chemischer Ribbon-Synapsen (das Protein RIBEYE) in der Retina untersucht. Im Fokus stand der potentielle Einfluss der EAE auf die jeweilige Expression der Connexine und RIBEYE-Proteine. Auch dieser Teil der Hypothese konnte durch eine verringerte Expression der Proteine unter EAE bestätigt werden. In den folgenden Kapiteln werden u.a. die Ergebnisse dieser Messungen sowie mögliche Ursachen der Ergebnisse diskutiert.

6.2 Die EAE führte zu einer deutlichen klinischen Paralyse der Versuchstiere

Zunächst wurden die ab dem ersten Versuchstag täglich erfassten klinischen Score-Werte aller Tiere des Experiments (n=30) ausgewertet. In dieser Arbeit wurde zur Erfassung der sensomotorischen Auswirkungen im Verlauf der EAE ein Score-System angewendet, welches die jeweils festgestellten Lähmungserscheinungen der Versuchstiere in einer definierten numerischen Einteilung dokumentierte (Siehe Kap. 4.2.3). Die Tiere der EAE-Gruppe erreichten am 13. Tag nach EAE-Induktion einen durchschnittlichen Score von 1,58 (Hemiplegie der hinteren Extremität); bis zum Versuchsende stieg der durchschnittliche Score auf 2,58 (komplette bilaterale schwere Hinterbeinlähmung). Vergleichend mit den Tieren der EAE-Gruppe wurden Tiere ohne EAE-Induktion (Kontrolle) untersucht. Zudem wurde eine Untergruppe der EAE-Tiere untersucht, die bei Erreichen des Scores 2 (Tag 14 +/- 1) aus dem Versuch genommen wurden (EAE/Sc2-Gruppe).

Anhand der Score-Verläufe konnte klar geschlussfolgert werden, dass die EAE bei den Versuchstieren klinische Symptome verursachte und die Motorik der Tiere zunehmend im Krankheitsverlauf beeinträchtigt war. Dies rechtfertigte den experimentellen Vergleich der EAE mit dem Krankheitsverlauf der MS, welche analoge sensomotorische Ausfallerscheinungen verursachen kann (HORSTMANN et al., 2013; MANOGARAN et al., 2018). Allerdings zeigte sich auch, dass die Tiere unterschiedlich stark und schnell auf die Induktion der EAE ansprachen und am Ende der Versuchszeit nicht alle Tiere den gleichen Score erreichten (Verteilung der Score-Werte der EAE-Gruppe an Tag 22: Score 1 bis Score 3,5), obwohl bei jedem Tier das gleiche EAE-Protokoll angewendet worden war. Auch dieses Phänomen ist bei den sehr individuellen Verläufen der betroffenen MS Patienten zu beobachten. Die Krankheitsaktivität und die zeitlichen Verläufe der Symptomausprägung sind bei den Patienten klinisch sehr variabel (GAJOFATTO, TURATTI, 2018; GARCIA-MARTIN et al., 2017). Mögliche Ursachen bzw. Einflussvariablen auf die Krankheitsaktivität sind schwer zu erfassen, da u.a. die genaue Ätiologie und Pathogenese der MS bisher noch nicht im Detail nachvollzogen werden konnte. Erschwerend kommt hinzu, dass es sich wahrscheinlich um ein multimodales Krankheitsgeschehen mit vielen verschiedenen Variablen und Einflussgrößen handelt (BARZ et al., 2017; COMPSTON, COLES, 2008; KURTENBACH et al., 2014). Diskutiert wird z.B. ein individuell unterschiedlich starkes Ansprechen des Immunsystems der Betroffenen auf einen primären Auslöser wie etwa eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (BRAY et al., 1983; LAURENCE, BENITO-LEON, 2017). Entsprechend scheint eine sehr wichtige Einflussgröße das patienteneigene Immunsystem bzw. dessen Aktivität zu sein (ALDSKOGIUS, KOZLOVA, 1998; LI et al., 2018). Dies wäre auch im Tiermodell denkbar. Die Immunisierung im Rahmen der EAE induziert eine Immunreaktion der Tiere. Es werden u.a. die T-Lymphozyten aktiviert und durch Interaktion mit B-Zell-Subpopulationen aus dem ZNS (KRUMBHOLZ et al., 2012; LUCCHINETTI et al., 2000; WEKERLE, 2017) Antikörper gegen das injizierte MOG-Peptid gebildet, die sich dann autoimmun gegen körpereigene Proteine richten (HASSELMANN et al., 2017). Entsprechend ist sowohl eine reaktive Aktivität von T- als auch von B-Zellen für eine effektive Immunreaktion notwendig, die zu einer experimentell messbaren Entzündungsreaktion führt. Mediator-Variable der Effektstärke des EAE-Protokolls ist in dieser Arbeit die Aktivität des murinen Immunsystems (HASSELMANN et al., 2017). Nur eine aktive Bildung von Antikörpern und der Übertritt von T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke führt überhaupt zur Induktion der EAE (DANIKOWSKI et al., 2017; HAINZ et al., 2016; PERRY, LUND, 1990). Einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für die teilweise unterschiedlichen Score-Ergebnisse im EAE-Modell bietet die Stressreaktion der Tiere auf die Situation im Experiment, wie etwa die Injektionen und tägliche Untersuchungen der Tiere (zwecks Erhebung der Score-Werte) (HENEKA et al., 2001). Diese Stressreaktion der

Versuchstiere ist schwer kontrollierbar und kann potentiell die Ausprägung der EAE verändern. Es ist bekannt, dass ein erhöhtes Stresslevel u.a. über das immunsuppressive Hormon Cortisol die Aktivität des Immunsystems senken kann (MANOHAR et al., 2012). Auf der anderen Seite konstatierten Gerrard et al. einen gegenteiligen Effekt von mildem chronischem Stress der Versuchstiere (GERRARD et al., 2017): Die Tiere seiner Studie wiesen unter Einfluss chronischer Stressoren einen schwereren Krankheitsverlauf auf. Dies geschah jedoch nur bei mildem Stress über einen langen Zeitraum, wie auch Harpaz et al. experimentell zeigen konnten (HARPAZ et al., 2013). Harpaz et al. konstatierten für diesen Effekt eine ambivalente Langzeitwirkung des Cortisols, welches neben einer immunsuppressiven Wirkung auch eine verstärkte Differenzierung der T-Zellen zu pro-inflammatorischen Th1-Zellen bewirkt (HARPAZ et al., 2013). Es wäre also möglich, dass die individuelle Reaktion von Tieren auf Stressoren wie etwa die i.p. Injektionen Einfluss darauf hat, wie stark die Folgen der EAE in einem Versuchstier klinisch symptomatisch werden.

Um diese Einflussgrößen möglichst auszuschließen, waren im Versuchsaufbau für diese Arbeit bereits Vorkehrungen zur Reduktion des Stress-Levels der Tiere getroffen worden: Die Tiere wurden immer nur von derselben Person untersucht, sie waren in einem ruhigen Raum mit begrenztem Zutritt für Dritte gehalten worden und die Käfige waren während des Experimentes nicht bewegt worden.

6.3 Vergleichbarkeit der humanen mit der murinen Retina

Da in dieser Arbeit Retinae von Mäusen untersucht worden sind, stellt sich an dieser Stelle zunächst die Frage, inwiefern die hier gefundenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Mikroanatomisch besitzen die murine und die humane Retina einen analogen Schichtaufbau mit funktionell sehr ähnlichen neuronalen Zellen (DE SOUZA et al., 2016; KOVACS-OLLER et al., 2017; PEICHL, GONZALEZ-SORIANO, 1994). Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus keine Makula (KOVACS-OLLER et al., 2017). Dennoch befindet sich im Zentrum der murinen Netzhaut eine deutlich dichtere Anordnung der Fotorezeptoren als in peripheren Bereichen, so dass diese zentrale Zone annähernd mit der menschlichen Makula vergleichbar ist (KOVACS-OLLER et al., 2017). Die murine Retina verfügt wie die menschliche auch über spezielle On-/Off- Subtypen der bipolaren Zellen und der Ganglienzellen, welche das Sehen von Bewegungen und unterschiedlich hellen Lichtreizen (Sensitivität) mitermöglichen (siehe Einleitung Kap.1.3.1) (DHANDE et al., 2018). Kovacs-Oller et al. untersuchten in einer *post mortem* Analyse von humanem Gewebe die retinale Connexin-Expression im Vergleich zur murinen Expression (KOVACS-OLLER et al., 2017). Die Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass die Connexin-Expression von Mäusen in der inneren und äußeren plexiformen Schicht vergleichbar derer von Menschen ist. Die

Expression von Cx36 der bipolaren Zellen in der inneren plexiformen Schicht ist in beiden Spezies sehr hoch (GULDENAGEL et al., 2000; SOHL et al., 1998; SOHL et al., 2000; STRIEDINGER et al., 2005). Cx36 ist insgesamt der am stärksten exprimierte retinale Connexin-Subtyp in beiden Spezies.

Ebenso finden sich die Ribbon-Synapsen mit dem RIBEYE-Protein in den chemischen Präsynapsen sowohl in Fotorezeptoren der humanen als auch der murinen Retina (MAGUPALLI et al., 2008; SCHMITZ et al., 2000; SCHWARZ, SCHMITZ, 2017). Auch das in dieser Arbeit untersuchte RBPMS-Protein wird spezifisch in humanen und murinen Ganglienzellen exprimiert (RODRIGUEZ et al., 2014). Die Expression der Pannexin-Subtypen ist ebenfalls im humanen visuellen System ähnlich dem murinen (KURTENBACH et al., 2014).

Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass die murine Retina experimentell mit der humanen vergleichbar ist. Vor allem werden die in dieser Arbeit untersuchten retinalen Proteine ebenfalls im Menschen exprimiert und könnten durch pathophysiologische Vorgänge bei der MS in den Retinae der Patienten verändert werden.

6.4 Pathophysiologische Veränderungen in der Retina unter EAE-Induktion

Im ersten Teil der Ergebnisse wurde zunächst überprüft, ob Zellen der Netzhaut als Folge der EAE-Induktion in die Apoptose eintreten. Hierfür wurde die Detektion eines Apoptose-spezifischen Proteins, der Cleaved Caspase 3 (CC3), durchgeführt (CUBILLA et al., 2013; KOBAYASHI et al., 2007; LI et al., 2017b). Der Vergleich der EAE- mit der Kontrollgruppe zeigte, dass bereits in den 6µm dünnen Schnitten der Augen mehrere CC3-immunpositive Zellen zu finden waren. In der Kontrollgruppe hingegen waren keine CC3-immunpositiven Zellen gefunden worden, wodurch ein spontaner Eintritt der Zellen in die Apoptose durch die Sham-Behandlung ausgeschlossen werden konnte. Die Anzahl der apoptotischen Ganglienzellen unterschied sich signifikant zwischen der EAE- und der Kontrollgruppe. Die Ganglienzellen treten somit bei einer EAE in die Apoptose ein. Hiermit konnte im Sinne der ersten Arbeitshypothese bestätigt werden, dass sich Ganglienzellen unter EAE apoptotisch verändern und die durch die EAE hervorgerufenen Läsionen im visuellen System nicht auf die Axone und Myelinscheiden des Nervus opticus begrenzt bleiben.

Für diese Ausdehnung der Läsion des optischen Nervs in die Retina gibt es aktuell verschiedene Erklärungsansätze: Derzeit wird als einer der pathologischen Mechanismen eine retrograde Weiterleitung der zentralen Inflammation über die Axone in die Somata der Ganglienzellen angenommen. Diese Annahme deckt sich auch mit *post mortem* und *in vivo*

Untersuchungen an MS-Patienten und experimentellen EAE-Studien (HEROLD et al., 2015; LARABEE et al., 2016; SARTORETTI et al., 2017). Es treten jedoch nicht alle geschädigten Zellen des Stratum ganglionare in die Apoptose ein, sondern verändern sich auch nekrotisch oder nekroptotisch (HUANG et al., 2018; KUO et al., 2016). Daher interessierte in dieser Arbeit neben der Anzahl apoptotischer Zellen auch das tatsächliche Ausmaß des durch die EAE induzierten Zellschadens in der Netzhaut. Um die tatsächliche Zellzahl bestimmen zu können, wurden die Ganglienzellen in dieser Arbeit immunologisch markiert und quantifiziert. Zu diesem Zweck war der spezifische Ganglienzellmarker RBPMS in Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt worden. Es waren in ganzen Schnitten die RBPMS-immunpositiven Zellen der verschiedenen Versuchsgruppen ausgezählt worden (absolute Zellzahl pro Transversalschnitt). Die Ergebnisse dieser quantitativen Auswertung zeigten deutlich eine mediane Abnahme der Zellzahl in allen drei Gruppen mit EAE-Induktion. Trotz der kleinen N-Zahl der Gruppen war diese Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle in der EAE/Solvent-Gruppe signifikant ($p < 0,05$). Dies spricht für einen ausgeprägten Untergang der Ganglienzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass die Apoptose nicht der vorherrschende Degenerationsprozess zu sein scheint, welcher diese ausgeprägte Schädigung im Stratum ganglionare hervorruft. Es waren nur etwa 5-10 % der ganglionären Zellen eines Schnittes apoptotisch verändert (2-6 Zellen von 38-59 ausgezählten Ganglienzellen), wohingegen mit der RBPMS-Analyse gezeigt werden konnte, dass sich die Zellzahl bei der EAE/Solvent-Gruppe (siehe zweiten Ergebnisteil) signifikant im Vergleich zur Kontrolle reduziert hatte. Bei den anderen EAE-Tieren kam es jedoch nicht zu signifikanten Unterschieden als Folgen der EAE, was entweder auf die kleine N-Zahl oder das Überwiegen anderer Formen des Zelluntergangs zurückgeführt werden könnte. Auch dieses Phänomen ist bereits aus Vorarbeiten zur Retina bekannt: In Retinae, welche primär durch Laserstrahlen im murinen Modell geschädigt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass hier die Nekrose den überwiegenden Anteil der Läsionsgröße verursachte (STRIEDINGER et al., 2005). Des Weiteren konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass häufig das Ausmaß des indirekten sekundären Zellschadens in neuronalen Zellen höher ist, als der primäre durch die initial schädigende Noxe (KERMER et al., 1999). Ein weiterer Schädigungsmechanismus in der Retina neben der Apoptose könnte das lokale zelluläre Ödem sein, welches häufig bei zentraler Inflammation entsteht (BARZ et al., 2017). Aus diesen Gründen ist es möglich, dass auch die retinalen Ganglienzellen im Laufe der Entzündung im visuellen System bei der MS ödematös geschädigt werden. Xia et al. konnten zeigen, dass experimentell isolierte retinale Ganglienzellen sehr schnell mit einem Anstieg der para- und autokrinen ATP-Sekretion antworten, nachdem sie mechanisch geschädigt wurden (XIA et al., 2012). Sollte dieser Pathomechanismus auch eine Rolle in der Pathogenese der retinalen Läsion bei der MS spielen, würden hierdurch die retinalen

Neurone weitaus stärker und eventuell früher geschädigt als bisher angenommen, jedoch nicht hauptsächlich apoptotisch (DAHL, LOCOVEI, 2006): Die ATP-Sekretion kann über die Panx1-vermittelte Aktivierung des P2X7-Rezeptors in den Ganglienzellen Panx1 aktivieren. Über den geöffneten Panx1-Kanal kann es durch pathologischen Ca^{2+} -Einstrom zu einer Ca^{2+} -Überladung der Ganglionzelle und somit zu neurotoxischen Vorgängen kommen (SHESTOPALOV, SLEPAK, 2014). Durch diesen Läsionsmechanismus kann es auch zum sekundären Neuronenverlust in entzündetem Gewebe des ZNS und der Retina kommen, wie einige Autoren konstatieren (ADAMSON, LEITINGER, 2014; BOYCE, SWAYNE, 2017; MANOHAR et al., 2012; PELEGRIN, 2008). Zudem könnte dieser Mechanismus einen Ausgangspunkt für pharmakologische Beeinflussung bieten (HAINZ et al., 2016).

Zusammenfassend kann anhand der Auswertungen zu CC3 festgehalten werden, dass die EAE Apoptose im Stratum ganglionare induziert. Die Analyse der RBPMS-immunpositiven Ganglienzellen zeigte, dass es unter EAE zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl kommt. Das Ausmaß des tatsächlichen ganglionären Zellschadens ist wahrscheinlich neben der Apoptose auch durch Nekrose, Nekroptose, zytotoxische und pro-inflammatorische Prozesse mitverursacht. Diese Ergebnisse könnten in zukünftigen Studien mit weiteren Methoden überprüft und weiterverfolgt werden.

6.4.1 Degeneration von Bestandteilen elektrischer und chemischer Synapsen

Fluoreszenzmikroskopisch waren die Effekte der EAE auf die Synapsen der Retina durch die Expression verschiedener Proteine überprüft worden. Die Analyse der Flächenexpression von Synapsenproteinen in der inneren und äußeren plexiformen Schicht spricht deutlich für eine Reduktion der Synapsenprotein-Expression durch die EAE. Besonders die Ergebnisse der Messungen des Ribbon-Synapsenproteins RIBEYE zeigten in allen EAE-Gruppen bis auf die EAE/Solvent-Gruppe eine signifikante Abnahme der RIBEYE-Protein-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse weisen auf eine deutliche Abnahme von Proteinen der spezifischen Ribbon-Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht bei EAE hin. Aber auch die Expression des Cx36, das Bestandteil von elektrischen Synapsen ist, wurde durch die EAE signifikant reduziert. Entsprechend kann ebenfalls im Sinne der ersten Hypothese angenommen werden, dass die Zellschädigung nicht auf das Stratum ganglionare begrenzt bleibt, sondern weitere Schichten der Retina, bzw. die Synapsen weiterer Schichten, betroffen sind.

Es ist bekannt, dass der Untergang von Synapsen in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen häufig dem eigentlichen Zelltod vorausgeht (SANTOS et al., 2017). Tatsächlich bildet der Verlust von Synapsen einer Zelle häufig den Anfang des späteren Eintritts der Zelle in die Apoptose oder Nekrose (DAVIES et al., 1987; SANTOS et al., 2017).

Ein wesentlicher Schritt der synaptischen Degeneration ist der Verlust von Proteinen der Präsynapse, welche in Prozessen wie Endo- oder Exozytose sowie am strukturellen Aufbau der Synapse beteiligt sind (LATINA et al., 2017; WANG et al., 2017). Eben dieser Prozess des frühen Untergangs von Synapsen mit konsekutivem Absterben der Zelle konnte auch in der Retina, etwa nach hypertensiver Schädigung, nachgewiesen werden (OU et al., 2016). Somit ist auch der Untergang von Synapsen in der Netzhaut im Rahmen der MS wahrscheinlich, z.B. als Folge der transzellulären zytotoxischen Ausbreitung auf Nachbarzellen, oder als unabhängiger degenerativer Prozess nach neuronaler Schädigung. Von verschiedenen entzündlichen Erkrankungen der Retina, wie etwa der Retinitis pigmentosa, ist bekannt, dass auch hier nicht nur die primär geschädigten Zellen degenerieren, sondern auch anfänglich nicht betroffene Nachbarzellen früh geschädigt werden (KRANZ et al., 2013; RIPPS, 2002). Derzeit liegt als Erklärungsansatz für diese Erkenntnisse u.a. die Bystander-Hypothese vor. Nach dieser Hypothese werden entzündlich-toxische Botenstoffe über interzelluläre Kanalproteine in Nachbarzellen weitergeleitet, welche hierdurch ebenfalls degenerativen Prozessen unterliegen können. Es kommt zu einer sekundären Läsion, welche das Ausmaß der primären Schädigung übersteigen kann (AKOPIAN et al., 2014; KERMER et al., 1999). Über das sehr dichte interzelluläre Gap-junction-Netzwerk in der Retina können potentiell auch pro-inflammatorische und toxische Substanzen in die vernetzten Zellen übertreten und so pathologischen Zellprozesse auslösen (SOHL et al., 1998; SOHL et al., 2010; STRIEDINGER et al., 2005). Hierdurch ist theoretisch eine weitläufige Ausdehnung der primären Läsion der Ganglienzellen über verschiedene retinale Zellen bis hin zu den Fotorezeptoren (AKOPIAN et al., 2014) mit einer deutlichen Abnahme der Dichte der synaptischen Verbindungen denkbar (DAVIES et al., 1987; SANTOS et al., 2017). Daher bietet die Bystander-Hypothese einen möglichen Erklärungsansatz für den Synapsenuntergang innerhalb verschiedener Schichten bis zur äußeren Retina.

Dembla et al. konstatierten in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit eine primäre Degeneration der Ribbon-Synapsen, welche zeitlich unabhängig von der Neuritis optica auftritt (DEMBLA et al., 2018). Hier gelang im EAE-Modell der Nachweis autoreaktiver Antikörper gegen verschiedene Retina-Proteine, darunter auch gegen Protein-Bestandteile von Ribbon-Synapsen. Die genauen pathologischen Mechanismen, die zu dieser Autoantikörperbildung gegen die retinalen Proteine führen, sind Gegenstand aktueller Forschung.

Die Läsion der verschiedenen Synapsen der inneren und äußeren Retina kann zu visuellen Beeinträchtigungen bei den betroffenen Patienten beitragen. Wie genau diese Synapsendegeneration zu Stande kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Ob eine interzelluläre Ausbreitung der ursprünglich vom ZNS ausgehenden Läsion im Sinne der

Bystander-Hypothese primär als Pathomechanismus bei MS in Betracht kommt, müsste noch untersucht werden, etwa durch *in vivo* Ca^{2+} -Signaling in einem entsprechenden Versuchsaufbau. Auf der anderen Seite käme auch ein primär degenerativer Effekt durch Entzündungszellen, Autoantikörper und Mediatorsubstanzen in den verschiedenen retinalen Schichten mit separaten Entzündungsherden und Autoantikörperbildung gegen retinale Proteine in Frage. Eine pathologisch erhöhte Permeabilität der Blut-Retina-Schranke könnte hier den Übertritt toxischer und pro-inflammatorischer Botenstoffe oder Autoantikörper gegen retinale Zellbestandteile in die Retina ermöglichen und so zu einer weiteren, von der retrograden Ausdehnung in die Ganglienzellen unabhängigen Infiltration der Retina führen (CAMPBELL et al., 2018; DEMBLA et al., 2018). Verschiedene Studien zeigen, dass sich die Permeabilität der Blut-Retina-Schranke tatsächlich z.B. unter toxischen oder inflammatorischen Einflüssen verändert (BROOKS et al., 2005; OKUMURA, MOCHIZUKI, 1988). Barzar et al. konnten bereits im Jahre 1982 nachweisen, dass sich in der Blut-Retina-Schranke durch zentrale Inflammation ein Leck bildet, und folgerichtig die trans-retinale Permeabilität signifikant erhöht werden kann (BARZA et al., 1982). Hierdurch wird entsprechend der Übertritt von sonst nicht permeablen Substanzen in die Netzhaut ermöglicht. Dieser Pathomechanismus könnte auch bei der okulären Pathogenese der MS eine Rolle spielen, da auch hier eine ausgeprägte zentrale Inflammation stattfindet und viele pro-inflammatorische Substanzen und Autoantikörper freigesetzt werden, welche die Schranke passieren könnten. Vor diesen Hintergründen ist von verschiedenen Infiltrationswegen der pathologischen und pro-inflammatorischen Substanzen im Rahmen der okulären Beteiligung der MS auszugehen: Der Übertritt verschiedener Noxen und autoreaktiver Antikörper durch die Blut-Retina-Schranke und eine retrograde Ausdehnung über die Axone der optischen Nerven scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, wie verschiedene Arbeiten nahelegen (AKOPIAN et al., 2016; GRAMLICH et al., 2011). Entsprechend ist aktuell eine multifaktorielle Genese der retinalen Veränderungen bei MS wahrscheinlich, die verschiedene Komponenten des humoralen und zellulären Immunsystems sowie eine Vielzahl von Botenstoffen einbezieht. Zusammenfassend scheinen das visuelle System und insbesondere die Retina deutlich stärker durch die MS in Mitleidenschaft gezogen zu werden, als noch vor kurzem angenommen.

Die mikroanatomische Analyse der murinen Retinae warf eine weitere Frage zum Ausmaß des retinalen Zellschadens der äußeren Retina auf: Da in dieser Arbeit keine Apoptose in Zellen außerhalb des Stratum ganglionare detektiert wurde, stellt sich nun die Frage, ob parallel zur Synapsendegeneration auch bereits die Perikaryen der betroffenen Neurone degenerieren. Entsprechend müsste Nekrose, Nekroptose oder Apoptose in der äußeren Retina zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden haben oder erst nach dem Ende der 21

Versuchstag ab EAE-Induktion stattfinden, da keine CC3-immunpositiven Zellen in den entsprechenden Zellschichten der Retina gefunden werden konnten. Für einen späteren Eintritt in die Apoptose verglichen mit den Ganglienzellen würde sprechen, dass wie bei verschiedenen neuronalen Erkrankungen zunächst die Synapsendichte abnimmt, bevor das Perikaryon des Neurons degeneriert (DAVIES et al., 1987; SANTOS et al., 2017). Eine Möglichkeit, zu untersuchen, ob und wann die Perikaryen weiterer Schichten der Netzhaut degenerieren, wäre beispielsweise ein längerer Versuchszeitraum mit einer größeren EAE-Gruppe. Hierdurch könnten mehr Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten gezielt diesbezüglich untersucht werden.

Die Analyse der RIBEYE- und Cx36-Färbungen der EAE/Sc2-Gruppe zeigten zudem, dass sich der gleiche erhobene Score-Wert der Tiere auch in Bezug zu der mikroanatomisch gemessenen immunpositiven Fläche setzen lässt: Die Messwerte waren deutlich homogener um den jeweiligen Median verteilt als die der anderen EAE-Gruppen (vgl. Ergebnisteil). Hieraus lässt sich theoretisch annehmen, dass sich das Ausmaß der Paralyse auch mikroanatomisch in der veränderten Proteinexpression des Gewebes teilweise widerspiegelt. Es scheint ein Zusammenhang zwischen den klinischen Symptomen und der Zelldegeneration im visuellen System zu bestehen. Entsprechend wäre bei Tieren mit einem Score 1 eine größere immunpositive Fläche und bei Tieren mit einem Score 3 eine kleinere immunpositive Fläche zu erwarten. Um diese Annahme zu verifizieren, würde sich eine zusätzliche Präparation der Retinae von Versuchstieren als Whole mount-Präparat (flächig herausgelöste Retina) eignen. Mit dieser Präparationsform wäre eine detaillierte quantitative Analyse pathologisch veränderter Zellen in der ganzen Retina möglich, welche dann mit dem Score des Tieres korreliert werden könnte. In dieser Arbeit war dieses Präparationsverfahren aufgrund der kleinen N-Zahl jedoch nicht möglich. Dieser Aspekt könnte jedoch in zukünftigen Projekten umgesetzt werden. In dieser Arbeit konnte durch die Schnittführung durch die Retina eine sehr gute Übersicht über die verschiedenen Schichten gewonnen werden. So war es möglich, viele verschiedene Färbungen an derselben Retina zu analysieren und die pathologischen Veränderungen den einzelnen Schichten zuzuordnen. Letztlich war es hier durch diese Vorgehensweise möglich, ein größeres Spektrum mikroanatomischer Strukturen an ein und derselben Retina zu untersuchen. Es konnte so beispielsweise gezeigt werden, dass Apoptose nach 21 Versuchstagen nur im Stratum ganglionare stattfindet, aber dennoch auch Zellen der äußeren retinalen Schichten unter EAE signifikante Veränderungen aufweisen.

6.4.2 Die komplexe Funktion des Connexin 36 in der Pathogenese der EAE in der Retina

Die Ergebnisse der Fläche des immunpositiven Cx36 in der inneren plexiformen Schicht zeigten einen größeren Standardfehler bzw. Streuung der Einzelwerte im Vergleich zu den Werten der RIBEYE-Expression in der äußeren plexiformen Schicht (vgl. Ergebnisteil Kap. 5.1.6 und 5.2.6). Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, zeigten alle Gruppen, auch die Kontrollgruppe, eine große Streuung der Cx36-immunpositiven Flächeneinzelwerte um den Median. Die homogensten Werte bezüglich der Verteilung der Einzelwerte um den Median und die Percentilen zeigten in dieser Arbeit die Gruppen EAE/Sc2- und die PBN-Gruppe. Die Score-2 Tiere haben alle etwa zum gleichen Zeitpunkt, nach 14+/-1 Tagen ihren Score erreicht. Daher könnte sich bei ihnen durch ein ähnliches Krankheitsstadium mit ähnlich starker zellulärer Beteiligung im visuellen System die Connexin-Expression entsprechend einheitlich verändert haben. Die Tiere der EAE-Gruppe wiesen dagegen zum Zeitpunkt der Organentnahme sehr unterschiedliche Score-Werte auf (vgl. Ergebnisteil Kap. 5.1.1). Dies könnte sich auch in der größeren Streuung der Messwerte um den Median widerspiegeln: Bei Tieren mit einem niedrigeren Score könnten die Werte der Cx36-immunpositiven Fläche höher liegen als bei Tieren mit höheren Scores und einer stärkeren zentralen Inflammation. Auf der anderen Seite könnten die Ergebnisse aber auch eine Veränderung der Expression zeigen, die nicht direkt vom Score abhängt, sondern durch molekulare Mechanismen und endogene Signalkaskaden mitbeeinflusst wurde, wie u.a. die Autoren Striedinger und Akopian et al. konstatieren (siehe unten). Diese Annahme würden auch die Werte der Kontrolltiere stützen, die ohne Intervention eine breite Streuung der Messwerte zeigten. Diese Werte lagen für einige Tiere im niedrigen Wertebereich der EAE-Tiere und für andere Tiere bei doppelt so hohen Werten (vgl. Ergebnisteil). Diese Ergebnisse bieten viele Diskussionspunkte: a) Eine Korrelation der Cx36-Expression mit der Läsionsgröße in der Retina und b) die große Streubreite der Messwerte in der Kontrollgruppe.

Zu a): Wie bereits beschrieben, sind Connexine als transzelluläre Kanalproteine wichtig für die transzelluläre Kommunikation, aber auch für die sekundäre degenerative Schädigung von Neuronen etwa durch den Bystander-Effekt (AKOPIAN et al., 2014; DE MAIO et al., 2002). Da Cx36 das physiologisch am stärksten exprimierte Connexin in der Retina ist (GULDENAGEL et al., 2000; SOHL et al., 1998; SOHL et al., 2000; STRIEDINGER et al., 2005), kommt ihm hier sowohl im Zuge des Bystander-Effektes als auch bei einer möglichen neuroprotektiven Wirkung bei der physiologischen Zellkommunikation eine zentrale Rolle zu (AKOPIAN et al., 2014; LIN et al., 1998). Als Bestandteil elektrischer Synapsen ändert sich die Connexin-Expression als Folge der EAE potentiell zeitlich früh in der Pathogenese. Gleichzeitig könnten die Connexine über den Bystander-Effekt als Proteine der Gap

junctions aber auch den interzellulären Stoffaustausch der potentiell toxischen oder protektiven Moleküle vermitteln. Des Weiteren liegt die Dichte der Connexin-Verbindungen zwischen den verschiedenen retinalen Schichten deutlich über der durchschnittlichen Expression von Gap junctions im ZNS, was bedeuten könnte, dass die Effekte in der Retina deutlich stärker ausgeprägt sind (SOHL et al., 2000; SOHL et al., 2005). Eventuell wird durch eine verringerte Cx36-Expression gezielt durch die Zelle der Bystander-Effekt reduziert und die Zelle selbst geschützt. Entsprechend würden die hier gefundenen niedrigen Cx36-Expression-Werte in den verschiedenen Gruppen nicht nur eine Degeneration zeigen, sondern eventuell auch eine aktive verringerte Expression der Zelle zum Selbstschutz.

Zu b): Es ist bekannt, dass es in murinen Wildtyp-Tieren zu lokalen Expressionsschwankungen der Connexine in der Retina kommt (SOHL et al., 1998). Striedinger et al. konstatierten im Jahr 2005 die essentielle Mitbeteiligung des Cx36 bei der Vermittlung einer indirekten Schädigung retinaler Zellen. Sie beschreiben, dass einige Tage nach einer Licht-induzierten Läsion der Retina die Connexin-Expression signifikant anstieg und im zeitlichen Verlauf des Experiments ohne Intervention wieder abfiel (STRIEDINGER et al., 2005). Hierdurch konnten sie zeigen, dass die Expression sehr sensibel auf pathologische Veränderungen des zellulären Milieus reagierte und noch Veränderungen in der Expression auftreten können, wenn keine externe Noxe mehr einwirkt. Des Weiteren wies Striedinger nach, dass in Cx36-defizienten-Mäusen die zelluläre Degeneration stärker ausgeprägt war als in Wildtyp-Tieren. Sie postulierten hier, dass der Signalstoffwechsel durch die Connexin-Kanäle ebenfalls einen entscheidenden Beitrag zur Protektion der Zellen leistet, welcher entspreched bei den Cx36-defizienten-Mäusen fehlte (STRIEDINGER et al., 2005). Dem gegenüber stehen experimentelle Ergebnisse von Akopian et al. (AKOPIAN et al., 2014), welcher bei Cx36-defizienten-Mäusen (keine Cx36-Expression in den retinalen Ganglienzellen) eine signifikante Reduktion einer sekundären Läsion in den benachbarten Zellen feststellen konnte. Vor diesen Erkenntnissen scheint eine komplexe Funktion des Cx36 wahrscheinlich: Es scheint einen partiell neuroprotektiven Effekt durch transzelluläre Kommunikation zu geben, welchem der neurotoxische Bystander-Effekt gegenübersteht. Dabei unterliegt die zelluläre Expression jedoch auch ohne externe Noxen einem großen physiologischen Streumaß (SOHL et al., 1998). Dies könnte u.a. damit zusammenhängen, wie aktiv ein Tier seinen Sehsinn während eines Versuchszeitraums eingesetzt hat. Auch diese Hypothese könnte in einem zukünftigen Versuch überprüft werden.

Es scheint von Interesse, diese Phänome nachzuverfolgen, um den genauen molekularen Zusammenhang zwischen Connexin-Expression und Läsionsgröße, bzw. physiologischem Expressions-Bereich nachvollziehen zu können.

6.5 Veränderungen der untersuchten retinalen Proteine bei anderen Erkrankungen

An dieser Stelle stellt sich nun die Frage, ob die in dieser Arbeit gemessenen Veränderungen der retinalen Proteine auch bei anderen Erkrankungen auftreten. Diese Frage könnte interessant sein, um herauszufinden, ob der beobachtete Proteinverlust spezifisch unter EAE bzw. bei der MS auftritt. Die Expression des spezifischen Ganglienzellproteins RBPMS verändert sich beispielsweise auch bei experimentell herbeigeführter transienter Ischämie der Retina und wurde von Dibas et al verwendet, um die Ganglienzellichte im Stratum ganglionare zu messen (DIBAS et al., 2018; STIEBEL-KALISH et al., 2017). Auch unter transienter Ischämie nahm die Dichte der RBPMS-positiven Zellen ab (DIBAS et al., 2018). Ebenso konnte an humanem Spendergewebe von Patienten mit fortgeschrittenem Glaukom eine deutlich reduzierte Expression von RPBMS im Vergleich zur gesunden Retina gemessen werden. Die Autoren dieser Studie führten diesen Effekt auf die retinalen Langzeitschäden des Glaukoms zurück (OBARA et al., 2016). Da durch RBPMS spezifisch die Ganglienzellen erfasst werden können, sprechen die Ergebnisse dieser Studien für einen Verlust der Ganglienzellen durch Ischämie und erhöhten intraokulären Druck. Die retinalen Ganglienzellen werden nachweislich bei vielen Erkrankungen unterschiedlicher Genese geschädigt. Dieses Phänomen ist nicht spezifisch für die MS oder EAE. Dennoch zeigen diese Vorarbeiten, dass RBPMS ein spezifischer und sensitiver Marker für die Ganglienzellen ist und sich gut eignet, um eine Reduktion der Zellzahlen zu erfassen.

Die Schwankungen der Messwerte der Expression des Cx36 wurden bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben. Kihara et al. konstatieren beispielsweise, dass Cx36 eine wichtige Rolle bei der neuronalen Plastizität in der Retina spielt. Die Autoren konnten zeigen, dass sich die Expression des Cx36 der elektrischen Synapsen bei Tieren mit wenigen Fotorezeptoren deutlich reduzierte und sich so der interzelluläre Stoffaustausch verringerte. Die Ergebnisse wurden bei Tieren mit Defizienz an Fotorezeptoren (genetisch herbeigeführte verringerte Anzahl der Zellen in der Retina) gemessen. Entsprechend scheinen die neuronalen Zellen der Retina auch auf eine niedrige interzelluläre retinale Kommunikation mit einer Abnahme der elektrischen Synapsen zu reagieren, ohne den Einfluss einer äußeren Noxe (KIHARA et al., 2008). Akopian et al. konnten eine Mitbeteiligung des Cx36 beim sekundären Zelluntergang in glaukomatös geschädigten Retinae nachweisen. Auch hier scheint die Kanalfunktion des Cx36 als interzellulärer Weg für toxische Moleküle in die Nachbarzellen entscheidend zu sein (AKOPIAN et al., 2017)

Die RIBEYE-Proteine der synaptischen Ribbons der Fotorezeptoren sind ebenfalls in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder beeinträchtigt. So konnte in Studien zur Retinitis pigmentosa nachgewiesen werden, dass RIBEYE durch Interaktion mit dem Protein

Tulp1 zum Erhalt von Ribbon-Synapsen im entzündeten Gewebe beiträgt: Tulp1-defiziente-Mäuse zeigten in dieser Studie eine deutliche Reduktion von RIBEYE-Strukturen im Vergleich zu Tieren mit normaler Tulp1-Expression. Entscheidend für den Erhalt der Ribbons war die Interaktion dieser beiden Proteine (WAHL et al., 2016). Entsprechend scheint die RIBEYE-Expression im entzündeten Gewebe durch Interaktionen mit weiteren Molekülen und Proteinen regulierbar zu sein. Vielleicht gibt es hier auch pharmakologische Angriffspunkte, um die Ribbon-Synapsen bei retinaler Inflammation zu schützen. Die Analyse der weiteren molekularen Mechanismen, die zum Verlust des RIBEYE bei EAE beigetragen haben, wäre sicherlich auch ein interessanter Ausgangspunkt für zukünftige Studien.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hier untersuchten Proteine in der Retina im pathologischen Milieu der EAE beeinflusst wurden. Die EAE resultiert in einer Apoptose retinaler Ganglienzellen und beeinflusst die Expression der Proteine elektrischer und chemischer Synapsen

6.6 Therapeutischer Einsatz von Probenecid bei neurodegenerativen Erkrankungen

Im zweiten Teil dieser Arbeit war ein möglicher präventiv-therapeutischer Einsatz des Panx1-Inhibitors Probenecid untersucht worden. Es wurde ein potentieller Effekt sowohl auf die motorische Beeinträchtigung der Versuchstiere (Scores) als auch auf die untersuchten Strukturen in der Retina analysiert.

6.6.1 Positiver Effekt von PBN auf die klinischen Symptome im Mausmodell

Im zweiten Ergebnisteil waren zunächst wieder die klinischen Symptome (Scores) der Versuchstiere unter EAE untersucht worden. Ab dem ersten Tag des Experimentes wurden die individuellen klinischen Scores der Tiere der PBN- und Solvent-Gruppen täglich dokumentiert. Hier zeigte sich in der Datenanalyse ein signifikanter Unterschied der EAE/PBN-Gruppe hin zu deutlich niedrigeren Score-Werten. Während die Tiere der Solvent-Gruppe durchschnittlich nach 22 Versuchstagen mit einem Score von 2,58 ihre hintere Extremität nicht mehr bewegen konnten, zeigten zwei der hier analysierten Tiere der EAE/PBN-Gruppe nur eine leichte Plegie der Schwanzspitze und die Mehrzahl eine unvollständige Paralyse der hinteren Extremität (der Mittelwert an Tag 22 lag bei 0,5). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Ausmaß der klinisch nachweisbaren Paralyse der Tiere bereits durch eine Gabe von 100 mg/KG PBN protektiv beeinflusst wurde: An den Tagen 17 und 19 unterschied sich die PBN-Gruppe signifikant von der Solvent-Gruppe, wohingegen kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe bestand. Daher kann ein partiell protektiver Effekt des Probenecid auf die Sensomotorik der Versuchstiere im EAE-Modell angenommen werden. Bestätigt werden könnten diese ersten Ergebnisse durch eine größere Therapiegruppe und eventuell eine längere Behandlungsdauer. Ein weiterer

interessanter experimenteller Ansatz wäre die Erhebung einer Dosis-Wirkungs-Kurve mit verschiedenen Gruppen unter unterschiedlicher Dosierung.

6.6.2 Reduktion der Apoptose von Ganglienzellen durch PBN

Im zweiten Ergebnisteil waren die Daten der CC3-Immunhistochemie der PBN- und der Solvent-Gruppen quantitativ ausgewertet worden. Dabei konnten signifikante Unterschiede zwischen der PBN- und der Solvent-Gruppe, sowie zwischen der Solvent- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Kontrollgruppe wies keine apoptotischen Zellen in den gesamten Transversalschnitten der Augen auf, die Solvent-Gruppe aber im Median 4 pro Schnitt. Die PBN-Gruppe unterschied sich signifikant von der Solvent-Gruppe, nicht aber von der Kontrollgruppe. Daraus kann geschlossen werden, dass die Therapie mit PBN das Ausmaß der einsetzenden Apoptose im Stratum ganglionare reduziert und die Zellen teilweise vor Eintritt in die Apoptose geschützt hat. Mit diesem Ergebnis wird auch der erste Teil der zweiten Arbeitshypothese bestätigt: Es war angenommen worden, dass die PBN-Intervention eine Prävention der neuronalen Schädigung im Auge zur Folge hat, d.h. dass weniger retinale Zellen in eine EAE-induzierte Apoptose eintreten würden. Die Ergebnisse der CC3-Immunhistochemie lassen sich wie folgt zusammenfassen: Metaanalysen an MS-Patienten bestätigen sowohl eine Abnahme der Axon-Dichte in den Nn. optici, also eine Abnahme der Nervenfasern, welche aus dem Stratum ganglionare ziehen (GARCIA-MARTIN et al., 2017). Ebenso ist eine Abnahme der Perikaryen, also der Ganglienzellkörper bereits nachgewiesen worden (HUANG et al., 2018; LARABEE et al., 2016). In dieser Arbeit ließen sich die deutlich reduzierten Scores der PBN-Gruppe im Vergleich zur Solvent-Gruppe mit den histologischen Untersuchungen in Zusammenhang stellen: Die PBN-Tiere waren klinisch weniger stark krank, was sich auch mikroanatomisch durch weniger Zelluntergang widerspiegelte. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der degenerierten Axonen und der Abnahme der Zelldichte im Stratum ganglionare hergestellt werden. Dafür wurde hier folgender möglicher Erklärungsansatz gefunden:

Wird zentral das Ausmaß der Entzündung nachweislich durch die präventive i.p. PBN Gabe herabgesetzt und hierdurch auch die Retrobulbärneuritis reduziert, würden im Zuge dessen auch weniger Axone geschädigt werden. Hierdurch könnte zumindest das apoptotische Absterben der Zellkörper der Axone, der Ganglienzellen, herabgesetzt werden. Es würde also in diesem Falle eine systemische Applikationsform des Pharmakons ausreichen, um auch einen protektiven Effekt auf die retinalen Ganglienzellen zu erzielen. Um diese Annahme zu bestätigen, würde sich z.B. eine Analyse mit Whole mount Retina-Präparaten oder mittels quantitativer real time RT-PCR Analysen der präventiv behandelten Tiere eignen. So könnte die genaue Anzahl apoptotischer Zellen bzw. der Proteinanteil der

Ganglienzellen einer ganzen Retina erfasst und Rückschlüsse auf die Wirkstärke des PBN im Auge gezogen werden.

6.6.3 Effekte der PBN-Therapie auf das tatsächliche Ausmaß des Ganglienzellschadens

Die Analyse des Ausmaßes der Zelldegeneration durch die EAE im Stratum ganglionare ergab, dass sich die absolute Anzahl intakter Zellen trotz präventiver Behandlung im Vergleich zur Kontrolle reduziert hatte. Allerdings war der Median der PBN-Gruppe deutlich höher als der entsprechende Parameter der Solvent-Gruppe. Es bestanden weder signifikante Unterschiede zur Kontroll- noch zur Solvent-Gruppe. Entsprechend waren die Ergebnisse nicht eindeutig einzuordnen.

Möglicherweise sind diese Ergebnisse auf die kleine N-Zahl in der PBN-Gruppe zurückzuführen, so dass weiterführende Analyse mit einer größeren N-Zahlen eindeutiger Ergebnisse liefern würde. Zudem ist es möglich, dass die i.p. Gabe des niedrig dosierten PBN nicht stark genug in der Retina wirken konnte. Da kein signifikanter Unterschied zwischen der PBN- und der Kontrollgruppe bestand, könnte zwar ein partieller Effekt des PBN, reflektiert in der höheren Anzahl immunpositiver Ganglienzellen, gemessen worden sein, der in der Wirkung jedoch nicht groß genug war, um signifikante Unterschiede zur Solvent-Gruppe zu bewirken. Dies wiederum könnte bedeuten, dass entweder a) die Dosis oder Applikationsform des Pharmakons nicht effektiv genug war für die relevante Protektion retinaler Zellen, oder b), dass die retrograde Ausbreitung der Retrobulbärneuritis in die Retina nicht die einzige Ursache für die retinale Läsion bei der MS ist.

Zu a): Da in der EAE/PBN-Gruppe weniger apoptotische Zellen in dieser Arbeit gefunden wurden, war ein partieller antiapoptotischer Effekt des PBN angenommen worden. Vielleicht könnte dieser Effekt durch eine höhere Dosis des Pharmakons verstärkt werden. Um die Retrobulbärneuritis effektiver zu minimieren, wäre auch eine intrathekale Applikation des Pharmakons denkbar. Durch eine intrathekale Applikationsform kann im Gegensatz zu einer intraperitonealen Injektion die Blut-Hirn-Schranke umgangen werden (INEICHEN et al., 2017). Bei einer i.p. Injektion muss das Pharmakon dagegen erst über die Blut-Hirn-Schranke treten, um im ZNS wirken zu können. Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus einem mehrschichtigen Aufbau um das nicht gefensterte Kapillarsystem der Pia mater (DANEMAN, PRAT, 2015). Die Endothelzellen der Kapillaren stehen durch Tight junctions untereinander in Kontakt und verhindern so die unselektive Parazytose von luminal befindlichen Molekülen ins ZNS. Die Zellen werden von Perizyten und perivaskulären Muskelzellen umgeben, welche ebenfalls untereinander verschiedene Zell-Zell-Verbindungen bilden und hierdurch eine Wandschicht der Kapillaren bilden. An der basal gelegenen Basalmembran der

Endothelzellen ummanteln Astrozyten mit ihren Zytoplasmaausläufern die Endothelzellen und bilden durch eine feste Verankerung mit der Basalmembran eine weitere Barrierschicht aus. Ebenso sind der Basalmembran perivasale Makrophagen angelagert, welche Keime und Stoffe phagozytieren können (DANEMAN, PRAT, 2015; INEICHEN et al., 2017; YOU et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

Diese Barriere bildet so eine Selektivität für den Eintritt von Stoffen ins ZNS. PBN kann diese Schranke passieren und ist im ZNS *in vivo* detektierbar (QI et al., 2015). Zudem kann die Permeabilität der Schranke beeinflusst werden und die effektive Wirkdosis eines Pharmakons durch die Blut-Hirn-Schranke reduziert werden (XIE et al., 2000)(NAU et al., 2010). Vergleichend könnte daher in zukünftigen Studien eine intrathekale Injektion des PBN durchgeführt werden, um hohe Wirkspiegel des Pharmakons im ZNS zu erzielen.

Zu b): Sollte die Retrobulbärneuritis nicht der alleinige bzw. überwiegende Mechanismus für die retinale Läsion unter EAE sein, wäre eine systemische oder intrathekale Applikation des Pharmakons wahrscheinlich auch in höherer Dosis nicht ausreichend. Wie Dembla et al. zeigen konnten, kann es auch zu einer von einer Neuritis optica unabhängigen primären Degeneration der Ribbon-Synapsen in der äußeren Retina kommen (DEMBLA et al., 2018). In dieser Arbeit wurden autoreaktive Antikörper gegen spezifische Proteine in der Retina als Schädigungsmechanismus konstatiert. Auch die Ergebnisse dieser Studie waren im EAE-Modell gewonnen worden. In diesem Szenario wäre der beobachtete intraokulare Effekt des i.p. verabreichten PBN nur nach Passage sowohl der Blut-Hirn-Schranke als auch der Blut-Retina-Schranke zu erreichen, um eine intraokuläre Wirkung zu erzielen. Es ist bekannt, dass die retinale Permeabilität eines systemisch verabreichten Pharmakons stark von seiner Fähigkeit, die Blut-Retina-Schranke zu passieren, abhängt (KUBO et al., 2017). Die äußeren Schichten der Retina mit den darin gelegenen Sehsinneszellen werden per Diffusion aus den feinen Kapillaren der Choroidea (Aderhaut) versorgt. Diese Kapillaren bilden zur Netzhaut die Blut-Retina-Schranke aus, welche den freien Stoffaustausch zur Retina limitiert und sich ihrerseits in einen inneren und einen äußeren Teil gliedert. Die innere Blut-Retina-Schranke wird durch Tight junctions, feste interzelluläre Verbindungen zwischen den kapillären Endothelzellen, gebildet (CAMPBELL et al., 2018). Analog zur Blut-Hirn-Schranke wird hierdurch vor allem die unkontrollierte Parazytose und parazelluläre Diffusion in die Retina von Stoffen wie Antikörpern, Toxinen und verschiedenen Enzymen verhindert (CAMPBELL et al., 2018; HAWKINS, DAVIS, 2005). Ein wichtiger Bestandteil der äußeren Blut-Retina-Schranke ist das retinale Pigmentepithel (PE), das eine metabolische Hämostase der Netzhaut ermöglicht und aktiv schädliche Metaboliten aus dem Stratum neuronale abtransportiert (SIMO et al., 2010). Sowohl die innere als auch die äußere Blut-Retina-Schranke besitzen verschiedene Transportproteine, welche den Einstrom in die Netzhaut

regulieren. Hierdurch ergibt sich eine selektive Permeabilität der Blut-Retina-Schranke (KUBO et al., 2017).

Wie auch bei der Blut-Hirn-Schranke, kann sich unter pathophysiologischen Bedingungen die selektive Permeabilität der Blut-Retina-Schranke z.B. per Modulation dieser Transporter oder der Tight junctions verändern (CAMPBELL et al., 2018). Zu diesen pathologischen Auslösern zählen u.a. eine zentrale Inflammation sowie toxische Agenzien (BROOKS et al., 2005; OKUMURA, MOCHIZUKI, 1988). Für Probenecid wurde ein pharmakologischer Effekt auf die Blut-Retina-Schranke nach intraperitonealer Injektion erforscht (SUNKARA et al., 2010): Anhand eines erhöhten Transportes der Anionensäure N-[4-(benzoylaminophenyl)sulfonyl]glycine (BAPSG) unter i.p. Gabe von PBN konnten sie zeigen, dass PBN den Ionentransport durch die Blut-Retina-Schranke beeinflussen kann und selbst über den systemischen Blutfluss in die Retina diffundieren kann. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Blut-Retina-Schranke für PBN permeabel ist. Des Weiteren konnten Engler et al. zeigen, dass PBN auch den Ausstrom von Substanzen aus der Retina in den systemischen Kreislauf durch Kanalinhhibition reduzieren kann (ENGLER et al., 1994) und dass PBN einen stärkeren Effekt auf den Aus- als auf den Einstrom von verschiedenen Substanzen im Auge zu haben scheint (BARZA et al., 1982; ENGLER et al., 1994).

Somit konnte bereits gezeigt werden, dass systemisch verabreichtes PBN nicht nur in das ZNS und retinale Zellen gelangt, sondern durch Kanalinteraktionen auch die Permeabilität der Blut-Retina- und Blut-Hirn-Schranke modifiziert. Allerdings ist noch nicht detailliert erforscht, wie viel systemisch verabreichtes PBN sich im ZNS bzw. in der Retina anreichert und ab welcher Dosis es hier protektiv auf die Zellen wirken kann. Auf der anderen Seite ist noch nicht bekannt, auf welchen Wegen die Retina im Rahmen der EAE überhaupt geschädigt wird. Sollte die retrograde Ausweitung der Neuritis optica nicht als Hauptursache überwiegen, würden eventuell in der Retina lokalisierte Entzündungsherde- bzw. Läsionen von Bestandteilen der Synapsen durch Autoantikörper durch die hier angewendete i.p.-Injektion des PBN nicht effektiv minimiert. Experimentell wären neben einer höheren protektiven Dosis eine intrathekale oder eine regelmäßige intravitrale Injektion denkbar. Für einige primär degenerative Erkrankungen der Retina, wie etwa der trockenen Makuladegeneration, wurde dieses Verfahren mit anderen Substanzen bereits erfolgreich etabliert (LAI, 1990). In diesem Zusammenhang bliebe allerdings noch zu klären, inwiefern PBN für diese intrathekale und intraokuläre Verabreichungsform geeignet ist und welche Konzentration und Menge am besten verträglich ist.

6.6.4 Verringerte Expressionsflächendichte des Cx36

Die Analyse der Cx36-Expression nach PBN- bzw Solvent-Applikation zeigte eine signifikant geringere Cx36-immunpositive Flächendichte in der inneren plexiformen Schicht der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte waren vergleichbar derer der EAE/Sc2-Gruppe aus dem ersten Ergebnisteil. Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, dass die Therapie mit PBN die Abnahme der Cx36-Expression in dieser retinalen Zellschicht begünstigt. Wie bereits im ersten Diskussionsteil beschrieben, unterlag die Expression des Cx36 im Auge auch bei Wildtyp-Tieren großen Schwankungen und reagierte besonders schnell auf regionalen Untergang von Neuronen mit einem primären Expressionsanstieg (STRIEDINGER et al., 2005). Zudem wirkte sich die Cx36-Expression vermutlich auf die Größe der sekundären Läsion durch interzellulären Gap junction-vermittelten Einstrom toxischer Moleküle in die Nachbarzellen aus (AKOPIAN et al., 2014). Die Ergebnisse der EAE/PBN-Gruppe könnten zeigen, dass der Bystander-Effekt und somit die neurotoxische Wirkung unter EAE gegenüber dem protektiven Effekt des PBN überwiegen (SOHL et al., 1998; SOHL et al., 2000) (DE MAIO et al., 2002; LIN et al., 1998). Hierdurch wäre auch die niedrige Cx36-Expression in der inneren plexiformen Schicht der EAE/PBN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erklären.

Alternativ, wie bereits in Kap. 6.4.2 beschrieben, könnte eine protektive Abnahme des Cx36 nach PBN-Gabe stattgefunden haben, um den Übertritt von toxischen und pro-inflammatorischen Substanzen in die Nachbarzellen zu reduzieren. Entsprechend hätte dann zwar eine Abnahme des Cx36 stattgefunden, aber weitere Zellen wären vor degenerativen Prozessen geschützt worden und die hier gefundenen Ergebnisse würden keine Zellschädigung, sondern vielmehr eine Protektion von Nachbarzellen zeigen. Diese Ergebnisse könnten die Tatsache stützen, dass in dieser Arbeit keine apoptotischen Zellen in der inneren plexiformen Schicht gefunden wurden. Diese Annahme sollte allerdings durch weitere Analysen und eventuell eine größere Therapiegruppe untersucht werden. In jedem Fall scheinen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür zu sprechen, dass sowohl die EAE selbst, als auch das PBN einen Effekt auf die Cx36-Expression hat.

6.6.5 PBN verhindert nicht die frühe Degeneration retinaler Synapsen-Proteine

Dass die EAE einen Einfluss auf die Expression retinaler Zellstrukturen und hier v.a. auf die Synapsen hat, konnte bereits im ersten Ergebnisteil nachgewiesen werden. Als mögliche Ursachen für diese signifikante Reduktion der Expression von Synapsenproteinen wurden im vorangehenden Diskussionsteil u.a. retinale Entzündungsherde mit nachfolgend retrograder Läsion der Ganglienzellen, Autoantikörper gegen Synapsenproteine und der Bystander-Effekt, welcher eine indirekte sekundäre Läsion bewirkt, vorgestellt. Der zweite Ergebnisteil zeigte ähnliche Ergebnisse für die RIBEYE-Färbung. Hier unterschied sich die EAE/PBN-

von der Kontrollgruppe signifikant mit niedrigeren Werten des Immunsignals von 32,10 (Median immunpositiver Fläche in % der EAE/PBN-Tiere) zu 65,31 (Median immunpositiver Fläche in % der Kontrolltiere). Dies deutete auf eine fehlende oder unzureichende protektive Wirkung der hier verabreichten Dosis von PBN auf den Erhalt von Ribbon-Synapsenbestandteilen hin. Auch dieses Ergebnis ließe sich durch eine möglicherweise zu geringe intrathekale und intraokuläre Wirkung des PBN erklären. Somit zeigten die Ergebnisse sowohl der Cx36- als auch der RIBEYE-Färbung eine Abnahme des Immunflächensignals der untersuchten Proteine in der Retina sowie eine Abnahme der RBPMS-immunpositiven Zellzahl trotz präventiver Therapie.

Da jedoch die PBN-Gruppe höhere Werte von RBPMS-immunpositiven Ganglienzellen (Median) als die EAE-Gruppen zeigte, wurde hier zumindest ein protektiver Effekt des PBN vermutet. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Cx36-Färbungen konnte ein Teil der zweiten Arbeitshypothese bestätigt werden: So wurde ein protektiver Effekt durch PBN auf Somatomotorik und Ganglienzellen-Apoptose festgestellt; die Degeneration elektrischer und chemischer Synapsenbestandteile konnte hierdurch allerdings nicht nachweislich verringert werden. So bleibt die Frage, ob diese Ergebnisse durch eine größere Versuchsgruppe mit entsprechend höheren N-Zahlen einen besseren Überblick über das Ausmaß der zellulären Degeneration geben würden und das Ergebnis hierdurch bestätigt werden könnte oder doch ein protektiver Effekt des PBN in der äußeren Retina gezeigt werden würde. Auch wäre eine alternative Methode, etwa eine quantitative Bestimmung der Proteine mRNA-Expression mittels quantitativer real time RT-PCR geeignet, um das Ergebnis dieser Arbeit zu überprüfen. Aufgrund der Menge des gewonnenen Gewebes und der Präparations- und Asservationsart war die Durchführung solcher Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, bietet sich aber in zukünftigen Arbeiten an.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion der EAE im Tiermodell innerhalb von 22 Tagen sowohl zu klinisch messbaren Paralysen der Versuchstiere führte als auch degenerative Veränderungen an verschiedenen neuronalen Zellen der Retina zur Folge hatte. Analysiert wurden in der Retina primär die Ganglienzellen. Auch die Expression der Synapsenproteine Cx36 in der inneren plexiformen Schicht und RIBEYE in der äußeren plexiformen Schicht war gemessen worden und zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert. Der Fokus dieser Arbeit lag auf diesen beiden Schichten und dem Stratum ganglionare. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Retina in der Pathogenese der MS betroffen ist und auch die Expression verschiedener Proteine außerhalb des Stratum ganglionare verändert wurde. Besonders das RIBEYE-Protein in den äußeren Schichten ist bereits nach wenigen Tagen im EAE-Modell verändert, was durch die Analyse der Retinae der EAE/Sc2-Gruppe gezeigt werden konnte und im Einklang mit anderen Studien steht (Dembla et al. 2018). Die genauen pathologischen Vorgänge, die zur Schädigung retinaler Proteine und Zellen als Folge der EAE führen, bleiben aber weiterhin im Detail unklar.

Eine Möglichkeit für zukünftige Studien wäre, Whole mount-Präparate herzustellen. Diese Vorgehensweise könnte eine Übersicht über das Auftreten von Apoptose und Nekrose in den verschiedenen Schichten ermöglichen und eventuell die Frage näher klären, wann und wie genau die Neuronen degenerieren. Zudem wäre eine Gesamtübersicht über die Retina möglich. Neben Immunfluoreszenz und -histochemie sowie den klinischen Score-Werten wären noch weitere Methoden interessant, um die in dieser Arbeit gemessene Flächenabnahme der Expression der Proteine in der Retina quantitativ zu bestätigen. Diese Effekte könnten ebenfalls durch eine größere Zahl an Versuchstieren eventuell noch exakter erfasst werden. Wichtiger Parameter für zukünftige Studien wäre ebenfalls die objektive Erfassung der Sehleistung in den verschiedenen Versuchsgruppen.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte die zweite Arbeitshypothese teilweise bestätigt werden: Klinisch verbesserten sich die motorischen Defizite der Versuchstiere unter präventiver PBN-Gabe. Es traten signifikant weniger Ganglienzellen unter präventiver Therapie mit PBN in die Apoptose ein und die absolute RBPMS-immunpositive Ganglienzellzahl unterschied sich nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe. Entsprechend wurde eine zumindest leichtgradige Wirkung des PBN im Nervus opticus und Stratum ganglionare angenommen. Die Ergebnisse des zweiten Versuchsteils legen nahe, dass PBN antiapoptotisch im Stratum ganglionare wirken könnte. Allerdings war das Cx36- und RBPMS-immunpositive Flächensignal in der Retina bei der PBN-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle reduziert; es kam zur verringerten Expression der synaptischen Proteine in der inneren und äußeren

plexiformen Schicht. Die Wirkung auf die weiteren retinalen Schichten war in dieser Arbeit nicht mitberücksichtigt worden, könnte aber in zukünftigen Projekten analysiert werden.

Die RIBEYE-Expression wird durch molekulare Interaktion mit weiteren präsynaptischen Proteinen beeinflusst. Es kann sogar zusammen mit dem Protein Tulp1 den Erhalt von Ribbon-Synapsen im entzündeten Gewebe unterstützen (WAHL et al., 2016). Dies bietet ebenfalls interessante Ausgangspunkte für weitere Forschung, etwa wie die Tulp1 Interaktion mit RIBEYE verstärkt werden könnte und ob PBN hier einen Effekt hat. Cx36 scheint eine komplexe Funktion mit großen physiologischen Unterschieden der Expression in der Retina zu haben. Es scheint einen partiell neuroprotektiven Effekt durch transzelluläre Kommunikation zu geben, welchem der neurotoxische Bystander-Effekt gegenübersteht. Interessante Aspekte zukünftiger Projekte wären z.B., ob die Expression durch die aktive Sehleistung der Tiere beeinflusst werden kann. Auch bleibt die Frage zu klären, warum die Werte der Cx36-Expression der PBN-Gruppe unter der der Solvent-Gruppe lagen und ob hier eventuell eine Zell-protective Reduktion der Cx36-Expression durch die PBN-Gabe stattgefunden hat, die in einer Reduktion der transzellulären Ausbreitung neurotoxischer Moleküle resultieren könnte.

Zudem könnte in zukünftigen Studien versucht werden, durch verschiedene Dosen des PBN und eine intrathekale bzw. intraokuläre Injektion die Wirkstärke zu erhöhen, indem die Blut-Hirn- bzw. die Blut-Retina-Schranke umgangen wird.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit ein protektiver Effekt durch i.p. injiziertes PBN auf die EAE-induzierte Störung der Somatomotorik sowie den Eintritt von Ganglienzellen in die Apoptose festgestellt werden. Zudem konnten signifikante Veränderungen der Expression elektrischer und chemischer Synapsenproteine in verschiedenen retinalen Schichten als Folge der EAE nachgewiesen werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Abdollahpour-Alitappeh M, Hashemi Karouei SM, Lotfinia M, Amanzadeh A, Habibi-Anbouhi M (2018) A developed antibody-drug conjugate rituximab-vcMMAE shows a potent cytotoxic activity against CD20-positive cell line. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*:1-8
2. Acs P, Selak MA, Komoly S, Kalman B (2013) Distribution of oligodendrocyte loss and mitochondrial toxicity in the cuprizone-induced experimental demyelination model. *J Neuroimmunol* 262:128-131
3. Adamson SE, Leitinger N (2014) The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. *FEBS Lett* 588:1416-1422
4. Akopian A, Atlasz T, Pan F, Wong S, Zhang Y, Volgyi B, Paul DL, Bloomfield SA (2014) Gap junction-mediated death of retinal neurons is connexin and insult specific: a potential target for neuroprotection. *J Neurosci* 34:10582-10591
5. Akopian A, Kumar S, Ramakrishnan H, Viswanathan S, Bloomfield SA (2016) Amacrine cells coupled to ganglion cells via gap junctions are highly vulnerable in glaucomatous mouse retinas. *J Comp Neurol*
6. Akopian A, Kumar S, Ramakrishnan H, Roy K, Viswanathan S, Bloomfield SA (2017) Targeting neuronal gap junctions in mouse retina offers neuroprotection in glaucoma. *J Clin Invest* 127:2647-2661
7. Al-Sharman A, Khalil H, Nazzal M, Al-Sheyab N, Alghwiri A, El-Salem K, AlDughmi M (2018) Living with multiple sclerosis: A Jordanian perspective. *Physiother Res Int* 23:e1709
8. Aldskogius H, Kozlova EN (1998) Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. *Prog Neurobiol* 55:1-26
9. Androutsou ME, Tapeinou A, Vlamis-Gardikas A, Tselios T (2018) Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein and Multiple Sclerosis. *Med Chem* 14:120-128
10. Araujo SES, Mendonca HR, Wheeler NA, Campello-Costa P, Jacobs KM, Gomes FCA, Fox MA, Fuss B (2017) Inflammatory demyelination alters subcortical visual circuits. *J Neuroinflammation* 14:162
11. Asari H, Meister M (2014) The projective field of retinal bipolar cells and its modulation by visual context. *Neuron* 81:641-652
12. Bao L, Sachs F, Dahl G (2004) Connexins are mechanosensitive. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1389-1395
13. Baroja-Mazo A, Barbera-Cremades M, Pelegrin P (2013) The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1828:79-93
14. Bartlett R, Stokes L, Curtis SJ, Curtis BL, Sluyter R (2017) Probenecid directly impairs activation of the canine P2X7 receptor. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 36:736-744
15. Barz H, Schreiber A, Barz U (2017) Demyelinating diseases as a result of cerebral edema? *Med Hypotheses* 104:10-14
16. Barza M, Kane A, Baum J (1982) The effects of infection and probenecid on the transport of carbenicillin from the rabbit vitreous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22:720-726
17. Beckmann A, Schubert M, Hainz N, Haase A, Martin U, Tschernig T, Meier C (2016) Ultrastructural demonstration of Cx43 gap junctions in induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Histochem Cell Biol* 146:529-537
18. Behbehani R, Adnan H, Al-Hassan AA, Al-Salahat A, Alroughani R (2018) Predictors of retinal atrophy in multiple sclerosis: A longitudinal study using spectral domain optical coherence tomography with segmentation analysis. *Mult Scler Relat Disord* 21:56-62
19. Bennett MV, Garre JM, Orellana JA, Bukauskas FF, Nedergaard M, Saez JC (2012) Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res* 1487:3-15

20. Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 14:4368-4374
21. Beyer EC, Berthoud VM (2018a) Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860:5-8
22. Beyer EC, Berthoud VM (2018b) Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta* 1860:5-8
23. Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildreorde M, Skarratt KK, Fuller SJ, Sluyter R, Stokes L (2014) Probenecid blocks human P2X7 receptor-induced dye uptake via a pannexin-1 independent mechanism. *PLoS One* 9:e93058
24. Bond SR, Naus CC (2014) The pannexins: past and present. *Front Physiol* 5:58
25. Boyce AKJ, Swayne LA (2017) P2X7 receptor cross-talk regulates ATP-induced pannexin 1 internalization. *Biochem J* 474:2133-2144
26. Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC, Bagley MH, Larsen PD (1983) Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 40:406-408
27. Britze J, Pihl-Jensen G, Frederiksen JL (2017) Retinal ganglion cell analysis in multiple sclerosis and optic neuritis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol* 264:1837-1853
28. Brooks TA, Hawkins BT, Huber JD, Egleton RD, Davis TP (2005) Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H738-743
29. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13644-13649
30. Bunse S, Haghika A, Zoidl G, Dermietzel R (2005) Identification of a potential regulator of the gap junction protein pannexin1. *Cell Commun Adhes* 12:231-236
31. Campbell M, Cassidy PS, O'Callaghan J, Crosbie DE, Humphries P (2018) Manipulating ocular endothelial tight junctions: Applications in treatment of retinal disease pathology and ocular hypertension. *Prog Retin Eye Res* 62:120-133
32. Chapot CA, Euler T, Schubert T (2017) How do horizontal cells 'talk' to cone photoreceptors? Different levels of complexity at the cone-horizontal cell synapse. *J Physiol* 595:5495-5506
33. Clark RSB, Empey PE, Bayir H, Rosario BL, Poloyac SM, Kochanek PM, Nolin TD, Au AK, Horvat CM, Wisniewski SR, Bell MJ (2017) Phase I randomized clinical trial of N-acetylcysteine in combination with an adjuvant probenecid for treatment of severe traumatic brain injury in children. *PLoS One* 12:e0180280
34. Claudio L, Kress Y, Factor J, Brosnan CF (1990) Mechanisms of edema formation in experimental autoimmune encephalomyelitis. The contribution of inflammatory cells. *Am J Pathol* 137:1033-1045
35. Cohan SL, Moses H, Calkwood J, Tornatore C, LaGanke C, Smoot KE, Meka V, Okwuokenye M, Hotermans C, Mendoza JP, Mann MK, Meltzer LA (2018) Clinical outcomes in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis who switch from natalizumab to delayed-release dimethyl fumarate: A multicenter retrospective observational study (STRATEGY). *Mult Scler Relat Disord* 22:27-34
36. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517
37. Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato Salinaro A, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F (1998) Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10:1202-1208
38. Connors BW, Long MA (2004) Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 27:393-418
39. Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15735-15740

40. Cotter J, Muhlert N, Talwar A, Granger K (2018) Examining the effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and stimulant-based medications for cognitive dysfunction in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 86:99-107
41. Cross AH, Naismith RT (2014) Established and novel disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *J Intern Med* 275:350-363
42. Cubilla MA, Bermudez V, Marquioni Ramella MD, Bachor TP, Suburo AM (2013) Mifepristone, a blocker of glucocorticoid receptors, promotes photoreceptor death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:313-322
43. Cunningham RF, Israili ZH, Dayton PG (1981) Clinical pharmacokinetics of probenecid. *Clin Pharmacokinet* 6:135-151
44. Dackovic J, Pekmezovic T, Mesaros S, Dujmovic I, Stojsavljevic N, Martinovic V, Drulovic J (2016) The Rao's Brief Repeatable Battery in the study of cognition in different multiple sclerosis phenotypes: application of normative data in a Serbian population. *Neurol Sci* 37:1475-1481
45. Dahl G, Locovei S (2006) Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life* 58:409-419
46. Dahl G, Qiu F, Wang J (2013) The bizarre pharmacology of the ATP release channel pannexin1. *Neuropharmacology* 75:583-593
47. Dahl G, Muller KJ (2014) Innexin and pannexin channels and their signaling. *FEBS Lett* 588:1396-1402
48. Dahl G (2018) The Pannexin1 membrane channel: distinct conformations and functions. *FEBS Lett* 592:3201-3209
49. Daneman R, Prat A (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020412
50. Danesh-Meyer HV, Zhang J, Acosta ML, Rupenthal ID, Green CR (2016) Connexin43 in retinal injury and disease. *Prog Retin Eye Res* 51:41-68
51. Danikowski KM, Jayaraman S, Prabhakar BS (2017) Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J Neuroinflammation* 14:117
52. Davidson JO, Green CR, Bennet L, Gunn AJ (2015) Battle of the hemichannels--Connexins and Pannexins in ischemic brain injury. *Int J Dev Neurosci* 45:66-74
53. Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78:151-164
54. De Laere M, Berneman ZN, Cools N (2018) To the Brain and Back: Migratory Paths of Dendritic Cells in Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 77:178-192
55. De Maio A, Vega VL, Contreras JE (2002) Gap junctions, homeostasis, and injury. *J Cell Physiol* 191:269-282
56. de Souza CF, Nivison-Smith L, Christie DL, Polkinghorne P, McGhee C, Kalloniatis M, Acosta ML (2016) Macromolecular markers in normal human retina and applications to human retinal disease. *Exp Eye Res* 150:135-148
57. Decrock E, De Bock M, Wang N, Bultynck G, Giaume C, Naus CC, Green CR, Leybaert L (2015) Connexin and pannexin signaling pathways, an architectural blueprint for CNS physiology and pathology? *Cell Mol Life Sci* 72:2823-2851
58. Dembla M, Kesharwani A, Natarajan S, Fecher-Trost C, Fairless R, Williams SK, Flockerzi V, Diem R, Schwarz K, Schmitz F (2018) Early auto-immune targeting of photoreceptor ribbon synapses in mouse models of multiple sclerosis. *EMBO Mol Med* 10
59. Dhande OS, Stafford BK, Franke K, El-Danaf R, Percival KA, Phan AH, Li P, Hansen BJ, Nguyen PL, Berens P, Taylor WR, Callaway E, Euler T, Huberman AD (2018) Molecular fingerprinting of On-Off direction selective retinal ganglion cells across species and relevance to primate visual circuits. *J Neurosci*
60. Diaz N (2017) European and Americas Committees for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS/ACTRIMS) - 7th Joint Triennial Congress (October 25-28, 2017 - Paris, France). *Drugs Today (Barc)* 53:559-563

61. Dibas A, Millar C, Al-Farra A, Yorio T (2018) Neuroprotective Effects of Psalmotoxin-1, an Acid-Sensing Ion Channel (ASIC) Inhibitor, in Ischemia Reperfusion in Mouse Eyes. *Curr Eye Res* 43:921-933
62. Dreschers S, Gille C, Haas M, Seubert F, Platen C, Orlikowsky TW (2017) Reduced internalization of TNF- α /TNFR1 down-regulates caspase dependent phagocytosis induced cell death (PICD) in neonatal monocytes. *PLoS One* 12:e0182415
63. Duffy SS, Lees JG, Moalem-Taylor G (2014) The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Mult Scler Int* 2014:285245
64. Dvorientchikova G, Ivanov D, Panchin Y, Shestopalov VI (2006) Expression of pannexin family of proteins in the retina. *FEBS Lett* 580:2178-2182
65. Engler CB, Sander B, Larsen M, Koefoed P, Parving HH, Lund-Andersen H (1994) Probenecid inhibition of the outward transport of fluorescein across the human blood-retina barrier. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 72:663-667
66. Farias JG, Molina VM, Carrasco RA, Zepeda AB, Figueroa E, Letelier P, Castillo RL (2017) Antioxidant Therapeutic Strategies for Cardiovascular Conditions Associated with Oxidative Stress. *Nutrients* 9
67. Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, Carlen PL, MacFabe D, Perez Velazquez JL (2002) Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J Neurosci* 22:644-653
68. Gajardo-Gomez R, Labra VC, Orellana JA (2016) Connexins and Pannexins: New Insights into Microglial Functions and Dysfunctions. *Front Mol Neurosci* 9:86
69. Gajofatto A, Turatti M (2018) Investigational immunosuppressants in early-stage clinical trials for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 27:273-286
70. Garcia-Martin E, Ara JR, Martin J, Almarcegui C, Dolz I, Vilades E, Gil-Arribas L, Fernandez FJ, Polo V, Larrosa JM, Pablo LE, Satue M (2017) Retinal and Optic Nerve Degeneration in Patients with Multiple Sclerosis Followed up for 5 Years. *Ophthalmology* 124:688-696
71. Garcia-Ruiz AJ, Izquierdo-Ayuso G, Navarro-Mascarell G, Montesinos-Galvez AC, Martos-Crespo F, Jodar-Sanchez F, Correa M, Garcia-Agua Soler N (2017) Efficacy of the Treatments Used in Multiple Sclerosis: From Meta-analysis to Number Needed to Treat. *Clin Neuropharmacol* 40:37-42
72. Gerrard B, Singh V, Babenko O, Gauthier I, Wee Yong V, Kovalchuk I, Luczak A, Metz GAS (2017) Chronic mild stress exacerbates severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in association with altered non-coding RNA and metabolic biomarkers. *Neuroscience* 359:299-307
73. Goodin DS (2014) Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 122:455-464
74. Gramlich OW, Joachim SC, Gottschling PF, Laspas P, Cuny CS, Pfeiffer N, Grus FH (2011) Ophthalmopathology in rats with MBP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249:1009-1020
75. Grossniklaus HE, Geisert EE, Nickerson JM (2015) Introduction to the Retina. *Prog Mol Biol Transl Sci* 134:383-396
76. Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota SA, Gui X, Roberts JA, MacDonald JA, Muruve DA, McKay DM, Beck PL, Mawe GM, Thompson RJ, Sharkey KA (2012) Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat Med* 18:600-604
77. Guldenagel M, Sohl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K (2000) Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *J Comp Neurol* 425:193-201
78. Guo CX, Mat Nor MN, Danesh-Meyer HV, Vessey KA, Fletcher EL, O'Carroll SJ, Acosta ML, Green CR (2016) Connexin43 Mimetic Peptide Improves Retinal Function and Reduces Inflammation in a Light-Damaged Albino Rat Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:3961-3973

79. Hainz N, Wolf S, Tschernig T, Meier C (2016) Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation* 39:123-128
80. Hainz N, Becker P, Rapp D, Wagenpfeil S, Wonnenberg B, Beisswenger C, Tschernig T, Meier C (2017a) Probenecid-treatment reduces demyelination induced by cuprizone feeding. *J Chem Neuroanat* 85:21-26
81. Hainz N, Wolf S, Beck A, Wagenpfeil S, Tschernig T, Meier C (2017b) Probenecid arrests the progression of pronounced clinical symptoms in a mouse model of multiple sclerosis. *Sci Rep* 7:17214
82. Hammer A, Schliep A, Jorg S, Haghikia A, Gold R, Kleinewietfeld M, Muller DN, Linker RA (2017) Impact of combined sodium chloride and saturated long-chain fatty acid challenge on the differentiation of T helper cells in neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 14:184
83. Hanson JVM, Hediger M, Manogaran P, Landau K, Hagenbuch N, Schippling S, Gerth-Kahlert C (2018) Outer Retinal Dysfunction in the Absence of Structural Abnormalities in Multiple Sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:549-560
84. Harpaz I, Abutbul S, Nemirovsky A, Gal R, Cohen H, Monsonego A (2013) Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL/6 mice: glucocorticoids as a double-edged sword. *Eur J Immunol* 43:758-769
85. Hasselmann JPC, Karim H, Khalaj AJ, Ghosh S, Tiwari-Woodruff SK (2017) Consistent induction of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice for the longitudinal study of pathology and repair. *J Neurosci Methods* 284:71-84
86. Havla J, Kumpfel T, Schinner R, Spadaro M, Schuh E, Meinl E, Hohlfeld R, Outteryck O (2017) Myelin-oligodendrocyte-glycoprotein (MOG) autoantibodies as potential markers of severe optic neuritis and subclinical retinal axonal degeneration. *J Neurol* 264:139-151
87. Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57:173-185
88. Heldner MR, Kaufmann-Ezra S, Gutbrod K, Bernasconi C, Bigi S, Blatter V, Mattle HP, Muri RM, Verma RK, Kamm CP (2017) Behavioral Changes in Patients with Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 8:437
89. Heneka MT, Sharp A, Murphy P, Lyons JA, Dumitrescu L, Feinstein DL (2001) The heat shock response reduces myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Neurochem* 77:568-579
90. Herold S, Kumar P, Wichert SP, Kretzschmar B, Bahr M, Rossner MJ, Hein K (2015) Neurodegeneration in Autoimmune Optic Neuritis Is Associated with Altered APP Cleavage in Neurons and Up-Regulation of p53. *PLoS One* 10:e0138852
91. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong RO (2014) Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res* 42:44-84
92. Horstmann L, Schmid H, Heinen AP, Kurschus FC, Dick HB, Joachim SC (2013) Inflammatory demyelination induces glia alterations and ganglion cell loss in the retina of an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Neuroinflammation* 10:120
93. Horstmann L, Kuehn S, Pedreiturria X, Haak K, Pfarrer C, Dick HB, Kleiter I, Joachim SC (2016) Microglia response in retina and optic nerve in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 298:32-41
94. Huang Z, Zhou T, Sun X, Zheng Y, Cheng B, Li M, Liu X, He C (2018) Necroptosis in microglia contributes to neuroinflammation and retinal degeneration through TLR4 activation. *Cell Death Differ* 25:180-189
95. Ichinose T, Fyk-Kolodziej B, Cohn J (2014) Roles of ON cone bipolar cell subtypes in temporal coding in the mouse retina. *J Neurosci* 34:8761-8771
96. Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C752-760

97. Ineichen BV, Schnell L, Gullo M, Kaiser J, Schneider MP, Mosberger AC, Good N, Linnebank M, Schwab ME (2017) Direct, long-term intrathecal application of therapeutics to the rodent CNS. *Nat Protoc* 12:104-131
98. Ishii M, Rohrer B (2017) Bystander effects elicited by single-cell photo-oxidative blue-light stimulation in retinal pigment epithelium cell networks. *Cell Death Discov* 3:16071
99. Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39:73-82
100. Jian Z, Ding S, Deng H, Wang J, Yi W, Wang L, Zhu S, Gu L, Xiong X (2016) Probenecid protects against oxygen-glucose deprivation injury in primary astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain Res* 1643:123-129
101. Kaminska J, Koper OM, Piechal K, Kemona H (2017) Multiple sclerosis - etiology and diagnostic potential. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 71:551-563
102. Kar R, Batra N, Riquelme MA, Jiang JX (2012) Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys* 524:2-15
103. Kassubek R, Gorges M, Schocke M, Hagenston VAM, Huss A, Ludolph AC, Kassubek J, Tumani H (2017) GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. *Neurosci Lett* 657:166-170
104. Keeley PW, Reese BE (2010) Role of afferents in the differentiation of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci* 30:1677-1685
105. Kermer P, Klocker N, Bahr M (1999) Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. *Cell Tissue Res* 298:383-395
106. Khan RS, Dine K, Luna E, Ahlem C, Shindler KS (2014) HE3286 reduces axonal loss and preserves retinal ganglion cell function in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:5744-5751
107. Kieseier BC, Gold R, Hartung HP (2003) [Mitoxanthrone in the therapy of multiple sclerosis]. *Nervenarzt* 74:906-910
108. Kihara AH, Santos TO, Paschon V, Matos RJ, Britto LR (2008) Lack of photoreceptor signaling alters the expression of specific synaptic proteins in the retina. *Neuroscience* 151:995-1005
109. Kim SM, Woodhall MR, Kim JS, Kim SJ, Park KS, Vincent A, Lee KW, Waters P (2015) Antibodies to MOG in adults with inflammatory demyelinating disease of the CNS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2:e163
110. Kim Y, Davidson JO, Green CR, Nicholson LFB, O'Carroll SJ, Zhang J (2018) Connexins and Pannexins in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1860:224-236
111. Kobayashi T, Masumoto J, Tada T, Nomiyama T, Hongo K, Nakayama J (2007) Prognostic significance of the immunohistochemical staining of cleaved caspase-3, an activated form of caspase-3, in gliomas. *Clin Cancer Res* 13:3868-3874
112. Koch-Henriksen N, Sorensen PS (2010) The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9:520-532
113. Koda T, Namba A, Nakatsuji Y, Niino M, Miyazaki Y, Sugimoto T, Kinoshita M, Takata K, Yamashita K, Shimizu M, Fukazawa T, Kumanogoh A, Mochizuki H, Okuno T (2018) Beneficial effects of fingolimod in MS patients with high serum Sema4A levels. *PLoS One* 13:e0193986
114. Kovacs-Oller T, Debertin G, Balogh M, Ganczer A, Orban J, Nyitrai M, Balogh L, Kantor O, Volgyi B (2017) Connexin36 Expression in the Mammalian Retina: A Multiple-Species Comparison. *Front Cell Neurosci* 11:65
115. Kranz K, Paquet-Durand F, Weiler R, Janssen-Bienhold U, Dedek K (2013) Testing for a gap junction-mediated bystander effect in retinitis pigmentosa: secondary cone death is not altered by deletion of connexin36 from cones. *PLoS One* 8:e57163
116. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E (2012) B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol* 8:613-623
117. Kubo Y, Akanuma SI, Hosoya KI (2017) Influx Transport of Cationic Drug at the Blood-Retinal Barrier: Impact on the Retinal Delivery of Neuroprotectants. *Biol Pharm Bull* 40:1139-1145

118. Kuo SP, Schwartz GW, Rieke F (2016) Nonlinear Spatiotemporal Integration by Electrical and Chemical Synapses in the Retina. *Neuron* 90:320-332
119. Kurtenbach S, Kurtenbach S, Zoidl G (2014) Emerging functions of pannexin 1 in the eye. *Front Cell Neurosci* 8:263
120. Lai YK (1990) Treatment of macular hole retinal detachment. *Br J Ophthalmol* 74:201-202
121. Langer-Gould A, Wu J, Lucas R, Smith J, Gonzales E, Amezcua L, Haraszti S, Chen LH, Quach H, James JA, Barcellos LF, Xiang AH (2017) Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: A multiethnic study. *Neurology* 89:1330-1337
122. Larabee CM, Hu Y, Desai S, Georgescu C, Wren JD, Axtell RC, Plafker SM (2016) Myelin-specific Th17 cells induce severe relapsing optic neuritis with irreversible loss of retinal ganglion cells in C57BL/6 mice. *Mol Vis* 22:332-341
123. Latina V, Caioli S, Zona C, Ciotti MT, Amadoro G, Calissano P (2017) Impaired NGF/TrkA Signaling Causes Early AD-Linked Presynaptic Dysfunction in Cholinergic Primary Neurons. *Front Cell Neurosci* 11:68
124. Laurence M, Benito-Leon J (2017) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: Updating Pender's hypothesis. *Mult Scler Relat Disord* 16:8-14
125. Li B, Wang X, Choi IY, Wang YC, Liu S, Pham AT, Moon H, Smith DJ, Rao DS, Boldin MP, Yang L (2017a) miR-146a modulates autoreactive Th17 cell differentiation and regulates organ-specific autoimmunity. *J Clin Invest* 127:3702-3716
126. Li DY, Wu JL, Luo LL, Qiao LN, Liu ZQ, Lu GY, Wang Y (2017b) [Role of c-Jun N-terminal kinase-mediated FOXO3a nuclear translocation in neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 19:458-462
127. Li S, Bjelobaba I, Stojilkovic SS (2018) Interactions of Pannexin1 channels with purinergic and NMDA receptor channels. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860:166-173
128. Lin B, Ginsberg MD, Busto R (1998) Hyperglycemic exacerbation of neuronal damage following forebrain ischemia: microglial, astrocytic and endothelial alterations. *Acta Neuropathol* 96:610-620
129. Lin TH, Chiang CW, Perez-Torres CJ, Sun P, Wallendorf M, Schmidt RE, Cross AH, Song SK (2017) Diffusion MRI quantifies early axonal loss in the presence of nerve swelling. *J Neuroinflammation* 14:78
130. Locovei S, Bao L, Dahl G (2006) Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7655-7659
131. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717
132. Lutz SE, Gonzalez-Fernandez E, Ventura JC, Perez-Samartin A, Tarassishin L, Negro H, Patel NK, Suadicani SO, Lee SC, Matute C, Scemes E (2013) Contribution of pannexin1 to experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 8:e66657
133. Magupalli VG, Schwarz K, Alpadi K, Natarajan S, Seigel GM, Schmitz F (2008) Multiple RIBEYE-RIBEYE interactions create a dynamic scaffold for the formation of synaptic ribbons. *J Neurosci* 28:7954-7967
134. Maier K, Rau CR, Storch MK, Sattler MB, Demmer I, Weissert R, Taheri N, Kuhnert AV, Bahr M, Diem R (2004) Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from secondary cell death during acute autoimmune optic neuritis in rats. *Brain Pathol* 14:378-387
135. Makarenkova HP, Shestopalov VI (2014) The role of pannexin hemichannels in inflammation and regeneration. *Front Physiol* 5:63
136. Manogaran P, Walker-Egger C, Samardzija M, Waschkes C, Grimm C, Rudin M, Schippling S (2018) Exploring experimental autoimmune optic neuritis using multimodal imaging. *Neuroimage* 175:327-339

137. Manohar M, Hirsh MI, Chen Y, Woehle T, Karande AA, Junger WG (2012) ATP release and autocrine signaling through P2X4 receptors regulate gammadelta T cell activation. *J Leukoc Biol* 92:787-794
138. Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4:877-886
139. Matthews G, Fuchs P (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11:812-822
140. McFarlin DE, Hsu SC, Slemenda SB, Chou FC, Kibler RF (1975) The immune response against myelin basic protein in two strains of rat with different genetic capacity to develop experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 141:72-81
141. Melanson M, Miao P, Eisenstat D, Gong Y, Gu X, Au K, Zhu W, Begum F, Frost EE, Namaka M (2009) Experimental autoimmune encephalomyelitis-induced upregulation of tumor necrosis factor-alpha in the dorsal root ganglia. *Mult Scler* 15:1135-1145
142. Meunier C, Wang N, Yi C, Dallerac G, Ezan P, Koulakoff A, Leybaert L, Giaume C (2017) Contribution of Astroglial Cx43 Hemichannels to the Modulation of Glutamatergic Currents by D-Serine in the Mouse Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 37:9064-9075
143. Mihara H, Suzuki N, Yamawaki H, Tominaga M, Sugiyama T (2013) TRPV2 ion channels expressed in inhibitory motor neurons of gastric myenteric plexus contribute to gastric adaptive relaxation and gastric emptying in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304:G235-240
144. Mills SL, O'Brien JJ, Li W, O'Brien J, Massey SC (2001) Rod pathways in the mammalian retina use connexin 36. *J Comp Neurol* 436:336-350
145. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, Clanet M, Comi G, Derfuss T, Fazekas F, Hartung HP, Havrdova E, Hemmer B, Kappos L, Liblau R, Lubetzki C, Marcus E, Miller DH, Olsson T, Pilling S, Selmaj K, Siva A, Sorensen PS, Sormani MP, Thalheim C, Wiendl H, Zipp F (2018)ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 25:215-237
146. Mounier R, Theret M, Arnold L, Cuvelier S, Bultot L, Goransson O, Sanz N, Ferry A, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B, Chazaud B (2013) AMPKalpha1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell Metab* 18:251-264
147. Nadeau-Vallee M, Obari D, Beaudry-Richard A, Sierra EM, Beulac A, Maurice N, Olson DM, Chemtob S (2017) Preterm Birth and Neonatal Injuries: Importance of Interleukin-1 and Potential of Interleukin-1 Receptor Antagonists. *Curr Pharm Des* 23:6132-6141
148. Nau R, Sorgel F, Eiffert H (2010) Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 23:858-883
149. Negroni A, Colantoni E, Pierdomenico M, Palone F, Costanzo M, Oliva S, Tiberti A, Cucchiara S, Stronati L (2017) RIP3 AND pMLKL promote necroptosis-induced inflammation and alter membrane permeability in intestinal epithelial cells. *Dig Liver Dis* 49:1201-1210
150. Niwa M, Aoki H, Hirata A, Tomita H, Green PG, Hara A (2016) Retinal Cell Degeneration in Animal Models. *Int J Mol Sci* 17
151. Obara EA, Hannibal J, Heegaard S, Fahrenkrug J (2016) Loss of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells in Severely Staged Glaucoma Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:4661-4667
152. Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA (2006) The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* 126:659-662
153. Okumura A, Mochizuki M (1988) Endotoxin-induced uveitis in rats: morphological and biochemical study. *Jpn J Ophthalmol* 32:457-465
154. Orellana JA, Saez PJ, Shoji KF, Schalper KA, Palacios-Prado N, Velarde V, Giaume C, Bennett MV, Saez JC (2009) Modulation of brain hemichannels and gap junction

- channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 11:369-399
155. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:552-565
 156. Oshima A (2014) Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Lett* 588:1230-1237
 157. Ou Y, Jo RE, Ullian EM, Wong RO, Della Santina L (2016) Selective Vulnerability of Specific Retinal Ganglion Cell Types and Synapses after Transient Ocular Hypertension. *J Neurosci* 36:9240-9252
 158. Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S (2000) A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10:R473-474
 159. Patti F, Vila C (2014) Symptoms, prevalence and impact of multiple sclerosis in younger patients: a multinational survey. *Neuroepidemiology* 42:211-218
 160. Peichl L, Gonzalez-Soriano J (1994) Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci* 11:501-517
 161. Pelegrin P (2008) Targeting interleukin-1 signaling in chronic inflammation: focus on P2X(7) receptor and Pannexin-1. *Drug News Perspect* 21:424-433
 162. Penuela S, Harland L, Simek J, Laird DW (2014a) Pannexin channels and their links to human disease. *Biochem J* 461:371-381
 163. Penuela S, Simek J, Thompson RJ (2014b) Regulation of pannexin channels by post-translational modifications. *FEBS Lett* 588:1411-1415
 164. Perry VH, Lund RD (1990) Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol* 19:265-272
 165. Pogorzelski R, Baniukiewicz E, Drozdowski W (2004) [Subclinical lesions of peripheral nervous system in multiple sclerosis patients]. *Neurol Neurochir Pol* 38:257-264
 166. Pol S, Schweser F, Bertolino N, Preda M, Sveinsson M, Sudyn M, Babek N, Zivadinov R (2019) Characterization of leptomeningeal inflammation in rodent experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 314:82-90
 167. 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. *Neurosci Biobehav Rev* 47:485-505
 168. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L, Milanov I (2006) The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13:700-722
 169. Puthenparampil M, Federle L, Poggiali D, Miante S, Signori A, Pilotto E, Rinaldi F, Perini P, Sormani MP, Midena E, Gallo P (2017) Trans-synaptic degeneration in the optic pathway. A study in clinically isolated syndrome and early relapsing-remitting multiple sclerosis with or without optic neuritis. *PLoS One* 12:e0183957
 170. Pyka-Fosciak G, Stasiolek M, Litwin JA (2018) Immunohistochemical analysis of spinal cord components in mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Folia Histochem Cytobiol* 56:151-158
 171. Qi Y, Hainz N, Tschernig T, Meier C, Volmer DA (2015) Differential distribution of probenecid as detected by on-tissue mass spectrometry. *Cell Tissue Res* 360:427-429
 172. Qiu F, Dahl G (2009) A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C250-255
 173. Qiu F, Wang J, Dahl G (2012) Alanine substitution scanning of pannexin1 reveals amino acid residues mediating ATP sensitivity. *Purinergic Signal* 8:81-90
 174. Reale M, Sanchez-Ramon S (2017) Lipids at the Cross-road of Autoimmunity in Multiple Sclerosis. *Curr Med Chem* 24:176-192
 175. Reese JP, Wienemann G, John A, Linnemann A, Balzer-Geldsetzer M, Mueller UO, Eienbroker C, Tackenberg B, Dodel R (2013) Preference-based Health status in a German outpatient cohort with multiple sclerosis. *Health Qual Life Outcomes* 11:162

176. Ripps H (2002) Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Exp Eye Res* 74:327-336
177. Robbins N, Koch SE, Tranter M, Rubinstein J (2012) The history and future of probenecid. *Cardiovasc Toxicol* 12:1-9
178. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD (2014) The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* 122:173-189
179. Rodriguez AR, de Sevilla Muller LP, Brecha NC (2014) The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 522:1411-1443
180. Rosiak K, Zagozdzon P (2017) Quality of life and social support in patients with multiple sclerosis. *Psychiatr Pol* 51:923-935
181. Roy K, Kumar S, Bloomfield SA (2017) Gap junctional coupling between retinal amacrine and ganglion cells underlies coherent activity integral to global object perception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E10484-E10493
182. Roy S, Drake A, Fuchs T, Dwyer MG, Zivadinov R, Chapman BP, Weinstock-Guttman B, Benedict RH (2018) Longitudinal personality change associated with cognitive decline in multiple sclerosis. *Mult Scler*:1352458517753720
183. Ruet A, Brochet B (2018) Cognitive assessment in patients with multiple sclerosis: From neuropsychological batteries to ecological tools. *Ann Phys Rehabil Med*
184. Ruther BJ, Scheld M, Drey Mueller D, Clarner T, Kress E, Brandenburg LO, Swartenbroekx T, Hoornaert C, Ponsaerts P, Fallier-Becker P, Beyer C, Rohr SO, Schmitz C, Chrzanowski U, Hochstrasser T, Nyamoya S, Kipp M (2017) Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia* 65:1900-1913
185. Sachs HH, Bercury KK, Popescu DC, Narayanan SP, Macklin WB (2014) A new model of cuprizone-mediated demyelination/remyelination. *ASN Neuro* 6
186. Santos TC, Wierda K, Broeke JH, Toonen RF, Verhage M (2017) Early Golgi Abnormalities and Neurodegeneration upon Loss of Presynaptic Proteins Munc18-1, Syntaxin-1, or SNAP-25. *J Neurosci* 37:4525-4539
187. Sartoretti T, Sartoretti E, Rauch S, Binkert C, Wyss M, Czell D, Sartoretti-Schefer S (2017) How Common Is Signal-Intensity Increase in Optic Nerve Segments on 3D Double Inversion Recovery Sequences in Visually Asymptomatic Patients with Multiple Sclerosis? *AJNR Am J Neuroradiol* 38:1748-1753
188. Schmedt N, Khil L, Berger K, Riedel O (2017) Incidence of Multiple Sclerosis in Germany: A Cohort Study Applying Different Case Definitions Based on Claims Data. *Neuroepidemiology* 49:91-98
189. Schmitz F, Konigstorfer A, Sudhof TC (2000) RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28:857-872
190. Schwarz HJ, Chang YS, Hennemann H, Dahl E, Lalley PA, Willecke K (1992) Chromosomal assignments of mouse connexin genes, coding for gap junctional proteins, by somatic cell hybridization. *Somat Cell Mol Genet* 18:351-359
191. Schwarz K, Schmitz F (2017) RIBEYE(B)-domain binds to lipid components of synaptic vesicles in an NAD(H)-dependent, redox-sensitive manner. *Biochem J* 474:1205-1220
192. Sehle A, Mundermann A, Starrost K, Sailer S, Becher I, Dettmers C, Vieten M (2011) Objective assessment of motor fatigue in Multiple Sclerosis using kinematic gait analysis: a pilot study. *J Neuroeng Rehabil* 8:59
193. Shestopalov VI, Slepak VZ (2014) Molecular pathways of pannexin1-mediated neurotoxicity. *Front Physiol* 5:23
194. Shirani A, Stuve O (2018) Natalizumab: Perspectives from the Bench to Bedside. *Cold Spring Harb Perspect Med*

195. Shoji KF, Saez PJ, Harcha PA, Aguila HL, Saez JC (2014) Pannexin1 channels act downstream of P2X 7 receptors in ATP-induced murine T-cell death. *Channels (Austin)* 8:142-156
196. Silverman W, Locovei S, Dahl G (2008) Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C761-767
197. Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, Keane RW, Dahl G (2009) The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 284:18143-18151
198. Simo R, Villarroel M, Corraliza L, Hernandez C, Garcia-Ramirez M (2010) The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2010:190724
199. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35
200. Sohl G, Degen J, Teubner B, Willecke K (1998) The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett* 428:27-31
201. Sohl G, Guldenagel M, Traub O, Willecke K (2000) Connexin expression in the retina. *Brain Res Brain Res Rev* 32:138-145
202. Sohl G, Maxeiner S, Willecke K (2005) Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6:191-200
203. Sohl G, Jousen A, Kociok N, Willecke K (2010) Expression of connexin genes in the human retina. *BMC Ophthalmol* 10:27
204. Song S, Jacobson KN, McDermott KM, Reddy SP, Cress AE, Tang H, Dudek SM, Black SM, Garcia JG, Makino A, Yuan JX (2016) ATP promotes cell survival via regulation of cytosolic [Ca²⁺] and Bcl-2/Bax ratio in lung cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 310:C99-114
205. Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao HB, Dahl G (2011) Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)* 5:193-197
206. Spencer JI, Bell JS, DeLuca GC (2018) Vascular pathology in multiple sclerosis: reframing pathogenesis around the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89:42-52
207. Sterling P, Matthews G (2005) Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci* 28:20-29
208. Stiebel-Kalish H, Lotan I, Brody J, Chodick G, Bialer O, Marignier R, Bach M, Hellmann MA (2017) Retinal Nerve Fiber Layer May Be Better Preserved in MOG-IgG versus AQP4-IgG Optic Neuritis: A Cohort Study. *PLoS One* 12:e0170847
209. Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277:10482-10488
210. Striedinger K, Petrasch-Parwez E, Zoidl G, Napirei M, Meier C, Eysel UT, Dermietzel R (2005) Loss of connexin36 increases retinal cell vulnerability to secondary cell loss. *Eur J Neurosci* 22:605-616
211. Sunkara G, Ayalasmayajula SP, DeRuiter J, Kompella UB (2010) Probenecid treatment enhances retinal and brain delivery of N-4-benzoylaminophenylsulfonylglycine: an anionic aldose reductase inhibitor. *Brain Res Bull* 81:327-332
212. Syc SB, Saidha S, Newsome SD, Ratchford JN, Levy M, Ford E, Crainiceanu CM, Durbin MK, Oakley JD, Meyer SA, Frohman EM, Calabresi PA (2012) Optical coherence tomography segmentation reveals ganglion cell layer pathology after optic neuritis. *Brain* 135:521-533
213. Thompson RJ (2015) Pannexin channels and ischaemia. *J Physiol* 593:3463-3470
214. Thornton C, Leaw B, Mallard C, Nair S, Jinnai M, Hagberg H (2017) Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Front Cell Neurosci* 11:248

215. Tian DC, Su L, Fan M, Yang J, Zhang R, Wen P, Han Y, Yu C, Zhang C, Ren H, Shi K, Zhu Z, Dong Y, Liu Y, Shi FD (2017) Bidirectional degeneration in the visual pathway in neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD). *Mult Scler*:1352458517727604
216. tom Dieck S, Brandstatter JH (2006) Ribbon synapses of the retina. *Cell Tissue Res* 326:339-346
217. Tonkin RS, Mao Y, O'Carroll SJ, Nicholson LF, Green CR, Gorrie CA, Moalem-Taylor G (2014) Gap junction proteins and their role in spinal cord injury. *Front Mol Neurosci* 7:102
218. Torre-Fuentes L, Moreno-Jimenez L, Pytel V, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U, Matias-Guiu J (2017) Experimental models of demyelination and remyelination. *Neurologia*
219. Trojano M, Amato MP (2018) Multiple sclerosis in 2017: Progress in multiple sclerosis - from diagnosis to therapy. *Nat Rev Neurol* 14:72-74
220. Valdebenito S, Barreto A, Eugenin EA (2018) The role of connexin and pannexin containing channels in the innate and acquired immune response. *Biochim Biophys Acta* 1860:154-165
221. Veenstra RD (1996) Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J Bioenerg Biomembr* 28:327-337
222. Velasquez S, Eugenin EA (2014) Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Front Physiol* 5:96
223. von Gersdorff H, Sakaba T, Berglund K, Tachibana M (1998) Submillisecond kinetics of glutamate release from a sensory synapse. *Neuron* 21:1177-1188
224. Wagner M (1975) [Purification of Meerrettich-peroxidase by means of affinity chromatography on concanavalin A-agarose]. *Acta Biol Med Ger* 34:1429-1431
225. Wahl S, Magupalli VG, Dembla M, Katiyar R, Schwarz K, Koblitz L, Alpadi K, Krause E, Rettig J, Sung CH, Goldberg AF, Schmitz F (2016) The Disease Protein Tulp1 Is Essential for Periaxonal Zone Endocytosis in Photoreceptor Ribbon Synapses. *J Neurosci* 36:2473-2493
226. Wang DP, Gu LL, Xue Q, Chen H, Mao GX (2018) CtBP2 promotes proliferation and reduces drug sensitivity of non-small cell lung cancer via the Wnt/beta-catenin pathway. *Neoplasma*
227. Wang N, De Bock M, Decrock E, Bol M, Gadicherla A, Vinken M, Rogiers V, Bukauskas FF, Bultynck G, Leybaert L (2013) Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochim Biophys Acta* 1828:35-50
228. Wang YC, Lauwers E, Verstreken P (2017) Presynaptic protein homeostasis and neuronal function. *Curr Opin Genet Dev* 44:38-46
229. Watad A, Azrielant S, Bragazzi NL, Sharif K, David P, Katz I, Aljadeff G, Quaresma M, Tanay G, Adawi M, Amital H, Shoenfeld Y (2017) Seasonality and autoimmune diseases: The contribution of the four seasons to the mosaic of autoimmunity. *J Autoimmun* 82:13-30
230. Wekerle H (2017) B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 50:57-60
231. Willebrords J, Maes M, Crespo Yanguas S, Vinken M (2017) Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol Ther* 180:144-160
232. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383:725-737
233. Wong WW, Vince JE, Lalaoui N, Lawlor KE, Chau D, Bankovacki A, Anderton H, Metcalf D, O'Reilly L, Jost PJ, Murphy JM, Alexander WS, Strasser A, Vaux DL, Silke J (2014) cIAPs and XIAP regulate myelopoiesis through cytokine production in an RIPK1- and RIPK3-dependent manner. *Blood* 123:2562-2572
234. Xia J, Lim JC, Lu W, Beckel JM, Macarak EJ, Laties AM, Mitchell CH (2012) Neurons respond directly to mechanical deformation with pannexin-mediated ATP release and autostimulation of P2X7 receptors. *J Physiol* 590:2285-2304

235. Xie R, Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M (2000) Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat: involvement of probenecid-sensitive transport. *Br J Pharmacol* 131:1784-1792
236. Yang S, Cheek DJ, Westfall DP, Buxton IL (1994) Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. *Circ Res* 74:401-407
237. Yates RL, Esiri MM, Palace J, Jacobs B, Perera R, DeLuca GC (2017) Fibrin(ogen) and neurodegeneration in the progressive multiple sclerosis cortex. *Ann Neurol* 82:259-270
238. Yi C, Ezan P, Fernandez P, Schmitt J, Saez JC, Giaume C, Koulakoff A (2017) Inhibition of glial hemichannels by boldine treatment reduces neuronal suffering in a murine model of Alzheimer's disease. *Glia* 65:1607-1625
239. Yong CS, Abba Moussa D, Cretenet G, Kinet S, Dardalhon V, Taylor N (2017) Metabolic orchestration of T lineage differentiation and function. *FEBS Lett* 591:3104-3118
240. Yoshikawa K, Palumbo S, Toscano CD, Bosetti F (2011) Inhibition of 5-lipoxygenase activity in mice during cuprizone-induced demyelination attenuates neuroinflammation, motor dysfunction and axonal damage. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85:43-52
241. You X, Yan L, Li X, Pang Y, Guo X, Ye J, Hu H (2018) Disruption of blood-brain barrier integrity associated with brain lesions in Chinese neuromyelitis optica spectrum disorder patients. *Mult Scler Relat Disord* 27:254-259
242. Zhao B, Chen Y, Liu J, Zhang L, Wang J, Yang Y, Lv Q, Xie M (2018) Blood-brain barrier disruption induced by diagnostic ultrasound combined with microbubbles in mice. *Oncotarget* 9:4897-4914
243. Zhen W, Liu A, Lu J, Zhang W, Tattersall D, Wang J (2017) An Alternative Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination Mouse Model. *ASN Neuro* 9:1759091417725174
244. Zorzella-Pezavento SF, Chiuso-Minicucci F, Franca TG, Ishikawa LL, da Rosa LC, Marques C, Ikoma MR, Sartori A (2013) Persistent inflammation in the CNS during chronic EAE despite local absence of IL-17 production. *Mediators Inflamm* 2013:519627

Internetquelle:

BUNDESVERSICHERUNGSAMT (BVA) Sondergutachten zu den Wirkungen des morbiditätsorientierten Risikostrukturausgleichs (BVA) (27.11.2017)

https://www.bundesversicherungsamt.de/fileadmin/redaktion/Risikostrukturausgleich/Sondergutachten_Wirkung_RSA_2017.pdf (Eingesehen am 28.10.2018)

9 Danksagung und Publikationen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei meiner Dissertation begleitet und tatkräftig unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Carola Meier für ihre umfassende fachliche Betreuung, ihre vielfältigen Anregungen und Korrekturen, sowie ihre Begleitung durch das ganze Projekt herzlich bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jens Rettig für die Zweitbegutachtung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit als Dekan der medizinischen Fakultät. Ich danke besonders Frau Caroline Bickelmann für ihre fachliche Unterstützung bei der immunhistochemischen Färbung als Mitarbeiterin des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie.

Herrn Prof. Dr. med. Frank Schmitz danke ich recht herzlich für die freundliche Zurverfügungstellung des Antikörpers Mouse Anti Ribeye.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig möchte ich mich für die fachlichen Anregungen zu meiner Arbeit und die Unterstützung bedanken.

Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich auch an Frau Dr. Nadine Hainz und Frau Dr. Anja Beckmann richten. Sie standen mir während der gesamten Dissertation stets hilfsbereit und mit konstruktiver Kritik zur Seite und halfen mir an vielen Stellen aus. Auch danke ich ganz herzlich Herrn Alexander Grißmer und Frau Alina Mattheis für ihre große Unterstützung bei der Laborarbeit und der technischen Bewerkstelligung meiner Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Sandra Wolf für ihre freundliche Einführung in die Laborarbeit und umfassende Unterstützung am Anfang der Dissertation.

Bei Herrn Dr. med. Philipp Becker möchte ich mich für die Hilfestellung bei der statistischen Ausarbeitung ganz herzlich bedanken.

Frau Franziska Müller danke ich herzlich für ihre Unterstützung bei der Bildbearbeitung und bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Frau Ingrid Lang danke ich ganz herzlich für die Einführung und Unterstützung beim Anfertigen von Paraffinschnitten.

Bei Frau Andrea Rabung und meinen Mitdoktoranden in der AG von Frau Prof. Dr. Meier möchte ich mich für die Unterstützung und ganz besonders für die schöne Arbeitsatmosphäre bei der Ausarbeitung der Arbeit bedanken. Dank euch habe ich mich in der AG immer wohl gefühlt und mit Freude an der Dissertation gearbeitet. Ich möchte ganz herzlich allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG von Frau Prof. Dr. Meier und Herrn Prof. Dr. Tschernig für ihre Unterstützung danken.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Freundin Frau cand. med. Luca Schweitzer für ihre große Unterstützung bei technischen und besonders computertechnischen Fragestellungen

und die freundliche Begleitung bei vielen meiner Versuche. Vielen Dank für deine große Hilfe!

Allen meinen engen Freunden möchte ich für die mentale Unterstützung und Begleitung danken. Besonders danke ich hier meiner engen Vertrauten, Frau Johanna Wawrzik, für die Unterstützung bei Übersetzungen und der sprachlichen Korrektur.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner ganzen Familie, besonders meiner Mutter für die mentale Unterstützung und Hilfestellung bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation. Vielen Dank für eure große Hilfe und euer Verständnis!

Ein ganz großer Dank gilt schließlich meinem Verlobten Herrn Cristian Gonzalo Crespe.

Dir möchte ich von Herzen für die Begleitung während des gesamten Arbeitsprozesses und allen Etappen der Dissertation, die große mentale Unterstützung und vor allem die vielen Freiräume danken, die du mir für die Arbeit gegeben hast. Ohne deine Geduld und deine Unterstützung wäre ich nicht so weit gekommen.

Publikationen:

Gaida, Hainz, Meier: „Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induces apoptosis of retinal neurons: Modulation of electrical and chemical synapses as a result of neuronal degeneration?“

Manuskript in Vorbereitung.