

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

**Analyse der Pathologie des Nervus opticus in der Frühphase der
Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis:
Hat Probenecid einen Einfluss auf die Oligodendrozyten?**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2024**

Vorgelegt von: Ann-Kathrin Krutzinna
geb. am: 14.04.1996 in Stuttgart

Tag der Promotion: 18.09.2024
Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Referent: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier
Koreferent: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Frank Kirchhoff

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den 27.02.2024

Ann-Kathrin Krutzinna

Beiträge:

Das Projekt wurde gemeinsam mit Frau Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier und Frau Dr. rer. nat. Nadine Hainz entwickelt. Beide halfen bei der Ausarbeitung, Analyse und Interpretation der Daten.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter der Leitung von Frau Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier von Frau Dr. rer. nat. Nadine Hainz mit Unterstützung von Frau Dr. rer. nat. Sandra Wolf durchgeführt.

Die Anfertigung der Ultradünnschnitte und die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden durch Frau Belinda König sowie Herrn Alexander Grißmer unterstützt. Die Eponieinbettung der Nervi optici erfolgte durch Herrn Alexander Grißmer.

Die Anfertigung der histologischen Färbungen wurde durch Frau Franziska Müller und Frau Andrea Rabung unterstützt. Des Weiteren unterstützte Frau Andrea Rabung beim Erlernen der Anfertigung von Gefrierschnitten.

Ein Teil der Abbildungen wurde auf Grundlage der Ideen von Frau Dr. rer. nat. Anja Beckmann und der Vorlagen von Frau Franziska Müller angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstaatliche Erklärung	3
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Zusammenfassung.....	10
1. Summary	12
2. Einleitung	14
2.1. Multiple Sklerose	14
2.2. Neuritis Nervi optici.....	16
2.3. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis.....	18
2.4. Oligodendrozyten	20
2.5. Pannexine/Connexine	23
2.6. Therapeutische Ansätze	26
2.7. Probenecid	28
3. Hypothese	31
4. Material und Methoden	32
4.1. Chemikalien	32
4.2. Geräte und Materialien.....	33
4.3. Verbrauchsmaterialien.....	34
4.4. Software	35
4.5. Lösungen	36
4.6. Tierexperimentelle Arbeiten	38
4.7. Anfertigung von Gefrierschnitten	40
4.8. Histologische Färbungen	40
4.9. Immunhistochemische Färbungen	43
4.10. Bildaufnahmen.....	45
4.11. Transmissionselektronenmikroskopie.....	45
4.12. Statistische Auswertung.....	48
5. Ergebnisse	50
5.1. Verlauf der EAE-Symptomatik.....	50
5.1. Ultrastrukturelle Analyse der NN. optici.....	51
5.2. Analyse der Entzündungsparameter	53
5.2.1. Anti-CD3-Immunfluoreszenz.....	53
5.2.2. Anti-CD68-Immunfluoreszenz.....	55
5.2.3. Hämatoxylin-Eosin	56

5.3. Analyse der Demyelinisierung	58
5.3.1. Luxol-Fast-Blue- Histologie	58
5.3.2. Perjod-Säure-Schiff- Histologie.....	60
5.3.3. Olig2- Immunfluoreszenz	62
5.3.4. Oligodendrozyten-spezifisches Protein (OSP)	64
5.3.5. Connexin 47	65
5.3.6. Connexin 29 (Cx29)	68
6. Diskussion	72
6.1. Veränderungen im N. opticus im Rahmen der EAE	72
6.2. MS und optische Neuritis	74
6.3. EAE und Retinale Veränderungen	76
6.4. Therapeutischer Ansatz durch Pannexin Blockade.....	78
6.5. Connexin 47	80
6.6. Pannexine, Connexine und assoziierte Erkrankungen.....	83
6.7. Versuchsaufbau und Ausblick	84
7. Bibliographie	87
Danksagung	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur, Konformation und Durchlässigkeit der Pannexin- und Connexin-Kanäle.....	23
Abbildung 2: Verschiedene Aktivierungswege des Inflammasoms.....	29
Abbildung 3: Maus mit beidseitiger kompletter Hinterbeinparalyse	39
Abbildung 4: Beispielhafte Ausmessung des axonalen Innendurchmessers.....	48
Abbildung 5: Score-Verlauf der Versuchstiere	50
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Ausschnitte des N. opticus.....	51
Abbildung 7: Auswertung des axonalen Innendurchmessers	52
Abbildung 8: Auswertung Axonzahl pro Bildausschnitt.....	52
Abbildung 9: CD3-Immunfluoreszenz des N. opticus.....	53
Abbildung 10: Auswertung CD3 immunpositiven Zellen	54
Abbildung 11: CD68-Immunfluoreszenz im N. opticus.....	55
Abbildung 12: Auswertung CD68-Immunfluoreszenz	55
Abbildung 13: H.E.-Färbung des N. opticus.....	56
Abbildung 14: Auswertung der histologischen H.E.-Färbung.....	57
Abbildung 15: LFB-Färbung des N. opticus	58
Abbildung 16: Auswertung der LFB-Färbung.....	59
Abbildung 17: PAS-Färbung des N. opticus.....	60
Abbildung 18: Auswertung der PAS-Färbung	61
Abbildung 19: Olig2-Immunfluoreszenz des N. opticus	62
Abbildung 20: Olig2-Immunfluoreszenz an Längsschnitten der Nn. optici.....	63
Abbildung 21: Auswertung der Olig2- Immunfluoreszenz (Querschnitte)	63
Abbildung 22: OSP-Immunfluoreszenz des N. opticus	64
Abbildung 23: Auswertung der OSP-Immunfluoreszenz.....	65
Abbildung 24: Cx47-Immunfluoreszenz des N. opticus	66
Abbildung 25: Längsschnitte Cx47.....	67
Abbildung 26: Auswertung der Cx47-Immunfluoreszenz.....	67
Abbildung 27: Cx29-Immunfluoreszenz im N. opticus	68
Abbildung 28: Cx29-Immunfluoreszenz in Längsschnitten der Nn. optici.....	69
Abbildung 29: Auswertung der Cx29- Immunfluoreszenz (Querschnitte)	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Score-Einteilung	39
Tabelle 2: Semiquantitatives Bewertungssystem für die LFB- und PAS-Färbung	42
Tabelle 3: Semiquantitatives Bewertungssystem für die Zellkernzahl in der H.E.- Färbung.....	42
Tabelle 4: Primärantikörper.....	44
Tabelle 5: Sekundärantikörper.....	44

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ASR	Apoptose-Signal-regulierende Kinase
ATP	Adenosintri-phosphat
BBB	Blood-Brain-Barrier, Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovine Serum Albumine, Kälberserumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CIS	Clinically Isolated Syndrome, Klinisch isoliertes Syndrom
CPZ	Cuprizon
Cx	Connexin
dKO-Maus	Doppel-Knock out-Maus
EBV	Epstein-Barr-Virus
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxilin-Eosin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
K ⁺	Kalium
KO-Maus	Knock out-Maus
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
l	Liter
LFB	Luxol-Fast-Blue
M	Molarität, Mol pro Liter
MBP	Myelin-basisches-Protein
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
Min	Minute
mm	Millimeter
MBP	Myelin-basisches-Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF	Neurofilament
ng	Nanogramm
NGS	Normal Goat Serum, Normales Ziegen Serum
N. opticus	Nervus opticus
NNO	Neuritis Nervi Optici
Nn. Optici	Nervi optici
OSP	Oligodendrozyten-spezifisches-Protein

Panx	Pannexin
PAS	Periodic acid Schiff, Perjod-Säure-Schiff
PBN	Probenecid
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor, Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PLP	Proteolipid Protein
PPMS	Primär Progressive Multiple Sklerose
PTX	Pertussis Toxin
RRMS	Relapsing Remitting Multiple Sklerose
RTZ	Retinale Ganglienzellen
s	Sekunde
shh	Sonic Hedgehog Protein
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMEM	Theiler's-Murine-Encephalyomyelitis-Model
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
VZ	Ventrikuläre Zone
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Gehirns und des Rückenmarks, die durch lokale Infiltration zu Schäden an Myelin und Axonen führt. Bisher gibt es keine ursächliche Therapie. Die symptomatisch und palliativ eingesetzten Therapeutika haben häufig eine Vielzahl an Nebenwirkungen. Seit Jahrzehnten werden verschiedene Tiermodelle der Multiplen Sklerose eingesetzt, um die komplexe Pathophysiologie besser zu verstehen und neue Therapien zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) genutzt.

In der Vergangenheit zeigte sich, dass durch die Inhibierung von Pannexin1 mittels Probenecid ein signifikanter Einfluss auf den Verlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis genommen werden kann. Bei präventiver Gabe von Probenecid konnte das Einsetzen der Symptomatik der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis verhindert werden. Bei therapeutischer Gabe erfolgte eine Stabilisierung der klinischen Symptomatik.

Da bei 85% der Patienten mit einem ersten Erkrankungsschub der Nervus opticus betroffen ist, fokussierte die vorliegende Arbeit auf die Pathologien im Nervus opticus. In einem ersten Versuchsteil wurde analysiert, ob die Pathologie im Nervus opticus auch ultrastrukturell in der Frühphase der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis darzustellen ist. Dazu wurden Ultradünnschnitte von Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis- und Sham-Tieren elektronenmikroskopisch vergleichend analysiert. Die EAE-Tiere wurden bei Erreichen eines klinischen Scores von 1,5 (also in der Frühphase der Erkrankung) euthanasiert. Hierbei zeigte sich verglichen mit den Sham-Tieren ein signifikanter Unterschied im Durchmesser der Axone und dadurch bedingt auch in der Anzahl der pro Bildabschnitt dargestellten Axone. Dies ist zu erklären durch die Ausbildung eines Zellödems mit konsekutiver Schwellung und Umfangsvergrößerung vor Beginn der Demyelinisierung.

In einem weiteren Versuchsteil wurde durch die Analyse von Entzündungsmarkern, sowie durch Quantifizierung der Demyelinisierung untersucht, ob es bei der Induktion einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis in den Versuchstieren auch zu entzündlichen Prozessen mit einhergehender Demyelinisierung im Bereich der Nervi optici kommt. Dies geschah mittels Histologie und Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten der Nervi optici der Versuchstiere und der anschließenden Analyse bezüglich Infiltrationsprozessen und Myelinisierung.

Zusammenfassend lässt sich die Pathologie im Nervus opticus auch in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis darstellen. Hierbei zeigten sich signifikante Entzündungsprozesse, sowie Demyelinisierung in den optischen Nerven der EAE-Tiere verglichen mit der Kontrollgruppe.

In einem angeschlossenen dritten Versuchsteil erfolgte die Analyse des Einflusses von Probenecid auf den MS-assoziierten Untergang von Oligodendrozyten im Nervus opticus.

Dies geschah ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten der Nervi optici der Versuchstiere und der anschließenden Analyse bezüglich Infiltrationsprozessen und Myelinisierung. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Demyelinisierung und den Entzündungsprozessen zwischen den Nervi optici der verschiedenen Versuchsgruppen. Einzig konnte in den Probenecid-behandelten Tieren eine vermehrte Expression von Connexin47 beobachtet werden. Da Connexin47 wichtige immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden, könnte man, trotz nicht signifikanter Unterschiede in Demyelinisierung und entzündlicher Infiltration, Probenecid einen protektiven Effekt zuschreiben.

Auch wenn im Nervus opticus nicht alle der im Rückenmark beobachteten Effekte auftraten, ist festzuhalten, dass besonders die Probenecid-assoziierte Hochregulation von Connexin47 als positiv betrachtet werden sollte.

1. Summary

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory disease of the brain and spinal cord that causes damage to myelin and axons through local infiltration. To date, there is no causative therapy. Therapeutic agents used symptomatically and palliatively often have a variety of side effects. For decades, various animal models of multiple sclerosis have been used to understand the complex pathophysiology and to develop new therapies. In the present work, the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model was used.

In the past, inhibition of pannexin 1 by probenecid was shown to have a significant effect on the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. Prophylactic administration of probenecid prevented the onset of symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis. With therapeutic administration, stabilization of clinical symptoms occurred.

Since the optic nerve is affected in 85% of patients within the first episode of the disease, the present study focused on pathologies in the optic nerve. In a first part of the study, it was analyzed whether the pathology in the optic nerve can also be visualized ultrastructurally in the early phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. For this purpose, ultrathin sections of EAE and Sham animals were analyzed comparatively by electron microscopy. The EAE animals were euthanized when a clinical score of 1.5 was reached (i.e. in the early phase of the disease). Compared to the Sham animals, there was a significant difference in the diameter of the axons and, thus, also of the number of axons visualized per image section. This can be explained by the formation of cell oedema with consecutive swelling and circumferential enlargement before the onset of demyelination.

In a second part of the experiment, the analysis of inflammatory markers and the quantification of demyelination were used to investigate whether the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis also leads to inflammatory processes with accompanying demyelination of optic nerves. This was done by histology and immunofluorescence staining of frozen sections of the optic nerves and the subsequent analysis with regard to infiltration processes and myelination.

In summary, the pathology in the optic nerve can also be seen in experimental autoimmune encephalomyelitis. Significant inflammatory processes and demyelination were observed in the optic nerves of the EAE animals compared to the control group.

In a third part of the experiment, the influence of probenecid on the experimental autoimmune encephalomyelitis-associated destruction of oligodendrocytes in the optic nerve was analyzed. This was also done by immunofluorescence staining of frozen sections of the optic nerves and subsequent analysis with regard to infiltration processes and myelination. There were no significant differences in demyelination and inflammatory processes between the optic nerves of the different experimental groups. Only an increased expression of connexin47 was observed in the probenecid-treated animals. Since connexin47 is thought to have important

immunomodulatory properties, a protective effect could be attributed to probenecid, despite non-significant differences in demyelination and inflammatory infiltration.

Even if not all of the effects observed in the spinal cord occurred in the optic nerve, the probenecid-associated upregulation of connexin47 in particular might be regarded as beneficial.

2. Einleitung

2.1. Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Gehirns und des Rückenmarks, die durch lokale lymphatische Infiltration zu Schäden an Myelin und Axonen führt (COMPSTON, COLES, 2008).

Die Lebenszeitprävalenz liegt bei 2-150 / 100.000 in Abhängigkeit der betrachteten Region und ist am höchsten in Europa, Südkanada und den nördlichen USA. Im Allgemeinen sind Frauen circa doppelt so häufig betroffen wie Männer. Die höchste Prävalenz findet sich zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, mit einem Maximum in der dritten Dekade (MAKRIS et al., 2014). Stand 2017 waren weltweit circa 2,3 Millionen Menschen an MS erkrankt (DOSHI, CHATAWAY, 2017).

Das erste Anzeichen einer Demyelinisierung im ZNS wird als klinisch isoliertes Syndrom (Clinically Isolated Syndrome, CIS) bezeichnet. Dabei kommt es zu mindestens 24 Stunden andauernden neurologischen Ausfallerscheinungen, die abhängig vom Schädigungsort im Gehirn sind. In 85% der Fälle sind dabei der Nervus opticus (N. opticus), der Hirnstamm oder das Rückenmark betroffen. Als durch diese Schädigungsorte erklärbare und typische Symptome gelten subakuter unilateraler Visusverlust, bilaterale internukleäre Ophthalmoplegie, subakute Rückenmarkssymptome, Fatigue, Hitzeempfindlichkeit, sensorische Missempfindungen am Rumpf und den Gliedmaßen, Balanceprobleme, Vertigo, kognitive Ausfälle und Ataxie (NAZISH et al., 2018). Viele Patient/-innen mit CIS zeigen in der Magnetresonanztomographie (MRT) bereits multifokale Läsionen; vor allem das Neuauftreten von Läsionen nach der initialen MRT wird als Risikofaktor für den Übergang in eine MS gewertet.

Nach einem akuten Anfall kommt es typischerweise zu einer Phase vollkommener oder teilweiser Remission (KARUSSIS, 2014). Im Laufe der Zeit kommt es bei 85% der Patient/-innen zur Ausbildung einer Relapsing Remitting MS (RRMS), bei der sich Schübe mit Phasen der Remission abwechseln. Diese Form geht in 80% der Fälle im Laufe von 12-19 Jahren in eine sekundär progrediente Form über (SPMS). Dabei kommt es nicht mehr zur Rückbildung der Symptome nach einem Schub, sondern zur kontinuierlichen Verschlechterung der Symptomatik und zu einer kumulativen Beeinträchtigung der Patient/-innen (MANOUCHEHRINIA, CONSTANTINESCU, 2012). Hierbei kann eine frühzeitige Diagnosestellung und eine adäquate Therapie den Übergang von der RRMS in die SPMS teilweise verzögern (NAZISH et al., 2018). Die RRMS ist die am häufigsten auftretende Form der MS.

Davon unterschieden werden muss die primär progressive Form (PPMS), bei der es ohne Phasen der Remission nach dem ersten Anfall zur progressiven Verschlechterung der Symptome kommt (MAKRIS et al., 2014).

Die genaue Ätiologie der Erkrankung ist bisher nur teilweise geklärt. Bekannt ist, dass Umweltfaktoren und genetische Prädisposition eine Rolle spielen. Es zeigt sich eine deutliche Korrelation zwischen Erkrankungshäufigkeit und Breitengrad, besonders betroffen ist hierbei die kaukasische Population. Weitere Risikofaktoren sind Zigarettenrauchen und Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) als junger Erwachsener, verminderte UV-Exposition und verminderte Vitamin D-Konzentration im Blut (COMPSTON, COLES, 2008).

Auf genetischer Ebene finden sich Mutationen in immunologisch relevanten Genen; diese führen zu Veränderungen in den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexen der Mikroglia (Major Histocompatibility Complex; MHC). Es kommt zu Schäden in der Blut-Hirn-Schranke (BBB, Blood Brain Barrier) und dem Einwandern autoreaktiver Lymphozyten in das ZNS (GANDHI et al., 2010). Der nachfolgende Schädigungsmechanismus lässt sich wie folgt erklären: Durch Entzündungsprozesse, Demyelinisierung, Remyelinisierung, Erschöpfung des Oligodendrozytenkontingentes, Astrozytose sowie neuronale und axonale Degeneration bilden sich als finale Konsequenz Demyelinisierungsherde im Gehirn.

Myelin wird im ZNS von differenzierten Oligodendrozyten gebildet, die jeweils mit 20-40 Axonen in der weißen Substanz in Kontakt treten. Sie formen Myelinscheiden und ermöglichen, durch die Isolierung der Axone, die saltatorische Erregungsleitung mittels der Ranvier-Schnürringe (BARRES et al., 1992).

Kommt es zur Ausbildung einer MS, wandern zunächst autoreaktive Lymphozyten über die BBB ins ZNS. Die regulatorischen T-Zellen schaffen es nicht, die autoreaktiven Effektorzellen zu unterdrücken. Diese begehen auf Stimulation durch die regulatorischen T-Zellen hin nicht adäquat Apoptose, da sie β -Arrestin 1 überexprimieren (SHI et al., 2007). Beta-Arrestin 1 ist ein Protein, das das Überleben nativer und aktivierter T-Zellen steuert. Durch das Versagen dieser regulatorischen Kaskaden kommt es zur ausgedehnten Entzündungsreaktion im Gehirn, welche durch perivaskuläre T-Zell-Infiltrate dominiert ist (SHI et al., 2007).

Vermittelt wird die Entzündungsreaktion im ZNS vor allem durch Typ 17 T-Helferzellen (T_H -17) und Typ 23 T-Helferzellen (T_H -23). T_H -17-Zellen sezernieren Interleukin 17 (IL-17), welches die endothelialen Zellen, die Astrozyten und Perizyten der BBB angreift und das Einwandern der T-Helferzellen in das ZNS erleichtert (SHI et al., 2007). Die genaue Antigenspezifität dieser Immunreaktion ist jedoch ungeklärt, da viele autoreaktive Lymphozyten nicht nur bei MS Patient/-innen, sondern auch in gesunden Individuen zu finden sind (COMPSTON, COLES, 2008)

Die Erholung der Patienten nach einem akuten Schub lässt sich durch eine dann stattfindende Remyelinisierung erklären. Die Remyelinisierung im ZNS ist am ausgeprägtesten in Phasen

akuter Entzündung, während Phagozyten die Bruchstücke des alten Myelins entfernen, aber auch während der progressiven Phase zeigt sich noch stellenweise der Versuch der Wiederherstellung axonaler Funktion (WILLIAMS et al., 2007). Das adulte ZNS hat einen Pool von oligodendrozytären Vorläuferzellen, die als Antwort auf Botenstoffe migrieren können. Sie umrunden als undifferenzierte Oligodendrozyten die Läsionen und haben so das Potential, durch ihre Differenzierung unmyelinisierte Axone zu remyelinisieren. Nach mehreren Zyklen von Demyelinisierung und Remyelinisierung scheint das Kontingent der oligodendrozytären Vorläuferzellen jedoch erschöpft zu sein (COMPSTON, COLES, 2008; WILLIAMS et al., 2007). So kommt es nach der durch neuronale Plastizität und Remyelinisierung charakterisierten Phase zur Ausbildung der klassischen Symptome. Die Erregungsweiterleitung findet dann zwar noch entlang der demyelinisierten Axone im Bereich der Läsionen statt, ist dabei aber deutlich verlangsamt. Dadurch lässt sich die charakteristische Verzögerung evozierter Potentiale erklären, die sich typischerweise bei MS-Patient/-innen findet (COMPSTON, COLES, 2008). Es kommt jedoch nicht nur zu einer verlangsamt Reizweiterleitung: Ohne den Schutz der Oligodendrozyten kann es auch zu spontanen Entladungen der Axone kommen, daraus resultieren Missempfindungen wie Kribbelgefühle und Schmerzen sowie Falsch- und Doppelbilder für die Patient/-innen (COMPSTON, COLES, 2008).

2.2. Neuritis Nervi optici

Visuelle Einschränkungen sind ein häufiges Frühsymptom der MS. 20-30% der Patient/-innen präsentieren sich bei Erstmanifestation mit einer Neuritis Nervi Optici (NNO). Mindestens 70% der MS Patient/-innen entwickeln im Verlauf visuelle Einschränkungen (MANOGARAN et al., 2018).

Zum genauen Verständnis der Vorgänge im N. opticus sollte man zunächst die embryonale Entwicklung des optischen Systems betrachten.

Die Entwicklung des visuellen Systems beginnt im humanen Embryo in der dritten Gestationswoche und dauert bis zur zehnten Gestationswoche. Das Augengewebe ist mesodermalen und ektodermalen Ursprungs; der N. opticus entwickelt sich aus Neuroepithel des Diencephalons und die Augenentwicklung beginnt mit der Ausstülpung des Augenbläschens (LUDWIG, CZYZ, 2019). Da sich der N. opticus und das Auge aus zerebralem Gewebe entwickeln, ist eine Besonderheit des N. opticus seine Zugehörigkeit zum ZNS (LUDWIG, CZYZ, 2019).

Die eigentliche Entwicklung des N. opticus kann in drei Phasen gegliedert werden. In der ersten Phase findet die Bestimmung des Gebietes statt, in dem sich der Ursprung des N. opticus findet. In der zweiten Phase kommt es zum Wachstum von Axonen der retinalen Ganglienzellen (RGZ) aus der Retina in Richtung des Chiasma opticum und in der dritten

Phase migrieren und differenzieren optische Gliazellen, genauer Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia, aus der diencephalen Region und es kommt zur Myelinisierung der Axone (COLELLO et al., 1995).

Die erste Phase beginnt früh in der neuronalen Entwicklung, wobei es zu bilateralen Ausstülpungen aus der anterioren Seite des Neuralrohrs kommt. Die ventrale Seite des optischen Bläschens formt ein Kontinuum mit dem optischen Stiel und stülpt sich aus, um gemeinsam einen Kanal zu bilden, der als optische Fissur bezeichnet wird (HERRERA et al., 2019). Diese Fissur fusioniert mit dem Augenbecher, und die Kontaktstelle zwischen optischer Fissur und Augenbecher bildet die Papilla nervi optici. Hier befindet sich die Austrittsstelle der RGZ-Axone aus der Retina. Der Austritt und die Richtung des axonalen Wachstums werden durch das Protein Sonic Hedgehog (Shh) ausgelöst und geleitet (TAKE-UCHI et al., 2003).

In der zweiten Phase kommt es durch den Eintritt erster RGZ-Axone zur Entwicklung des optischen Stiels zum N. opticus. Dieser Prozess beginnt in der dorsozentralen Zone der späteren Retina, nahe der Papille, und setzt sich nach und nach in die Peripherie fort (HERRERA et al., 2019). Je nach Position der RGZ muss das Axon eine mehr oder weniger lange Strecke zurücklegen, bis es die Papille erreicht hat und in den N. opticus austreten kann. An der Papille erfolgen der Austritt und ein Abknicken im Winkel von 45°, um die Richtung des N. opticus einzuschlagen (HERRERA et al., 2019; LIN et al., 1996).

Durch den Eintritt von mehr und mehr Axonen kommt es zum Längenwachstum des optischen Stiels. Dabei ist der Stiel in zwei Zonen gegliedert, eine periphere aktinhaltige Zone und eine zentrale Region, welche die wachsenden Axone enthält. Depolymerisierung und Repolymerisierung der peripheren Aktinanteile bestimmen das Fortschreiten des axonalen Wachstums (HERRERA et al., 2019).

In der dritten Phase werden die Axone durch die für den N. opticus typischen Gliazellen ergänzt. Es kommt zur Einwanderung von Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia. Diverse Wechselwirkungen zwischen Axonen, Astrozyten und Zellen oligodendrozytärer Abstammung sorgen für die Spezifizierung der jeweiligen Population jeder Gliazelle und die präzise Myelinisierung des N. opticus durch Oligodendrozyten.

Oligodendrozytäre Vorläuferzellen entstammen der ventrikulären Zone im Diencephalon auf der Höhe des zukünftigen Chiasmas. Ihre Migration wird getriggert durch Signale, die von den RGZ freigesetzt werden, auch Shh zieht die oligodendrozytären Vorläuferzellen an. Wenn die oligodendrozytären Vorläuferzellen am Ende des N. opticus im augenahen Anteil angekommen sind, kommt es zum Stopp der Migration. Oligodendrozyten treten nie in die Retina ein, es erfolgt also keine Myelinisierung des retinalen Anteils der RGZ-Axone (FFRENCH-CONSTANT et al., 1988; GAO et al., 2006).

Visuelle Einschränkungen sind typisch für Patient/-innen mit MS (SANCHEZ-DALMAU et al., 2018). Als NNO wird eine Entzündung des N. opticus mit einhergehender Demyelinisierung

beschrieben, welche häufig als eines der ersten klinischen Symptome einer MS zu beobachten ist (COMPSTON, COLES, 2008). Die Entzündungsprozesse im N. opticus gehen einher mit Nervenschädigung und auf lange Sicht einem Visusverlust. Eine wichtige Komponente bei der Entstehung der Entzündung im N. opticus sind Lymphozyten, die Liquor, Hirngewebe, Rückenmark und den N. opticus infiltrieren (SOARES et al., 2013; TELESHOVA et al., 2002). Es hat sich gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Infiltration durch CD4- und CD8-positive T-Helferzellen und dem Ausmaß der Demyelinisierung und der dadurch bedingten axonalen Schädigung besteht. Weitere Schädigungsmechanismen sind z.B. Mitochondrien-assoziiertes oxidativer Stress, intraaxonale Natriumanreicherung, BBB-Veränderungen und Fehlfunktion der Apoptose-Signal-regulierenden Kinase 1 (ASR1) (SOARES et al., 2013). Letztere ist beteiligt an der Rekrutierung von Mikroglia und kann dadurch indirekt Einfluss nehmen auf den Prozess der Demyelinisierung (SOARES et al., 2013).

Ebenfalls besteht ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Beteiligung des visuellen Systems und einer deutlich globaleren Ausprägung der zerebralen Pathologie der MS. Dadurch wird das visuelle System zu einem interessanten Forschungsobjekt, um die genauen Mechanismen der Demyelinisierung und Zellschädigung besser zu verstehen (SOARES et al., 2013). In Folge einer MS-getriggerten Episode einer NNO, kann es bei einigen Patienten zu strukturellen retinalen Schäden kommen (SOARES et al., 2013). Diese Schäden gehen einher mit einer verminderten Dicke der peripapillaren retinalen Nervenfaserschicht und einer verminderten Dicke der makularen Ganglienzellschicht (SOARES et al., 2013).

2.3. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Da die genaue Pathogenese der MS bislang nicht im Detail geklärt ist, werden verschiedene Tiermodelle genutzt, um die Pathogenese zu analysieren und Therapieoptionen zu etablieren. Es handelt sich bei der MS um eine rein humane Erkrankung, daher ist es keinem Tiermodell möglich, alle klinischen, pathologischen und genetischen Komponenten in ihrer Gesamtheit abzubilden (DENIC et al., 2011). Es gibt jedoch die Möglichkeit, verschiedene Aspekte der Pathogenese und der Klinik der MS mit Hilfe der einzelnen Modelle abzubilden (VAN DER STAR et al., 2012).

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist charakterisiert durch Entzündung, Schädigung des Myelins und Neurodegeneration. Klassisch wird sie heute in Nagern induziert, wurde jedoch erstmals in den 1880ern als Impfreaktion durch Louis Pasteur entdeckt. Er verimpfte mit ZNS-Proteinen verunreinigten Impfstoff, woraufhin es bei manchen Patienten zu Lähmungserscheinungen kam. In den Gehirnen der Betroffenen fanden sich Entzündungsprozesse und Demyelinisierung (BAXTER, 2007). Diese Entdeckung machte sich wenige Jahre später Thomas Rivers zunutze und verabreichte Rhesusaffen und

Kaninchen wiederholte Impfungen mit ZNS-Antigenen, um in ihnen die gleichen Lähmungserscheinungen zu induzieren und diese genauer zu erforschen (VAN DER STAR et al., 2012). Rivers Induktionsprotokoll erforderte viele repetitive Injektionen mit ZNS-Antigenen. Kabat entdeckte später jedoch, dass die Erkrankung bereits mit einer einzigen Injektion zu induzieren ist, wenn man dem ZNS-Antigen ein Adjuvans, wie zum Beispiel Freund's Adjuvans, hinzufügt (VAN DER STAR et al., 2012). Ein weiterer Vorteil dieses Protokolls ist, dass die Erkrankung bereits nach wenigen Wochen und nicht erst nach Monaten ausbricht (KIPP et al., 2012).

Neben der EAE sind die am häufigsten genutzten Modelle ein toxisches Modell, bei dem den Versuchstieren eine Diät mit dem Kupfer-Chelator Cuprizon (CPZ) gefüttert wird, sowie das Theiler's-Murine-Encephalomyelitis-Modell (TMEM). Beim TMEM verursachen Viren direkt oder indirekt Schäden am Myelin. Das CPZ-Modell ist besonders geeignet, um Therapien zu erforschen, die sich mit der Remyelinisierung befassen. Zu beachten ist hierbei, dass es im CPZ-Modell zu frühen und schweren Schäden an den Oligodendrozyten kommt, die Schädigung jedoch nicht primär inflammatorisch vermittelt ist (VAN DER STAR et al., 2012). Dadurch gelingt die Differenzierung zwischen immunmodulierten und intrinsisch durch das ZNS vermittelten Schädigungsprozessen (VAN DER STAR et al., 2012).

Im TMEM kommt es durch Infizierung der Oligodendrozyten mit den entsprechenden Viren zu direkten oder indirekten Schäden am Myelin. Auch in diesem Modell spielen inflammatorische Prozesse nur eine untergeordnete Rolle (VAN DER STAR et al., 2012).

Die EAE wird in den Versuchstieren durch Injektion eines Myelin-Antigens induziert, welches in einem Adjuvans gelöst ist, um die Immunreaktion des Tiers zu verstärken. Die klinischen und pathologischen Merkmale, die sich so in den Versuchstieren darstellen lassen, sind abhängig vom genutzten Antigen und dem Adjuvans, genauso wie von der Spezies, dem Stamm, dem Alter und dem Geschlecht des Versuchstieres. Als Adjuvans werden typischerweise Bestandteile getöteter Mykobakterien genutzt, die eine T-Zellantwort mit Antikörperproduktion in den Tieren initiieren (LIBBEY, FUJINAMI, 2011). In der Vergangenheit wurde als ZNS-Antigen am häufigsten Myelin-Basisches-Protein (MBP) gewählt, heute nutzt man klassischerweise Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) in Kombination mit dem Adjuvans, sowie Pertussis Toxin (PTX) zur Verstärkung der Immunantwort.

Erste Symptome der Tiere sind meist Gewichtsverlust und Rückgang der Aktivität. In vielen Tieren zeigt sich ein monophasischer Verlauf der Erkrankung, die Symptomausprägung schreitet von Schwanzspitzenpareesen bis hin zu kompletten Paralysen fort. Im Anschluss kann es zur Remission der Symptomatik und der Erholung der Tiere kommen (VAN DER STAR et al., 2012). Modelle, in denen es zur Remission der Symptomatik kommt, sind geeigneter, um Forschung auf dem Gebiet der RRMS durchzuführen. Es gibt auch Modelle, in denen es nach Phasen der Remission zur Akkumulation der Symptomatik kommt, diese Modelle sollten zur

Forschung im Bereich der SPMS genutzt werden (HAMPTON et al., 2008; VAN DER STAR et al., 2012).

Die am häufigsten zur Induktion der EAE genutzten Versuchstiere sind Mäuse, die EAE wird aber auch in Ratten und anderen Nagerspezies induziert. Nach der Induktion kommt es bei den Tieren zu Mikrogliaaktivierung, perivaskulären Infiltraten mit T- und B-Zellen und zu Schäden am Myelin (VAN DER STAR et al., 2012).

T-Zellen, im Speziellen T_H1 -CD4+-Zellen, sind schon lange bekannt dafür an der Pathogenese der EAE beteiligt zu sein. Die Erschöpfung des T_H1 -CD4+-Zellpools, oder Therapien, die die Interaktion mit MHC II Molekülen blockieren, sind bekannt dafür, die Induktion der EAE zu inhibieren und klinische Erscheinungen zu minimieren. In entzündlichen Läsionen ist eine deutliche Dominanz von CD8+-T-Zellen zu erkennen. Eine EAE kann jedoch nicht alleine durch den Transfer von B-Zellen induziert werden, so dass die genaue Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der EAE noch geklärt werden muss (KIPP et al., 2012). Gleiches gilt für die Induktion von Schäden an Myelin und Neuronen durch die Antikörper. Klar ist jedoch, dass Autoimmunität eine Voraussetzung für die akute neuronale MS-Erkrankung ist (KIPP et al., 2012).

2.4. Oligodendrozyten

Oligodendrozyten gehören neben Astrozyten und Mikroglia zu den glialen Zellen des ZNS. Sie dienen der Myelinisierung der Axone im ZNS (KIRCHHOFF, KETTENMANN, 1992) und entstehen durch die Differenzierung sogenannter oligodendrozytärer Vorläuferzellen (DAVIS, TEMPLE, 1994).

In der embryonalen Entwicklung entstehen oligodendrozytäre Vorläuferzellen in der zwischen Striatum und Seitenventrikeln gelegenen ventrikulären Zone (VZ) (WARF et al., 1991). Es kommt zur Proliferation und Migration der oligodendrozytären Vorläuferzellen in die sich entwickelnde graue und weiße Substanz. Bei Erreichen des Zielortes erfolgt die Differenzierung der oligodendrozytären Vorläuferzellen zu adulten Oligodendrozyten (DAVIS, TEMPLE, 1994). Oligodendrozytäre Vorläuferzellen zeigen eine uniforme Verteilung auch im adulten ZNS und bilden einen Pool adulter Vorläuferzellen, die bei Bedarf zu Oligodendrozyten differenzieren können (BANDEIRA et al., 2009). Dadurch unterscheiden sie sich von anderen Vorläuferzellen, die in der Regel im adulten ZNS nicht mehr zu finden sind (KUHN et al., 2019). Im embryonalen Gehirn und Rückenmark (RM) teilen sich in der ventrikulären germinalen Zone gliale Stammzellen, dabei bleibt eine Tochterzelle in Kontakt mit der VZ und die zweite Tochterzelle wird zur oligodendrozytären Vorläuferzelle. Im Anschluss kommt es zur Proliferation und Migration der oligodendrozytären Vorläuferzelle, bis sich nach wenigen Tagen eine uniforme Verteilung der oligodendrozytären Vorläuferzellen im gesamten ZNS und RM eingestellt hat (PRINGLE, RICHARDSON, 1993). Man unterscheidet zwischen einer

ersten und einer zweiten Welle der oligodendrozytären Vorläuferzellen Produktion; die erste Welle stammt aus dem ventralen Anteil der VZ, die zweite Welle wird etwas später gebildet und stammt aus dem dorsalen Anteil der VZ (BERGLES, RICHARDSON, 2015). Im adulten RM werden 20% der Oligodendrozyten aus dorsal gebildeten oligodendrozytären Vorläuferzellen bereitgestellt und 80% aus ventral gebildeten oligodendrozytären Vorläuferzellen (TRIPATHI et al., 2011).

Die Migration von oligodendrozytären Vorläuferzellen findet im sich entwickelnden ZNS entlang von Blutgefäßen statt. Die oligodendrozytären Vorläuferzellen verbinden sich mit der endothelialen Oberfläche sich formender Blutgefäße und wandern entlang dieser Gefäße (TSAI et al., 2016). Die Migration vom Bildungsort zu den jeweiligen Zielorten ist nicht untypisch für Zellen des ZNS. Nahezu alle Zellen glialen Ursprungs neigen in der Entwicklung des ZNS Migration (TSAI et al., 2016). Neuroblasten zeigen eine radiale und tangential Migration und folgen dabei radialen glialen Fasern, kortikofugalen Fasern oder Bergmann Glia. Astrozyten zeigen nur eine radiale Migration, wandern also entlang radialer glialer Fasern, es kommt nicht zur sekundären tangentialen Migration (LOIS, ALVAREZ-BUYLLA, 1994; NADARAJAH et al., 2001; O'ROURKE et al., 1992). Oligodendrozytäre Vorläuferzellen migrieren über eine größere Distanz als andere gliale Zellen und müssen im Rahmen ihrer Migration weite Strecken durch kompakte Gewebe zurücklegen. Durch Interaktion mit ihrem Ziel stoppt die Migration. Diese Funktion bleibt auch in adulten oligodendrozytären Vorläuferzellen erhalten und ist bei Prozessen der Remyelinisierung von Bedeutung (TSAI et al., 2016). Die Motilität der oligodendrozytären Vorläuferzellen wird reguliert durch intrinsische Prozesse, Polarität und extrazelluläre Signale. In Rahmen der embryonalen Entwicklung des ZNS ist das Gefäßsystem bereits etabliert, bis erste oligodendrozytäre Vorläuferzellen gebildet werden. Die oligodendrozytären Vorläuferzellen treten mit ihrem Zellkörper in Kontakt mit dem Endothel der Gefäße und wandern entlang der Blutgefäße in andere Regionen des ZNS. Bei der Migration entlang der Gefäße lassen sich zwei Verhaltensweisen beobachten. Entweder kommt es zur gebundenen Fortbewegung entlang des Gefäßes, dabei bleibt der Zellkörper konstant in Kontakt mit dem Endothel des Gefäßes, oder es kommt zur deutlich schnelleren ungebundenen Fortbewegung entlang der Gefäße. Dabei wird durch einen Ausläufer der oligodendrozytären Vorläuferzelle mit einem anderen Gefäß Kontakt aufgenommen, im Anschluss erfolgt die Translokation des Zellkörpers auf das neue Gefäß (TSAI et al., 2016). In Versuchstieren, in denen sich eine Störung der Vaskularisierung des ZNS erkennen lässt, zeigte sich eine Akkumulation von oligodendrozytären Vorläuferzellen in der subventrikulären Zone und einer 70% geringeren durch oligodendrozytäre Vorläuferzellen eingenommenen Fläche im ZNS (TSAI et al., 2016).

Oligodendrozytäre Vorläuferzellen und reife Oligodendrozyten können durch den Nachweis charakteristischer „Marker“-Proteine unterschieden werden. Oligodendrozytäre Vorläufer-

zellen exprimieren DM-20 mRNA, der beste Marker zur Identifikation ist jedoch die Expression des Platelet-derived growth factor (PDGF) α -Rezeptors. Die Bindung von PDGF AA (Wachstumsfaktor aus Thrombozyten) an den Rezeptor PDGFR α wurde als potentester Überlebensfaktor für oligodendrozytäre Vorläuferzellen identifiziert (TIMSIT et al., 1995). Reife Oligodendrozyten sind charakterisiert durch die Expression von Myelinproteinen in Kombination mit der Expression weiterer Zellreihen-spezifischer Marker. Charakteristische Myelinproteine der Oligodendrozyten sind das MBP, das Oligodendrozyten spezifische Protein (OSP) und MOG (BRUNNER et al., 1989; SOMMER, SCHACHNER, 1981; TIMSIT et al., 1995). Proteinlipid Protein (PLP) ist sowohl in reifen Oligodendrozyten als auch in oligodendrozytären Vorläuferzellen vorhanden. Gleiches gilt für die Expression der Zellreihen-spezifischen Transkriptionsfaktoren Olig1 und Olig2 (HARLOW et al., 2014; ZHOU et al., 2000)). Olig2 spielt eine essenzielle Rolle in der Entwicklung neuraler Vorläuferzellen zu oligodendrozytären Vorläuferzellen und kann oligodendrozytäre Vorläuferzellen zur Remyelinisierung anregen (ROWITCH, 2004; WEGENER et al., 2015). Olig1 spielt ebenfalls eine Rolle in Prozessen der Remyelinisierung, unterstützt aber auch bei der Differenzierung von oligodendrozytären Vorläuferzellen zu reifen Oligodendrozyten (DAI et al., 2015; XIN et al., 2005)). In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf der Analyse der Expression von OSP und Olig 2.

2.5. Pannexine/Connexine

Pannexin- und Connexin-Proteine sind sich in ihrer Topologie sehr ähnlich, gehören jedoch verschiedenen Proteinfamilien an (BOASSA et al., 2007). Beide enthalten vier transmembranäre Domänen mit intrazellulärem N- und C-Terminus, die durch zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife verbunden sind (BECKMANN et al., 2016; BOASSA et al., 2007).

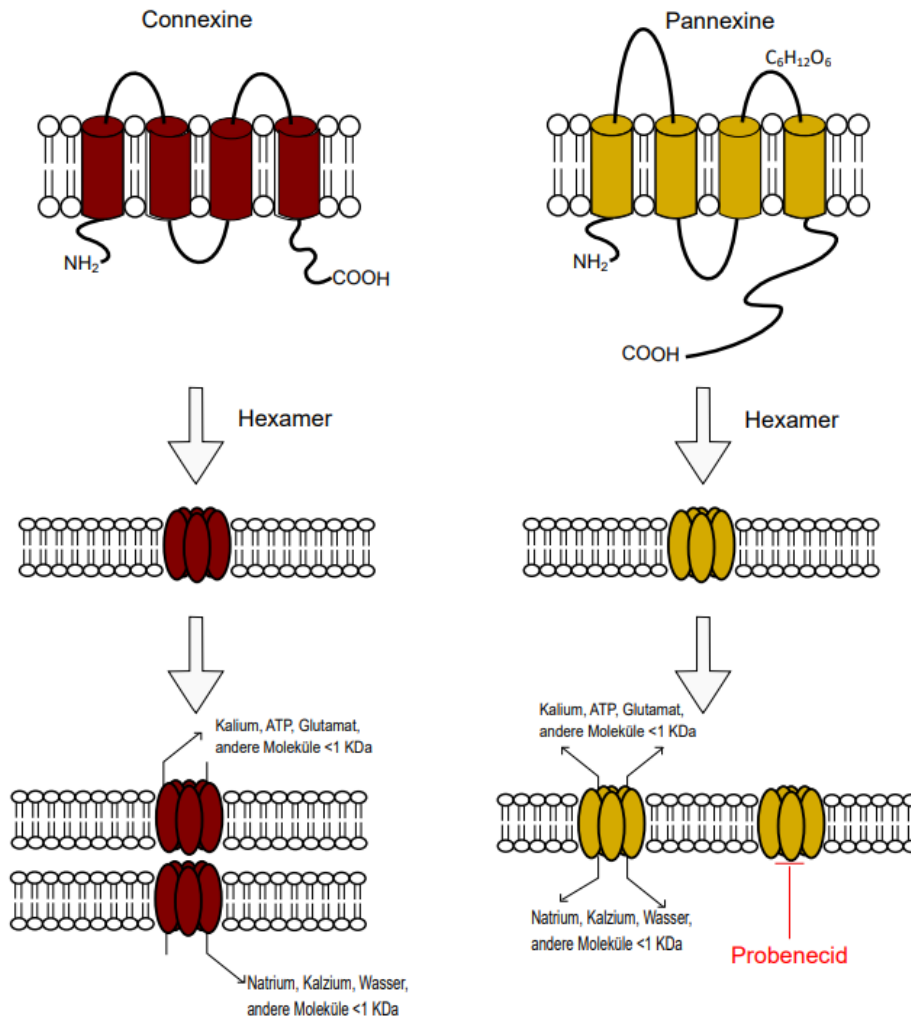


Abbildung 1: Struktur, Konformation und Durchlässigkeit der Pannexin- und Connexin-Kanäle

Schematische Darstellung des Aufbaus von Connexinen und Pannexinen. Connexine bilden Gap junctions und sind mit vier Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert. Sechs Connexine oligomerisieren sich zu einem Hexamer und bilden einen Transmembrankanal (Hemikanal) der mit den Connexonen der Nachbarzelle einen interzellulären Gap junction Kanal bildet. Pannexine sind ebenfalls mit vier Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert, es erfolgt ebenfalls die Oligomerisierung zu einem Transmembrankanal. Abbildung frei nach Abbildung in (BECKMANN et al., 2019), offen lizenziert nach CC BY 4.0.

2.5.1 Connexine

Die Familie der Connexine ist weitaus größer als die der Pannexine. Connexine werden nahezu ubiquitär im Körper exprimiert, jedoch exprimieren spezifische Zellen auch nur spezifische Connexine. Im ZNS exprimieren Astrozyten Connexin (Cx) 43, Cx30 und Cx26. Oligodendrozyten exprimieren Cx47, Cx32 und Cx29 (FANG et al., 2018; NAGY et al., 2004; ODERMATT et al., 2003). Diese glialen Connexine bilden mehrheitlich Gap Junctions, die den interzellulären Austausch von Ionen und Botenstoffen erlauben. Die Gap Junctions werden zwischen Astrozyten und Astrozyten, Oligodendrozyten und Astrozyten sowie Oligodendrozyten und Oligodendrozyten ausgebildet (NAGY, RASH, 2000). Dabei kommt es nicht immer zu homomeren Gap Junctions: Vor allem in der Kommunikation zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten werden durch die unterschiedliche Expression von Connexinen Gap Junctions gebildet, die nicht aus den gleichen Connexinen aufgebaut sind, sogenannte heteromere Gap Junctions (PAPANEOPHYTOU et al., 2018). Eine besondere Bedeutung haben die zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten gebildeten Gap Junctions, da die Oligodendrozyten abhängig sind von der Unterstützung der Astrozyten, um ihren Nährstoffverbrauch adäquat zu decken und ihre Homöostase zu erhalten (BASU, SARMA, 2018). Die Gesamtheit der glialen Gap Junctions wird als pan-gliales Synzytium bezeichnet, dem eine Schlüsselrolle im Erhalt der Homöostase im ZNS zugeschrieben wird (FANG et al., 2018). Der Erhalt der Homöostase im ZNS gelingt durch die Verteilung von überschüssigen Kalium(K^+)-Ionen und Glutamat, die während neuronaler Aktivität gebildet werden. K^+ akkumuliert im periaxonalen Raum und wird über das astrozytäre Gap Junction Netzwerk umverteilt (BASU, SARMA, 2018; NAGY et al., 2004).

Studien haben gezeigt, dass sich die Expression von Connexinen bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen ändert und dadurch einen Einfluss auf die Gewebshomöostase hat. Dies ist auch in der *post mortem*-Analyse von MS Läsionen im ZNS zu entdecken. Es kommt zum Verlust von Cx47, Cx43 und Cx32 in akuten Läsionen, in chronischen Läsionen findet sich ebenfalls eine verminderte Expression von Cx47 und Cx32, es zeigt sich jedoch eine Hochregulation von Cx43 (PAPANEOPHYTOU et al., 2019).

2.5.2 Pannexine

Die Pannexinfamilie besteht aus drei Mitgliedern. Pannexin (Panx) 1 kommt ubiquitär im humanen Körper vor, Panx2 findet sich vor allem in neuralem Gewebe. Panx3 wird insbesondere in Knochen, Knorpel und Haut exprimiert, jedoch nicht im Nervensystem (BRUZZONE et al., 2003). Die einzelnen Pannexine unterscheiden sich in ihrer Struktur durch die Größe der C-terminalen Domäne, Panx1 und Panx3 ähneln sich dabei mehr als Panx2 (PENUELA et al., 2007; PENUELA et al., 2013). Pannexine sind in der Zellmembran in Form von Hexameren organisiert, wobei aktuelle Kryo-Elektronenmikroskopische Analysen für

Panx1 und auch Panx2 die Bildung von Heptameren nahelegen (DENG et al., 2020; ZHANG et al., 2023).

Die Pannexin-Kanäle ermöglichen den direkten Austausch von Signalstoffen zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Sie erlauben u.a. die Passage von Kalium, Calcium und Adenosintriphosphat (ATP) (BECKMANN et al., 2019; BRUZZONE et al., 2003). Ultrastrukturell konnte in Gefrierbrüchen transfizierter Zellen gezeigt werden, dass die Panx1-Kanäle nicht als Plaques zusammengelagert sind und einen größeren Kanalinnendurchmesser haben als Connexone (Beckmann et al 2019). Durch ausgeprägte Glykosylierungen an den extrazellulären Loops der Pannexine wird, vermutlich auch sterisch, die Zusammenlagerung zweier Kanäle benachbarter Zellen verhindert (BOASSA et al., 2008). Pannexine existieren in verschiedenen Konformationen und sind je nach Konformation sensibel für andere Stimuli. Aktivierende Stimuli sind niedrige Sauerstofflevel, Scherkräfte und mechanische Einflüsse, aber auch Protein-Protein-Interaktionen und ein Anstieg der Calcium (Ca^{2+})-Konzentration (DAHL, 2018).

Mittels Panx1 kommt es zur parakrinen Zellkommunikation, die durch Membrankanäle und der Freisetzung von Transmittern, wie zum Beispiel ATP, in den Extrazellulärraum vermittelt ist. Die Bindung von ATP an die ATP-sensitiven purinergen Rezeptoren P2Y und P2X resultiert im Ausstrom von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Die Freisetzung von Ca^{2+} bewirkt die Aktivierung weiterer Membrankanäle, was zur gesteigerten Freisetzung von ATP in den Extrazellulärraum führt und die Aktivierung von Membrankanälen in Nachbarzellen bewirkt. Dabei ist zu beachten, dass Panx1 Bestandteil des P2X7-Rezeptorkomplexes ist und so an der ATP-vermittelten Freisetzung von ATP beteiligt ist (THOMPSON et al., 2008). Des Weiteren interagiert Panx1 in hippocampalen Pyramidenzellen mit dem NMDA-Rezeptor und ist beteiligt an der Ca^{2+} -Homöostase, deshalb wird Panx1 eine Rolle in der Intensität von epileptischen Anfällen zugeschrieben (THOMPSON et al., 2008). Über die Freisetzung von ATP im Verbund mit verschiedenen Rezeptoren ist Panx1 beteiligt an der Regulation von Vasodilatation und Vasokonstriktion, der Signalweiterleitung aus den Geschmacksneuronen und an der Aufrechterhaltung der mukoziliären Reinhaltung der Lunge (PENUELA et al., 2013).

Panx1 ist aber nicht nur an der parakrinen Zellkommunikation beteiligt, sondern vermittelt auch zelluläre Prozesse. Über die Verbindung mit dem P2X7-Rezeptor initiiert Panx1 eine inflammatorische Reaktion, die über die Freisetzung des proinflammatorischen Interleukin-1 β vermittelt wird. Als Antwort auf die Stimulation des Rezeptors durch ATP wird das Enzym Caspase-1 aktiviert (PELEGRIN, SURPRENANT, 2006). Über ionotrope P2X7-Rezeptoren ist Panx1 beteiligt an der Weiterleitung von apoptotischen Zellsignalen, es vermittelt die Freisetzung von Nukleotiden aus apoptotischen Zellen, die der Rekrutierung von aktivierten Monozyten dienen. In diesem Fall werden die Rezeptoren durch Caspasen aktiviert, die zur

Öffnung des Panx1 Kanals führen und die Freisetzung von ATP und Uridintriphosphat (UTP) ermöglichen. Diese dienen als chemotaktische Signale für Phagozyten (CHEKENI et al., 2010). Viele dieser Veränderungen sind auch in der EAE abbildbar (FANG et al., 2018). In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Inhibierung des P2X7-Rezeptors und damit assoziiert die Blockade des Panx1 enthaltenden Komplexes die Entwicklung der EAE verhindern oder verlangsamen kann (ENDONG et al., 2011). Zudem kann eine Blockade des P2X7-Rezeptorkomplex eine positive Auswirkung auf viele neurodegenerative Erkrankungen haben (ZHENG et al., 2024). Dadurch entwickeln sich Pannexine zu einem spannenden Gebiet in der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der MS Therapie.

2.6. Therapeutische Ansätze

Zielpunkte in der Therapie der MS sind primär die Reduktion der Schubhäufigkeit, die Verkürzung der Schubdauer, die Minimierung der neurologischen Ausfälle und die Verhinderung der Progression.

Dabei unterscheidet sich die Therapie akuter Schübe von der Basistherapie: Im akuten Schub werden hochdosierte Steroide, intravenöse Immunglobuline und Plasmapherese eingesetzt. Unterstützend werden die Pharmaka Baclofen zur Verminderung der Spastizität, Dantrolen und Oxybutynin zur Verminderung der Inkontinenz, Pregabalin, Gabapentin und Carbamazepin gegen neuropathischen Schmerz und Propanolol gegen den Tremor gegeben, und um den Leidensdruck der Patienten im Schub zu vermindern (NAZISH et al., 2018). Die Basistherapie erfolgt entweder als immunmodulatorische und immunsuppressive Therapie. Immunmodulatorischen Therapien werden weniger Nebenwirkungen zugeschrieben, viele Patienten entwickeln jedoch im ersten Therapiejahr Resistenzen gegen die eingesetzten Wirkstoffe. Immunsuppressive Therapien haben einen deutlich aggressiveren Wirkmechanismus, mehr Nebenwirkungen und sind daher reserviert für einen besonders drastischen Verlauf (NAZISH et al., 2018).

Neben der medikamentösen Therapie ist es ein wichtiger Bestandteil des therapeutischen Regimes, die Patienten durch Physiotherapeuten, Neuropsychologen und Sozialarbeiter zu unterstützen. Besonders zu achten ist hierbei auf die frühzeitige Diagnose einer möglicherweise vorhandenen Depression, denn MS Patienten haben eine erhöhte Lebenszeitprävalenz für Depressionen sowie eine deutlich gesteigerte Suizidrate. Dies kann sich entweder durch zerebrale Entzündungsprozesse oder durch die Unsicherheiten und Einschränkungen im Lebensstil als Resultat der Erkrankung erklären lassen (MAKRIS et al., 2014).

Der erste krankheitsspezifische, immunmodulatorische Ansatz war die Einführung von Interferon beta ($INF\beta$) in das Therapieregime. Auf $INF\beta$ folgten $INF\beta 1a$, $INF\beta 1b$ und Glatiramacetat. Diese Wirkstoffe werden seit über 30 Jahren als Erstlinientherapie genutzt,

da sie ein besonders günstiges Nebenwirkungsspektrum aufweisen (TA, 2018). In den letzten Jahren wurde die Liste durch einige neue Medikamente ergänzt. Unterschieden wird dabei zwischen oralen und parenteralen Präparaten.

Die erste Zulassung nach $\text{INF}\beta$ und Glatirameracetat erhielt der $\alpha 4$ -Integrin-Inhibitor Natalizumab, ein monoklonaler Antikörper. Durch die Blockade des Integrins konnte die Entzündungsreaktion im ZNS erstmals erfolgreich unterdrückt werden (SELEWSKI et al., 2010). Zu beachten ist jedoch, dass eine schwerwiegende Nebenwirkung die Ausbildung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie ist. Deshalb wurden bestimmte Behandlungskriterien definiert (SABOL et al., 2017).

Ein weiterer Behandlungsansatz ist die Verwendung von Rituximab, einem CD20-Antikörper, der sich gegen CD20-positive B-Zellen richtet. Anlass für die Verwendung war die Kenntnis der Rolle der B-Lymphozyten an der Pathogenese der MS. Es zeigte sich jedoch, dass sich die gewünschten Effekte nur in Hinblick auf die Rückfälle der RRMS und Einschränkungsvorgangsamung bei jungen Patienten bei der PPMS einstellten (TA, 2018). Ein weiterer Antikörper ist Ocrelizumab, welcher sich ebenfalls gegen CD20 richtet und als intravenöse Infusion verabreicht wird. Zulassungen bestehen für die Nutzung bei PPMS und RRMS (SYED, 2018).

Ein weiteres immunmodulierendes Präparat ist Alemtuzumab, ein monoklonaler Antikörper, der an CD52-exprimierende Zellen bindet. Da diese Zellen CD52 exprimieren, kommt es zum Abbau von T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Eosinophilen. Alemtuzumab zeigte eine besonders lange Wirkpersistenz und eignete sich bei einem Großteil der Patienten gut als Monotherapie (TA, 2018). Betrachtet man den weiteren Krankheitsverlauf einer MS, erkennt man, dass Alemtuzumab neuroprotektiv wirkt und im Verlauf die Remyelinisierung fördert (HAO et al., 2021).

Cladribin kann oral verabreicht werden, ist ein Purin-Nukleosid-Analogon und hat einen zytotoxischen Effekt, der sich besonders auf Lymphozyten konzentriert. Durch die Induktion einer T- und B-Lymphozytopenie wirkt es antineoplastisch und immunsuppressiv (CERONIE et al., 2018).

Fingolimod ist ein Sphingosin-1-Phosphat Analogon. Sphingosin-1-Phosphat reguliert die Freisetzung von Lymphozyten aus lymphatischem Gewebe. Wenn Fingolimod statt des Sphingosin-1-Phosphats an den entsprechenden Rezeptor bindet, werden weniger autoaggressive Lymphozyten freigesetzt. Eventuell kommt es unter Fingolimod zur Induktion endogener Reparaturmechanismen und dadurch zur Verminderung der Neurodegeneration. Des Weiteren wirkt Fingolimod gegen glutamaterge Exzitotoxizität und dadurch neuroprotektiv (TA, 2018).

Teriflunomid ist der aktive Metabolit des Leflunomid und beeinflusst die Pyrimidinsynthese, dadurch indirekt die DNA-Synthese und hat so einen zytostatischen Effekt auf B- und T-Lymphozyten. Es kommt zur Blockade der inflammatorischen Kaskade (TA, 2018).

Dimethylfumarat hat immunmodulatorische, zytoprotektive Effekte. Es bewirkt die verminderte Bildung von T-Gedächtniszellen, T_H1 - und T_H17 -proinflammatorischen Zellen und führt zur vermehrten Bildung von T_H2 -antiinflammatorischen Zellen. Es schützt die neuronalen Stammzellen vor oxidativem Stress (BOMPRESZI, 2015; MILLS et al., 2018).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es bisher keine kurativen Ansätze auf dem Gebiet der MS-Therapie gibt und dass dies wahrscheinlich auch nicht möglich ist, bis die Pathomechanismen vollständig entschlüsselt sind.

Anhand der Wirkmechanismen und Ansatzpunkte der bisher genutzten Medikamente ist erkennbar, dass sich alle bisherig genutzten Therapien auf die Modulation und die Reduktion des Entzündungsgeschehens konzentrieren. Das Immunsystem und die dadurch vermittelte Entzündungsreaktion spielen zwar eine essenzielle Rolle in der Pathogenese der MS, jedoch primär in der initialen Phase. Nachdem die RRMS in die SPMS übergegangen ist, sind alle immunmodulatorischen Therapien nahezu ohne Wirkung, da Immunsystem-vermittelte Prozesse keine signifikante Rolle mehr in dem weiteren Fortschreiten der Erkrankung spielen. Es muss also in der Zukunft nach Therapien gesucht werden, die direkt an neuronalen Zellen ansetzen und ein protektives oder regeneratives Umfeld schaffen können, um so das weitere Vorschreiten der Erkrankung zu verhindern.

2.7. Probenecid

Probenecid (PBN) wird schon seit vielen Jahren erfolgreich in der Gichttherapie eingesetzt. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass durch Probenecid renale Anionentransporter inhibiert werden und dadurch die Wiederaufnahme der krankheitsverursachenden Harnsäure gehemmt wird (SILVERMAN et al., 2008). Probenecid wirkt jedoch nicht nur auf die renalen Anionentransporter, sondern auch auf purinerge Rezeptoren und kann dadurch die Freisetzung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Erythrozyten oder Adenosintriphosphat (ATP) aus Gliazellen blockieren (WEI et al., 2021).

Die für die Pathologie der MS wichtige T-Zellaktivierung wird über verschiedene Prozesse moduliert und initiiert. Ein wichtiger modulierender Faktor ist hierbei die Freisetzung von ATP (COMPSTON, COLES, 2008). Eingebunden in diesen Prozess sind purinerge Rezeptoren und Pannexine (HAINZ et al., 2016). Panx1 wurde als ATP-Kanal identifiziert (IGLESIAS et al., 2008). Durch die Assoziation mit dem purinergen P2X7-Rezeptor resultiert durch eine Panx1-vermittelte ATP-Ausschüttung die ATP-vermittelte Aktivierung des P2X7-Rezeptors (IGLESIAS et al., 2008). Panx1-Expression zeigt sich ubiquitär, unter anderem in Neuronen, Immunzellen, Makrophagen und T-Zellen. Eine vergleichende Studie untersuchte den Effekt

von PBN auf Panx1 Kanäle und auf Connexin-Kanäle. Dabei zeigte sich, dass PBN ein potenter Panx1-Inhibitor ist, aber keinen Einfluss auf die Connexin-Kanäle hat (SILVERMAN et al., 2008).

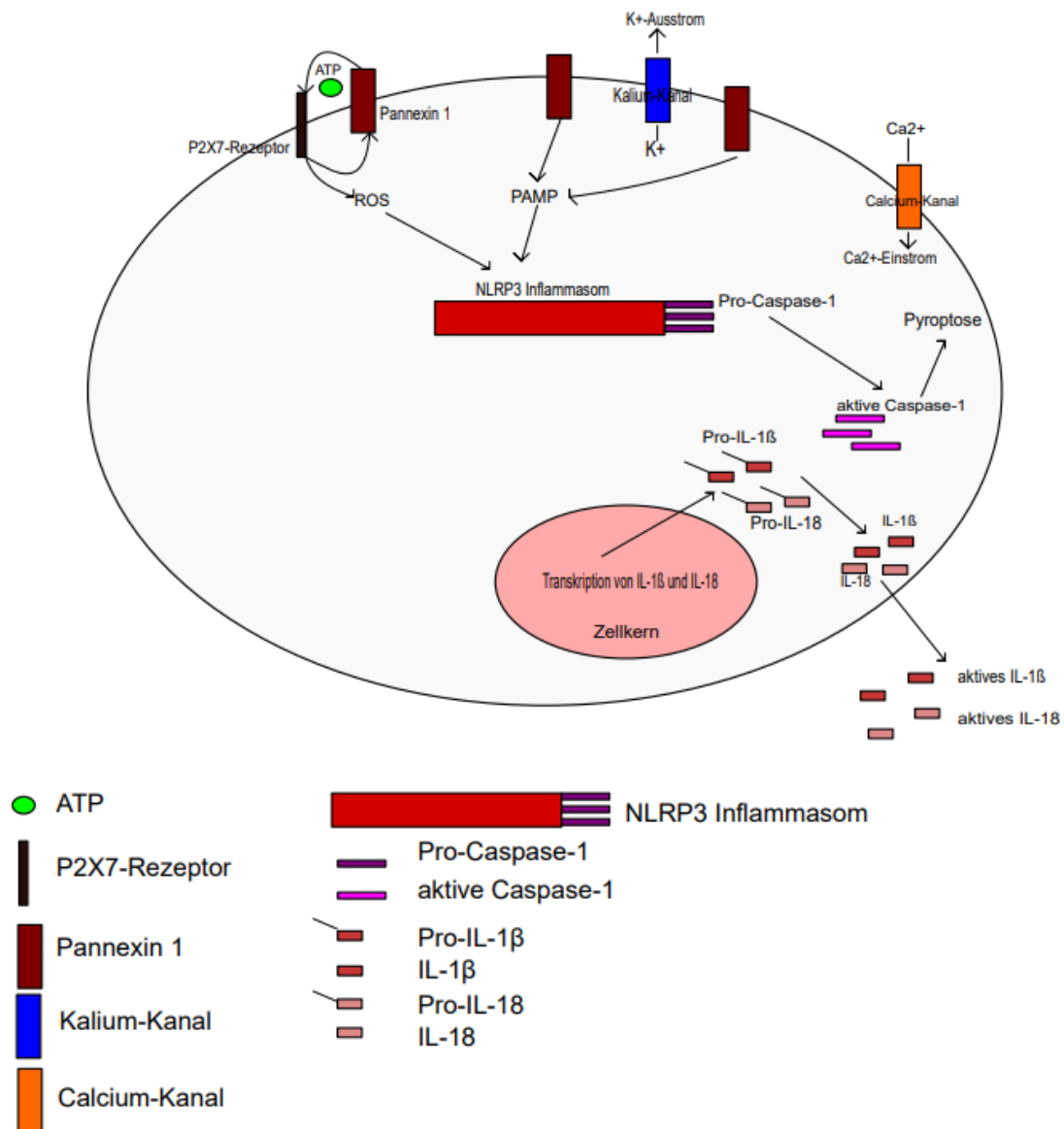


Abbildung 2: Verschiedene Aktivierungswege des Inflammasoms

Aktivierung des Inflammasoms durch Aktivierung von P2X7-Rezeptor mittels von Panx1 freigesetztem ATP, Downstream der Inflammasomaktivierung ist die Aktivierung und Freisetzung von IL-1β und IL-18 durch die aktive Caspase1 (modifiziert nach R&D Systems, Tools for Cell Biology research, Inflammasome Activation, Signaling Pathways)

PBN inhibiert jedoch nicht nur den Ausstrom von ATP an den Panx1-Kanälen der Zellmembran, sondern auch die ATP-vermittelte Aktivierung des Inflammasoms, das mit dem Panx1-Kanal in Verbindung steht. Dadurch wird IL-1β nicht durch Caspase-1 in seine aktive Form umgewandelt und kann so nicht an Entzündungsprozessen teilhaben (PELEGRIN, SURPRENANT, 2006). Durch verminderte IL-1β-Sekretion werden Zelltod und Ödembildung

vermindert. PBN kann also als effektiver Neuroprotektor betrachtet werden, weil Entzündungsprozesse in der Zelle durch die verminderte Bildung von aktivem $\text{IL-1}\beta$ und die verminderte Aktivität des Inflammasoms abgeschwächt werden (JIAN et al., 2016).

Appliziert man PBN Tieren, in denen einen EAE induziert wurde, sind durch diese kombinierte Wirkung Mikroglia-Aktivierung, ATP-Freisetzung, Monozyten-Rekrutierung und T-Zell-Einwanderung deutlich reduziert, Astrozyten sind lebendig und mehr Oligodendrozyten sind vorhanden. Dadurch, dass PBN BBB-gängig ist, kann es lokal an den Läsionen wirken und so eine regenerative Umgebung für neuronale Zellen schaffen (HAINZ et al., 2017).

Zu beachten ist jedoch, dass PBN nicht nur einen modulierenden Einfluss auf Zellen des Immunsystems hat, sondern auch Einfluss auf neurale Zellen nehmen kann, da hier ebenfalls Panx1 exprimiert wird (HAINZ et al., 2018). Zusammenfassend ist zu sagen, dass die duale Wirkung von PBN auf Immunzellen und Oligodendrozyten zusammenhängt mit einer Reduktion aktivierter Mikroglia und dadurch einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine (HAINZ et al., 2016). PBN kann eine große Bedeutung in der weiteren Forschung an neuen Therapien für MS zugeschrieben werden (HAINZ et al., 2017).

3. Hypothese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese verfolgt, dass sich in der Frühphase der EAE Pathologien im optischen Nerv ultrastrukturell darstellen lassen. Dazu wurden Ultradünnschnitte optischer Nerven von EAE und Sham-Tieren elektronenmikroskopisch vergleichend untersucht. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob es im Rahmen der Induktion einer EAE zu Infiltration der Nn. optici durch Makrophagen und Lymphozyten mit daraus resultierenden Schäden im Sinne einer Demyelinisierung kommt. In einem zweiten Teil wurde der Hypothese nachgegangen, dass Probenecid, ein Panx1 Inhibitor einen Einfluss auf den MS-assoziierten Untergang von Oligodendrozyten im optischen Nerv hat.

In einem Tiermodell der MS, der EAE, konnte in vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass durch die Inhibierung von Panx1 mittels Probenecid ein signifikanter Einfluss auf den Verlauf der EAE genommen werden kann. Da Panx1 die Freisetzung von ATP ermöglicht und mit dem Inflammasom in Verbindung steht, wurde postuliert, dass Probenecid durch die Inhibierung von Panx1 einen Einfluss auf die inflammatorische Komponente der EAE nehmen kann. Bei präventiver Gabe von PBN konnte das Einsetzen der Symptomatik der EAE durch die Gabe von Probenecid verhindert werden. Bei therapeutischer Gabe erfolgte eine Stabilisation der klinischen Symptomatik. Die Probenecid-behandelten Tiere wiesen eine geringere Mikrogliaaktivierung und erhöhte Zahlen an Oligodendrozyten im Rückenmark auf (HAINZ et al., 2017).

Die vorliegende Arbeit soll der Hypothese nachgehen, dass die Applikation von Probenecid auch die EAE-Pathologie im N. opticus beeinflusst. Dazu wird ein besonderes Augenmerk gelegt auf die Analyse der Oligodendrozyten im N. opticus. Dabei ist Hypothese, dass die Probenecid-Behandlung in einem verminderten Untergang der Oligodendrozyten resultiert. Mittels Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten der Nn. optici von Probenecid-behandelten und nicht behandelten EAE-Tieren soll die Hypothese analysiert werden.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien

Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Benzdimethylamine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bleinitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI-Fluoromount-G Eindeckmedium	Southern Biotech, Eching, Deutschland
Dodenyl Succinic Anhydride	Science Services GmbH, München, Deutschland
Eisessig (Essigsäure)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
EM bed-812 Einbettmedium	Science Services GmbH, München, Deutschland
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Zentrales Chemikalienlager
Fresubin Trinknahrung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Hämatoxilin (nach Ehrlich)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Zentrales Chemikalienlager UKS
Hooke Kit™ EK 2110	Hooke Laboratories, Inc., Lawrence, USA
Immersionsöl NF 50cc	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Grüssing, Filsum, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Zentrales Chemikalienlager UKS
Ketavet (100mg/ml)	Pfizer, Berlin, Deutschland
Kupfer Grid 1.2 Schlitznetze	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Luxol-Fast-Blue (LFB)	ARCOS Organics, Nidderau, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nadic Methyl Anhydride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcacodylat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Normales Ziegenserum (NGS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Objekträger	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Parafilmpapier	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pioloform	Kuraray Europe GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Probenecid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rinderserumalbumin (bovine serum albumin;BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Rinderalbumin-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rompun (2%)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Roti-Histokitt Eindeckmedium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotihistol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Standardnagerfutter	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Europe, Staufen, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Uranylessfertiglösung	Science Services GmbH, München, Deutschland
Xylol	Zentrales Chemikalienlager UKS

4.2. Geräte und Materialien

Hera Safe KS	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
DAKO Pen	DAKO, Hamburg, Deutschland
Diamantmesser	DiAtome, Hartfield, USA
Fluoreszenzmikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Gefrierschrank -20°C, Froster-Lab	Phillip Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Gefrierschrank -80°C, HERA freeze	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
Halogenlampe (HXP 120C)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Isofluran Verdampfer	Harvard Instruments, Massachusetts, USA
Kamera (ORCA-D2)	Visitron Systems, Puchheim
Kryostat Leica CM1950	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Leica EM UC7 Ultramikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM2500	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera Bresser MikroCam II	Bresser GmbH, Rhede, Deutschland
Power Supply PeqPower 250	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Power Supply PeqPower 300	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo, Zwingenberg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop Technai G ²	FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA
Streckblättchen	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge Biofuge Primo R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge Fresco 17	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge: himac CT15RE	Hitachi, Düsseldorf, Deutschland
Zentrifuge: Megafuge 16R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

4.3. Verbrauchsmaterialien

Einbett-Formen Cryomold	Polysciences, Inc., Eppelheim, Deutschland
Dako Pen	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Deckgläser 24x60mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Diamantmesser Diatome ultra	Science services, München, Deutschland
FluoVac-Filter	Harvard Instruments, Massachusetts, USA
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotomklinge	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Rasierklinge	Science Services, München, Deutschland
Streckblättchen	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

4.4. Software

AxioVision	SE64 Rel. 4.8, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Endnote X6.0.1	Thomson Reuters, Frankfurt am Main, Deutschland
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA
ImageJ	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Servier Medical Art	Servier Laboratoires, Suresnes, Frankreich
Inkscape	Free Software Foundation Inc., Boston, USA

4.5. Lösungen

4.5.1. 10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Chemikalie	Menge
NaCl	100 g
KCl	2,5 g
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	7,12 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g

in 800 ml Aqua dest. lösen, pH auf 7,4 einstellen, auf 1 l auffüllen

4.5.2. 0,2% Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine, BSA)

Chemikalie	Menge
Rinderalbumin (BSA), 35% Lösung (34,4 g/dL)	0,57 ml
1x PBS	ad 100 ml

4.5.3. Luxol-Fast-Blue

Chemikalie	Menge
LFB-Pulver	0,8 g
Ethanol	400 ml
Essigsäure 10%	2 ml

4.5.4. Lithium-Carbonat-Lösung (1%)

Chemikalie	Menge
Lithium-Carbonat (Li ₂ CO ₃)	2 g
Aqua dest.	ad 200 ml

4.5.5. Sulfitwasser (SO₂-H₂O)

Chemikalie	Menge
Leitungswasser	100 ml
1N Salzsäure (HCl)	5 ml
Kaliumpyrosulfit (K ₂ S ₂ O ₅), 10%-Lösung in H ₂ O	5 ml

4.5.6. Normales Ziegen Serum 10% (Normal Goat Serum, NGS)

Chemikalie	Menge
Normales Ziegen Serum (NGS)	10 ml
0,1 % Triton X100	100 µl
1 x PBS	ad 100 ml

4.5.7. Sørensens Phosphatpuffer

Chemikalie	Menge
NaH ₂ PO ₄	3,6 g
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	21,36 g
Aqua bidest.	ad 1l

pH soll 7,4 sein

4.5.8. Probenecid-Injektionslösung

Chemikalie	Menge
Probenecid	375 mg
1 M NaOH Lösung	1450 µl
1 M Tris-HCL Lösung, pH 4,0	1550 µl
NaCl 0,9%	11 ml
Verdünnte Salzsäure (HCL, 5%)	

pH soll zwischen 7,3 und 7,4 liegen, dazu Probenecid abwiegen und in 1M NaOH in Lösung bringen, anschließend mit Tris-HCl abpuffern, 11ml 0,9% NaCl dazugeben, pH-Wert mit 5% HCl zwischen 7,3 und 7,4 einstellen, mit 0,9% NaCl auf Endvolumen (15mL) auffüllen

4.5.9. Solvent-Injektionslösung

Chemikalie	Menge
1 M NaOH-Lösung	450 µl
1 M Tris-HCL-Lösung, pH 4,0	2550 µl
NaCl 0,9%	12 ml

pH soll zwischen 7,3 und 7,4 liegen

4.6. Tierexperimentelle Arbeiten

4.6.1. Versuchstierhaltung

Die Versuche wurden an C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden während des Versuchs in der Versuchstierhaltung des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes gehalten, nachdem sie im Alter von 10-12 Wochen von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Das Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes hatte die Haltung der Tiere und den Tierversuch (Tierversuchsnummern: 05/2013, 24/2018) genehmigt.

Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Ein Lichtprogramm imitierte einen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus in dem Haltungsraum. Standardfutter und Trinkwasser stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung.

4.6.2. Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Zur Induktion der EAE wurden 12 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse mit dem Kit EK-2110 (Hooke, Massachusetts USA) nach Anweisungen des Herstellers immunisiert. Die Induktion der EAE erfolgte nach einer mindestens siebentägigen Akklimatisierungszeit in der Tierhaltung und die Injektionen erfolgten unter Isofluran-Narkose (2% Isofluran in reinem Sauerstoff als Trägergas). Zur Immunisierung wurden insgesamt 200µl MOG-Emulsion (MOG Peptid Aminosäure 35-55 und Freund's Adjuvans) subcutan injiziert, dabei wurden je 100µl in den oberen und unteren Rücken appliziert. Vier Stunden sowie weitere 24 Stunden später wurden je 200µl Pertussis Toxin Lösung (250 ng PTX in 200 µl NaCl) i.p. injiziert, um die Immunantwort weiter zu verstärken. Im Anschluss wurden die Tiere mindestens einmal täglich auf ihr Allgemeinbefinden und auf Anzeichen für klinische Symptome, die als sogenannte Score-Werte angegeben werden, untersucht (s. Kapitel 4.6.4). Die Tiere wurden täglich gewogen. Bei Erreichen von Score 1,5 (s.u.) wurden die Käfige mit neurologischen Matten, Wasserkissen und Trinknahrung ausgestattet. Als vorzeitige Abbruchkriterien wurden a) eine beginnende Vorderbeinparese bzw. eine schwere Ataxie entsprechend Score 3,5 oder b) ein Gewichtsverlust > 20% definiert.

Wenn eine einseitige Parese der Hinterbeine, also Score 2, bei den Tieren eingetreten war, wurden die Mäuse in vier randomisierte Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt keine Behandlung (EAE-Gruppe; n=3). Die zweite Gruppe erhielt für die Dauer von 20 Tagen täglich eine i.p. Injektion mit PBN-Lösung (250mg/kg Körpergewicht in NaCl; siehe 4.5.8) (PBN-Gruppe; n=3). Die dritte Gruppe erhielt eine i.p. Injektion des Lösungsmittels (Solvent-Gruppe; n=3). Die vierte Versuchsgruppe wurde bereits bei Erreichen von Score 2 euthanasiert (Score 2-Gruppe; n=3), damit ein Vergleich mit der Ausgangssituation der anderen Mäuse möglich war. Die fünfte Gruppe bestand aus Mäusen gleichen Alters und gleichen Geschlechtes, bei

denen keine EAE induziert wurde (Kontroll-Gruppe; n=5). Nach 20 Tagen oder bei Erreichen der vordefinierten Abbruchkriterien (s.o.; Erreichen von Score 3,5, Gewichtsverlust >20%) wurden die Mäuse euthanasiert (siehe 4.6.5); danach wurden die Nn. optici entnommen und analysiert.

4.6.3. Score Einteilung

Die klinische Ausprägung der Symptome wurde täglich kontrolliert und entsprechend der folgenden Kriterien sogenannten Scores (MANGALAM et al., 2017) zugeteilt:

Score	Symptome
0	keine sichtbaren Symptome
0,5	Parese der Schwanzspitze
1	Parese des gesamten Schwanzes
1,5	Parese des gesamten Schwanzes und leichte Schwäche der Hinterbeine
2	einseitige schwere Hinterbeinparese
2,5	beidseitige schwere Hinterbeinparese
3	beidseitige komplette Hinterbeinparalyse
3,5	beidseitige komplette Hinterbeinparalyse und Schwäche des Vorderbeins, oder schwere Ataxie mit Unvermögen zu laufen
4	Lähmung aller 4 Extremitäten
5	Tod der Tiere

Tabelle 1: Score-Einteilung

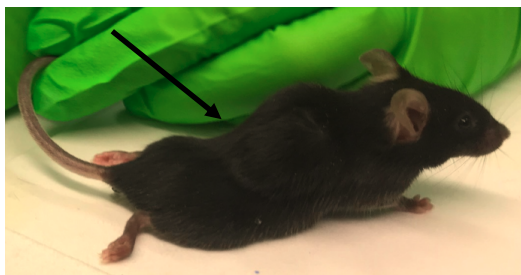


Abbildung 3: Maus mit beidseitiger kompletter Hinterbeinparalyse

Dargestellt ist eine Maus mit beidseitiger kompletter Hinterbeinparalyse entsprechend einem Score 3. Charakteristisch ist die durchhängende Wirbelsäule im Lumbalbereich (siehe Pfeil).

4.6.4. Organentnahme

Vor der Organentnahme erfolgte die Narkotisierung der Tiere mit einer intraperitonealen Ketavet/Rompun-Injektion (100 mg Ketaminhydrochlorid pro kg Körpergewicht und 10 mg Xylazin pro kg Körpergewicht). Erfolgte keine Reaktion mehr auf die Reflexprüfung, wurden die Tiere getötet und mit der Organentnahme begonnen. Die entnommenen Nn. optici wurden in OCT Tissue Tek Freezing Medium eingebettet und sofort in der Gasphase flüssigen Stickstoffs durchgefroren. Im Anschluss wurden die Gewebeproben bei -80°C gelagert.

4.7. Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung der Serienschnitte in einer Dicke von 7-10 µm wurde der Kryostat Leica CM1950 genutzt. Die Schnitte wurden bei -20°C angefertigt, im Anschluss auf Superfrost Plus Objektträger aufgenommen und für 30 Minuten auf einer Wärmeplatte bei 38°C - 45°C getrocknet. Die Lagerung erfolgte im Anschluss bei Raumtemperatur für maximal zwei Wochen.

Die Schnitte wurden in 10er Serien angefertigt, exemplarisch befanden sich also auf dem Objektträger 1 die Schnitte 1, 11, 21, und 31.

4.8. Histologische Färbungen

4.8.1. Hämatoxylin- Eosin

Zur Übersichtsdarstellung des Gewebes wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) nach Ehrlich durchgeführt. Hierbei wird das Zytoplasma durch den Farbstoff Eosin rot dargestellt, während der Farbstoff Hämatoxylin die Zellkerne blau färbt.

Zu Beginn der Färbung wurden die bei Raumtemperatur gelagerten Schnitte für fünf Minuten in -20°C kaltem Ethanol (100%) in einer vorgekühlten Küvette fixiert. Im Anschluss erfolgte ein zweiminütiger Waschschrift in Aqua dest.

Es folgte eine fünfminütige Inkubation in Hämatoxylin nach Ehrlich (saures Hämatoxylin) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült, um überschüssige Farbreste zu entfernen, und danach zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut, um den Farbumschlag des Hämatoxylins zu bewirken. Einem erneuten Waschschrift in Aqua dest. (einmal Eintauchen), folgte eine zehneckündige Inkubation in Eosin nach Ehrlich (0,1% Eosin in Aqua dest.; w/v) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Diese dient der Färbung des Zytoplasmas. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut in Aqua dest. gespült, um überschüssige Farbreste zu entfernen.

Die Entwässerung der Schnitte erfolgte für drei Minuten in 80% 2-Propanol in Aqua dest. (v/v), anschließend erfolgte die Kontrolle, ob das Rot die gewünschte Intensität erreicht hatte. Die Entwässerung wurde für sechs Minuten in 90% 2-Propanol in Aqua dest. (v/v), zwei Mal für fünf Minuten in 100% 2-Propanol und drei Mal für fünf Minuten in Xylol fortgesetzt. Zum Abschluss erfolgte das Eindecken mittels wasserfreiem Roti Histokit Eindeckmedium (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und die Aushärtung über Nacht.

4.8.2. Luxol-Fast-Blue

Die Luxol-Fast-Blue-Färbung (LFB) wurde genutzt, um den Grad der Demyelinisierung darzustellen. Myelin erscheint in dieser Färbung türkis, die Neurone violett.

Die Fixierung der bei Raumtemperatur gelagerten Kryoschnitte erfolgte bei -20°C für zehn Minuten in 100% Ethanol in einer vorgekühlten Küvette und für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 96% Ethanol in Aqua dest. (v/v). Im Anschluss wurden die Schnitte in einer mit Parafilm verschlossenen Küvette in 0,1% LFB (w/v) -Lösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Daraufhin erfolgte ein Waschschrift durch dreimaliges Eintauchen in Aqua dest. Die Differenzierung der Schnitte erfolgte durch Inkubation in 0,05% Lithium-Carbonat in Aqua bidest. (w/v) für drei Sekunden und durch zehnekündiges Schwenken in 70% Ethanol (in Aqua dest.). Im Anschluss wurde in Aqua dest. geschwenkt. Die Schnitte wurden für eine Minute und 20 Sekunden in Hämatoxylin nach Ehrlich inkubiert und in Aqua dest. abgespült; das Bläuen der Schnitte erfolgte für fünf Minuten in Leitungswasser.

Das Entwässern der Schnitte erfolgte zwei Mal für zwei Minuten in 96% Ethanol (in Aqua dest.), zwei Mal für zwei Minuten in 100% Ethanol und drei Mal für zwei Minuten in 100% Xylol. Die Schnitte wurden mit wasserfreiem Roti Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt und über Nacht ausgehärtet.

4.8.3. Perjod Säure Schiff Reaktion

Die Perjod Säure Schiff (periodic acid - Schiff reaction; PAS) - Reaktion wurde zur Darstellung kohlenhydrathaltiger Substanzen, wie zum Beispiel Glykoproteine und Glykolipide, genutzt. Diese finden sich gehäuft im Myelin, so dass es in der Färbung pink erscheint. Die Zellkerne sind blau dargestellt.

Zunächst wurden die bei Raumtemperatur gelagerten Schnitte in Ethanol (100%) bei -20°C für fünf Minuten fixiert. Im Anschluss an zwei Waschschrift in Aqua dest. erfolgte die Inkubation in einprozentiger Perjodsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für fünf Minuten. Es folgten zwei weitere Waschschrift in Aqua dest. Die Inkubation in Schiff-Reagenz (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte für eine Stunde im Dunkeln. Die Schnitte wurden drei Mal für fünf Minuten in SO₂-Wasser gespült, im Anschluss wurden sie für fünfzehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Eine Inkubation in Hämatoxylin nach Ehrlich (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte für zwanzig Sekunden, die zwei anschließenden Waschschrift erfolgen in Aqua dest. Darauf folgte ein zehnminütiges Bläuen der Schnitte in Leitungswasser und ein weiterer Waschschrift in Aqua dest. Im Anschluss durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Ethanolreihe (70% EtOH in Aqua dest. fünf Minuten, 80% EtOH in Aqua dest. fünf Minuten, 90% EtOH in Aqua dest. fünf Minuten, 100% EtOH drei Mal fünf

Minuten, 100% Xylol drei Mal fünf Minuten) und wurden abschließend mit wasserfreiem Roti Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt und über Nacht ausgehärtet.

4.8.4. Semiquantitative Auswertung der histologischen Färbungen

Um das in den LFB- und PAS-Färbungen dargestellte Myelin zu quantifizieren, wurde ein semiquantitatives Bewertungssystem erstellt. Dafür wurden zunächst mit dem Leica DM2500 Lichtmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), sowie der Bresser MikroCam II Mikroskopkamera (Bresser GmbH, Rhede, Deutschland) Bilder der Nn. optici aufgenommen. Als Schädigung wurden Bereiche der Demyelinisierung definiert: Da sich in der LFB-Färbung Myelin türkis darstellt, wurden hierbei die Bereiche beurteilt, die eine weniger intensive Türkisfärbung aufwiesen. Durch die Pinkfärbung von Glykoproteinen und Glykolipiden in der PAS-Färbung wurden hier die Bereiche beurteilt, die eine weniger intensive Pinkfärbung aufwiesen.

Bewertung	Grad der Schädigung entsprechend Fläche mit hypointenser Färbung
0	keine Schädigung bis <10% der Fläche
1	11-40% der Fläche
2	41-70% der Fläche
3	71-100% der Fläche

Tabelle 2: Semiquantitatives Bewertungssystem für die LFB- und PAS-Färbung

Um die in der H.E.-Färbung durch die vermehrte Darstellung blau gefärbter Zellkerne erkennbare Zellinfiltration zu quantifizieren wurde ein semiquantitatives Bewertungssystem erstellt.

Bewertung	Grad der Infiltration
0	keine Infiltration
1	beginnende Infiltration an den Rändern des Nervs
2	10-30 % der Fläche infiltriert
3	mehr als 30% der Fläche infiltriert

Tabelle 3: Semiquantitatives Bewertungssystem für die Zellkernzahl in der H.E.-Färbung

Um eine Voreingenommenheit zu vermeiden, erfolgte die Auswertung anhand der oben beschriebenen Scores verblindet durch zwei Personen.

4.9. Immunhistochemische Färbungen

Die Fixierung der Schnitte erfolgte für zehn Minuten unter für den jeweiligen Primärantikörper spezifischen Konditionen (siehe Tabelle 5). Anschließend wurde drei Mal für zehn Minuten in 1xPBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10% (v/v) Ziegen Serum (Normal Goat Serum; NGS) und 0,1% (v/v) Triton X 100 in 1xPBS.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in Blockierlösung (siehe Tabelle 5). Die Inkubation erfolgte für 16 Stunden bei 4°C bzw. bei Raumtemperatur (für anti-Olig2 und anti-Cx29) in einer feuchten Kammer.

Nach 16 Stunden erfolgten drei zehnmütige Waschschrirte in 1xPBS. Die anschließende Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte in 0,2% Rinderalbumin (BSA) in 1xPBS (v/v). Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 5) erfolgte in der Blockierlösung für 45 bis 90 min je nach gewähltem Antikörper (siehe Tabelle 5) im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Nach zwei weiteren zehnmütigen Waschschrirten in 1xPBS wurden die Schnitte mit DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Eching, Deutschland) eingedeckt. Die Zellkerne wurden so mittels des im Eindeckmedium enthaltenen Farbstoffes DAPI angefärbt.

4.9.1. Verwendete Antikörper

Primär-antikörper	Hersteller	Quelle	Verdünnung	Fixierung	Inkubation des Primär-antikörpers	Inkubation des Sekundär-antikörpers
Anti-CD3	Dako 20032385 (Hamburg, Deutschland)	Kaninchen	1:100	-20°C, Aceton	16 Stunden, 4°C	60 Minuten
Anti-CD68	Abcam 53444 (Cambridge, Großbritannien)	Ratte	1:1000	-20°C, Aceton	16 Stunden, 4°C	60 Minuten
Anti-Oligodendrozyten spezifisches Protein	Abcam 53041 (Cambridge, Großbritannien)	Kaninchen	1:200	-20°C Methanol	16 Stunden, 4°C	60 Minuten
Anti-Olig2	Abcam 109186 (Cambridge, Großbritannien)	Kaninchen	1:200	Raumtemperatur, 4% PFA in PBS	16 Stunden, Raumtemperatur	60 Minuten
Anti-Cx29	Zymed 34-4200 (Waltham, USA)	Kaninchen	1:200	-20°C, Aceton	16 Stunden, Raumtemperatur	90 Minuten
Anti-Cx47	Invitrogen 36-4700 (Darmstadt, Deutschland)	Kaninchen	1:100	-20°C, Ethanol	16 Stunden, 4°C	45 Minuten
Anti-Neurofilament (medium+heavy, 160-200Da)	Invitrogen 36-4700, (Darmstadt, Deutschland)	Maus	1:100	20°C, Methanol	16 Stunden, 4°C	60 Minuten

Tabelle 4: Primärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Quelle	Verdünnung
Alexa-Fluor 568 nm	Invitrogen A11011 (jetzt Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland)	Ziege-anti-Kaninchen	1:3000
Alexa-Fluor 568 nm	Invitrogen A11077 (Karlsruhe, Deutschland)	Ziege-anti-Ratte	1:3000
Alexa-Fluor 488 nm	Invitrogen A11001 (Karlsruhe, Deutschland)	Ziege-anti-Maus	1:3000

Tabelle 5: Sekundärantikörper

4.10. Bildaufnahmen

4.10.1. Bildanalyse der Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) wurden Immunfluoreszenz-markierte Areale quantifiziert. Diese Art der Auswertung wurde genutzt für OSP-, CD68-, Cx29- und Cx47-Immunfluoreszenzen. Dazu wurden zunächst mittels des Fluoreszenzmikroskops Observer Z.1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland; Vergrößerung x20) Bilder der Nn. optici aufgenommen (Axiovision, Oberkochen, DE, Carl Zeiss Microscopy Deutschland). Die eigentliche Auswertung erfolgte an exportierten jpg-Dateien mittels Flächenmessung über das Programm ImageJ. Das farbige Bild wurde zur Auswertung zunächst in ein Schwarz-Weiß-Bild (8 bit) umgewandelt. Anschließend wurde ein Schwellenwert festgelegt, der das im farbigen Bild gezeigte Signal bestmöglich abbildete. Alle Fluoreszenz-markierten Stellen wurden schwarz angezeigt, während der Hintergrund weiß erschien. Die Berechnung des prozentualen Anteils der markierten Areale auf die gesamte Bildfläche erfolgte zur Quantifizierung der Fluoreszenz-markierten Fläche.

Die Analyse der CD3 und Olig2 Färbungen erfolgte durch Auszählen der immunmarkierten Zellen pro Bild. Im Anschluss wurde die Fläche des N. opticus mittels eines Freihandtools ermittelt und, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen, die Anzahl positiver Zellen/ μm^2 bzw. pro mm^2 errechnet.

4.11. Transmissionselektronenmikroskopie

4.11.1. Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und Behandlung der Kontrollgruppe (Sham)

Die Versuche wurden an Mäusen durchgeführt, die während des Versuchs in der Versuchstierhaltung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes gehalten wurden. Das Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes hatte Haltung der Tiere und den Tierversuch genehmigt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Ein Lichtprogramm imitierte einen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus in dem Haltungsraum. Standardfutter und Trinkwasser stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung.

Die Tiere wurden in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt und nach unterschiedlichen Protokollen immunisiert. Die erste Versuchsgruppe wurde als EAE-Gruppe bezeichnet, die zweite als Sham-Gruppe. Ziel dieses Versuchs war es die frühen Schäden vor dem Einsetzen der klinischen Symptomatik im N. opticus zu untersuchen. Die Induktion der EAE erfolgte wie unter 4.6.2. beschrieben. Zudem erfolgte die Behandlung einer Sham-Gruppe, um die durch PTX und Adjuvans ausgelöste Immunantwort beobachten zu können. Der Sham-Gruppe wurde mit der Hooke-Kontroll-Kit (CK-2110) injiziert. Die Immunisierung folgte dem Protokoll des Hooke-Kit EK-2110, mit dem Unterschied, dass dem Freund's Adjuvans kein Antigen beigemischt

wurde. Nach abgeschlossener Immunisierung wurde jeweils ein Tier der Sham-Gruppe euthanasiert, wenn ein Tier aus der EAE-Gruppe den Abbruch-Score (1,5) erreicht hatte. Die Nn. optici wurden entnommen und zur elektronenmikroskopischen Analyse aufgearbeitet. Im Anschluss wurde das Gewebe bei 4°C gelagert.

4.11.2. Perfusion der Versuchstiere

Nach der Narkotisierung mit einer intraperitonealen Ketavet/Rompun-Injektion (100 mg Ketaminhydrochlorid pro kg Körpergewicht und 10 mg Xylazin pro kg Körpergewicht) und negativer Reflexprüfung wurden die Mäuse mittels gepufferter 2%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung perfundiert. Dazu wurden 2g PFA eingewogen und in 100ml Sørensens Phosphatpuffer (0,15-molar) (SPB) einem 70°C Wasserbad eingerührt, bis die Lösung vollständig klar ist. Im Anschluss erfolgte die Überführung in 1% Glutaraldehyd mit 1%ige PFA-Lösung bis zur weiteren Verarbeitung. Dazu wurde 25%ige-Glutaraldehyd-Lösung (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) und 32%ige-Paraformaldehyd-Lösung (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in 0,1M Cacodylatpuffer (s.u.) verdünnt.

4.11.3. Epon-Einbettung

Zur Einbettung in Epon nach Luft (1961) und Glauert (1975) wurde zunächst ein 0,1 M Cacodylat-Puffer hergestellt. In diesem wurden die Nn. optici nach der Entnahme aus den perfundierten Tieren bei 4°C gelagert. Zur Herstellung des Puffers wurden zunächst 42,8 g Natriumcacodylat in 250 ml Aqua bidest. gelöst. Zur pH-Wert Einstellung wurde 0,1 N Salzsäure genutzt, der Ziel-pH-Wert lag dabei zwischen 7,4 und 7,6. Im Anschluss wurde die Lösung mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt und filtriert.

Zur Herstellung der Epon-Fertigmischung wurden zwei Stammlösungen benötigt. Stammlösung A wurde aus 116 ml Dodecyl Succinic Anhydride und 72,33 ml EM bed-812 angesetzt. Stammlösung B wurde aus 100 ml EM bed-812 und 89 ml Nadic Methyl Anhydride angesetzt. Stammlösung A und B wurden in einem Verhältnis von 1:1 miteinander gemischt. Diese Mischung wurde 5:1 mit Benzydimethylamine vermengt.

Am ersten Tag der Einbettung wurden die Nerven viermal für zehn Minuten in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden sie zur weiteren Fixierung für vier Stunden in 2%ige Osmiumlösung (w/v) gestellt. Im Anschluss wurden die Proben viermal für fünf Minuten in Aqua dest. gewaschen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die entstandenen Osmium-Abfälle wurden mit gesättigter Ascorbinsäure-Lösung in 70% Methanol neutralisiert und entsorgt. Am zweiten Tag erfolgte die Entwässerung der Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe. Zunächst wurde dreimal für fünf Minuten in 70% Ethanol entwässert, dann jeweils einmal für 30 Minuten in 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol. Im Anschluss wurde weitere dreimal für 30 Minuten in 100% Aceton entwässert. Danach wurden die Nerven jeweils

für eine Stunde in eine 3:1 Aceton-Epon-Mischung und anschließend in eine 1:1 Aceton-Epon Mischung eingelegt. Über Nacht erfolgte die Inkubation in einer 1:3 Aceton-Epon-Mischung. Am dritten Tag der Einbettung wurden die Proben für eine Stunde bei 40°C in reinem Epon und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in reinem Epon gelagert. Zum Abschluss erfolgte die Ausrichtung der Proben in mit Epon gefüllten Einbettförmchen. Die eingebetteten Proben wurden für mindestens 48 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank auspolymerisiert.

4.11.4. Herstellung der Ultradünnschnitte

Die auspolymerisierten Epon-Blöcke wurden zunächst mit einer Rasierklinge angetrimmt. Bei 6° Schneidewinkel (45° Messerwinkel) erfolgte an einem Leica EM UC7 Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) das Zuschneiden der Proben. Die Schnitte wurden mit einem Diamantmesser (DiAtome Itra, Hatfield, USA) in einer Schnittdicke von 65-68nm angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden auf Pioloform-beschichtete 1x2mm-Kupfer-Schlitznetze (Plano, Wetzlar, Deutschland) aufgezogen. Zur Beschichtung der Netze erfolgte die Herstellung des Films mit 1,3% Pioloform-Lösung (w/v) in Chloroform. Dieser wurde im Anschluss auf die Grids gelegt und in einer Petrischale getrocknet.

4.11.5. Kontrastierung der Grids

Zur Kontrastierung der Ultradünnschnitte wurden Uranyless- und Bleicitrat-Fertiglösungen (Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, PA, USA) verwendet. Die Ultradünnschnitte auf den mit einer Metallschleife weitergeführten Grids wurden für sechs Minuten auf einzelnen Uranyless-Tropfen kontrastiert und im Anschluss in vier Tropfen Aqua dest. gewaschen. Der zweite Schritt der Kontrastierung erfolgte für drei Minuten auf einzelnen Tropfen Bleicitrat, im Anschluss wurden die Grids ebenfalls in vier Tropfen Aqua dest. gewaschen und zuletzt bei Raumtemperatur getrocknet.

4.11.6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Pro Tier wurden vier elektronenmikroskopische Bilder der Nn. optici-Querschnitte in 2250-facher Vergrößerung am Technai G² Transmissionselektronenmikroskop (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) aufgenommen. Im Anschluss wurde mittels Image J der axonale Innendurchmesser ermittelt.

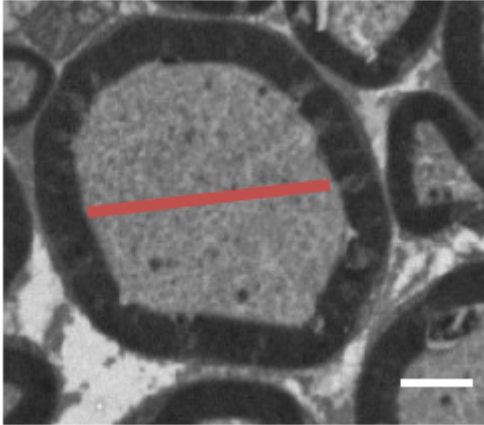


Abbildung 4: Beispielhafte Ausmessung des axonalen Innendurchmessers

Dargestellt ist ein Axon im Querschnitt, Maßstab entspricht 3 μm . Es zeigt sich das Axon zentral hellgrau, sowie die dunkelgrau gefärbte Myelinschicht. Der rote Balken zeigt exemplarisch die Messlinie am größten Durchmesser des Axons.

Zur Auswertung der in ImageJ gemessenen Werte wurde anhand der Innendurchmesser, die im Sham-Tier gemessen wurden, ein Grenzwert von 4,5 μm bestimmt. Im Sham-Tier waren 90,1% der gemessenen Innendurchmesser kleiner als 4,5 μm . Es wurde der Cut-Off-Wert bei 90% Einschluss gesetzt, um zu verhindern, dass durch schräge Anschnitte und dadurch eine Vergrößerung des Innendurchmessers eine Verzerrung der Werte zustande kommt.

4.12. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism (Version 5.02, GraphPad Software Inc., La Jolla CA, USA).

Zunächst erfolgte die Prüfung der Werte auf Normalverteilung mit Hilfe des d'Agostino-Pearson Omnibus-Test. Es zeigten sich normalverteilte und nicht-normalverteilte Datensätze. Normalverteilung fand sich in den Daten der Auswertung von Olig2, Cx47 und dem axonalen Innendurchmesser. Entsprechend wurden parametrische Tests durchgeführt. Für die Analyse der Daten von Cx47 und Olig2 wurde als Globaltest der ANOVA-Test genutzt und als post-hoc Test der Tukey-Test durchgeführt, da mehr als 2 Versuchsgruppen vorhanden waren. Zur Analyse des axonalen Innendurchmessers wurde als Globaltest der unpaired t-Test durchgeführt, da nur zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen wurden.

Keine Normalverteilung fand sich bei den Daten der CD3-, CD68-, Cx29-, OSP-, PAS-, LFB- und HE-Auswertungen. Daher wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt. Als Globaltest wurde für die Auswertung von Cx29 und OSP, da in den Datensätzen mehr als zwei Versuchsgruppen vorhanden waren, der Kruskal-Wallis-Test genutzt und als post-hoc Test der Mann-Whitney-U-Test angeschlossen. Die Auswertung von CD3, CD68, HE, LFB und PAS erfolgte, da nur zwei Versuchsgruppen vorhanden waren, mittels Mann-Whitney-U-Test.

Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] in einem Säulendiagramm dargestellt.

Eine Signifikanz wurde für $p < 0.05$ angenommen. Für die Darstellung der Signifikanzen wurde folgende Einteilung genutzt: $p \geq 0,05$ nicht signifikant; * $0,01 \leq p < 0,05$ signifikant; P-Werte $< 0,01$ wurden als hochsignifikant eingestuft und in Diagrammen durch zwei bis 4 Sternchen gekennzeichnet (** $0,001 \leq p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $0,0001 \leq p < 0,001$)

5. Ergebnisse

5.1. Verlauf der EAE-Symptomatik

Während der Induktions- und Therapiephase erfolgte das tägliche klinische Monitoring der Versuchsgruppen und die Ermittlung des aktuellen Erkrankungszustandes anhand der vorgeschriebenen Scores.

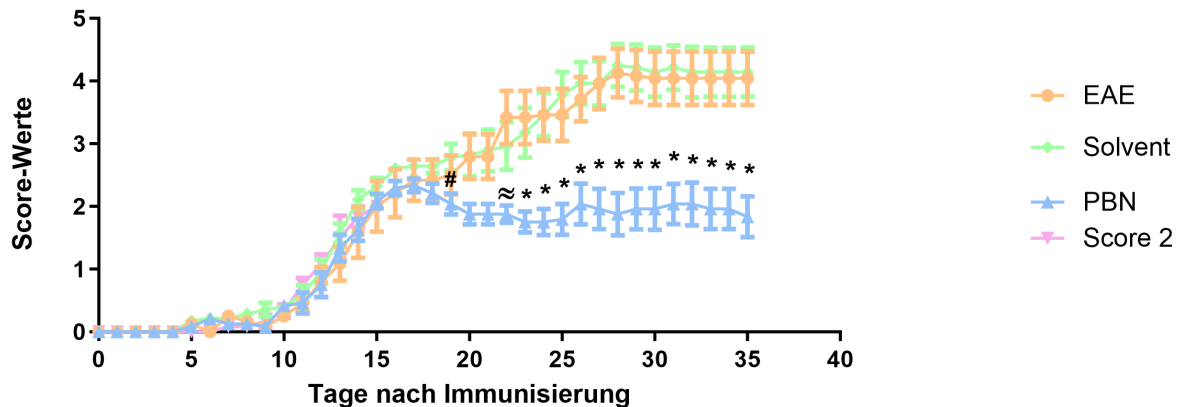


Abbildung 5: Score-Verlauf der Versuchstiere

Aufgetragen sind die Verläufe der klinischen Scores in Anlehnung an (HAINZ et al., 2017) in den einzelnen Versuchsgruppen (EAE n=6, Score 2 n=3, PBN n=9, solvent n=11), Scores der Tiere der Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt) waren über den gesamten Versuchszeitraum $<0,5$. Deutlich erkennbar ist der mildere klinische Krankheitsverlauf in der PBN-Gruppe. (# Solvent signifikant gegen PBN, \approx EAE signifikant gegen PBN, * Solvent und EAE signifikant gegen PBN, $p < 0,05$). Zu beachten ist, dass Tiere, die aufgrund der Abbruchkriterien getötet werden mussten, mit Score 5 weitergeführt wurden.

Aus diesem Pool an Versuchstieren wurde eine Subpopulation von n=3 (randomisiert ausgewählt) aus jeder Versuchsgruppe morphologisch analysiert. Dargestellt ist ebenfalls die Euthanasie der Score 2-Gruppe bei Erreichen des Score 2. Gleichzeitig wurde das Erreichen des Score 2 als Therapiebeginn der Solvent- und PBN-Gruppe gewählt. Betrachtet man den Verlauf der klinischen Scores der ausgewählten Subpopulation, so gleicht dieser dem gezeigten Verlauf mit dem Unterschied, dass die EAE-Gruppe einen durchschnittlichen Score von 3 und nicht wie abgebildet 4 erreicht.

5.2. Ultrastrukturelle Analyse der NN. optici

Um in einem ersten Schritt die Umbildungsprozesse im N. opticus in der Frühphase der EAE zu analysieren, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nn. optici angefertigt. Für die Anfangsphase der EAE wurde bereits in der Literatur das Vorhandensein eines Zellödems als Vorstufe der Demyelinisierung beschrieben. Daher wurde in dieser Analyse der axonale Innendurchmesser bestimmt, um die Zunahme im Sinne des Zellödems quantifizieren zu können. Es erfolgte der Vergleich mit einer Sham-Gruppe, um auszuschließen, dass die Veränderungen durch die alleinige Zugabe des Freund's Adjuvans verursacht werden.

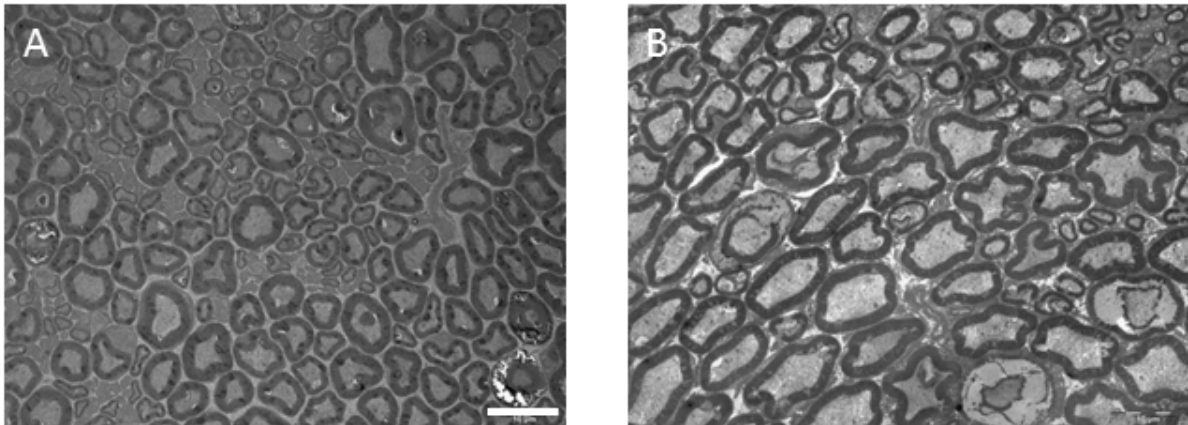


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Ausschnitte des N. opticus

Abgebildet sind beispielhaft Ausschnitte aus den Nn. optici eines Sham (A) und eines EAE (B) Tiers. Maßstab in A (für A-B) entspricht 10 µm. Bildvergrößerung x2250.

Der N. opticus eines Sham-Tieres (A) zeigt axonale Anschnitte verschiedenster Größe in wechselnder Anordnung. Bei erster Betrachtung ließen sich bereits optisch Unterschiede in der Größe der axonalen Innendurchmesser im Vergleich mit dem EAE-Tier (B) feststellen: Die axonalen Anschnitte im EAE-Tier (B) schienen einen deutlich größeren Innendurchmesser zu haben, wodurch sich auch im Vergleich zur Sham-Gruppe nur eine deutlich reduzierte Anzahl an Axonen in einem vergleichbar großen Bildausschnitt darstellen ließ. Zudem ist im Vergleich mit dem Sham-Tier eine deutlich geringere Zahl an kleineren axonalen Anschnitten zu erkennen. Daher wurde der axonale Innendurchmesser mittels ImageJ vermessen, um die Unterschiede zu quantifizieren. Pro Versuchstier erfolgte die Analyse von 4 Bildausschnitten, n=3 für beide Versuchsgruppen.

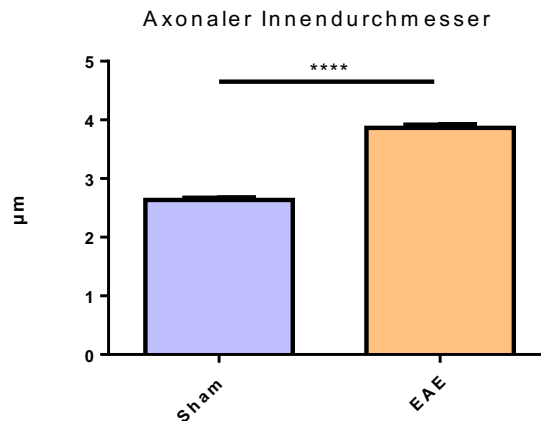


Abbildung 7: Auswertung des axonalen Innendurchmessers

Dargestellt ist der axonale Innendurchmesser im Gruppenvergleich. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Im Gruppenvergleich bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Sham- und der EAE-Gruppe (**** $p < 0,0001$).

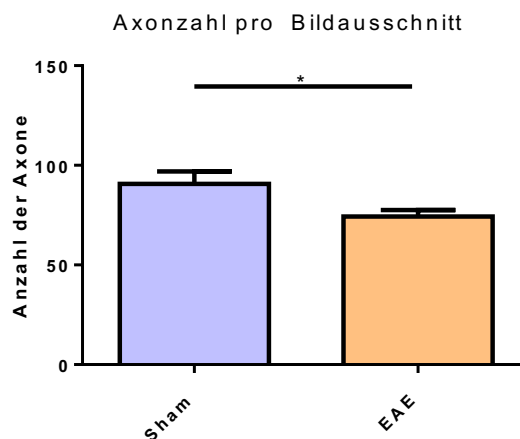


Abbildung 8: Auswertung Axonzahl pro Bildausschnitt

Dargestellt ist die Anzahl der ausgezählten Axone pro Bild im Gruppenvergleich. Im Gruppenvergleich bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Sham- und der EAE-Gruppe (* $p < 0,05$).

Der bereits optisch erkennbare Unterschied in der Größe der Axone der Nn. optici beider Versuchsgruppen bestätigte sich nach Bestimmung des axonalen Innendurchmessers und quantitativer Analyse. In der EAE-Gruppe wurden signifikant größere Innendurchmesser gemessen als in der Sham-Gruppe. Mit diesen Ergebnissen konsistent war auch die Auswertung der pro Bildausschnitt gezählten Zahl an Axonen, die in der EAE-Gruppe signifikant vermindert war.

Nach Analyse der gemessenen axonalen Innendurchmesser wurde ein Cut-Off-Wert bei 4,5 μm bestimmt. Dabei waren 90,1% der axonalen Innendurchmesser der Sham-Gruppe kleiner als 4,5 μm , bei der EAE-Gruppe waren es 64,1%. Es wurde also bei 35,1% der Axone eine Vergrößerung des axonalen Innendurchmessers festgestellt.

Nachdem sich ultrastrukturell eine Zunahme des axonalen Durchmessers gezeigt hatte, erfolgte im nächsten Schritt die Untersuchung etablierter Entzündungsmarker, um zu analysieren, ob es nicht nur zu einem Zellödem, sondern auch zu Entzündungsprozessen und daraus resultierender Demyelinisierung gekommen war.

5.3. Analyse der Entzündungsparameter

Die Gefrierschnitte der Nn. optici wurden mit Antikörpern gegen das T-Zell-Protein CD3 und den Makrophagen-Marker CD68 gefärbt, um Entzündungsprozesse im N. opticus darstellen zu können. Beide Zelltypen, T-Zellen und Makrophagen/aktivierte Mikroglia, sind am Entzündungsgeschehen beteiligt. Da CD3 ein Marker für T-Lymphozyten ist, wurde die Färbung angefertigt, um die Ausprägung der Infiltration der Nerven durch T-Zellen zu analysieren. Anhand der Färbung mit CD68 wurde die Intensität der Infiltration durch Makrophagen/aktivierte Mikroglia evaluiert, da CD68 von aktivierten Makrophagen exprimiert wird. Die H.E.-Färbung gibt aufgrund der Basophilie von Zellkernen einen Überblick über entzündliche Infiltrationsprozesse.

5.3.1. Anti-CD3-Immunfluoreszenz

Es wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit CD3 angefertigt. Es erfolgte der Vergleich der DC3-Expression in den Nn. optici der Kontroll(Wildtyp)-Gruppe mit der Score 2 Gruppe.

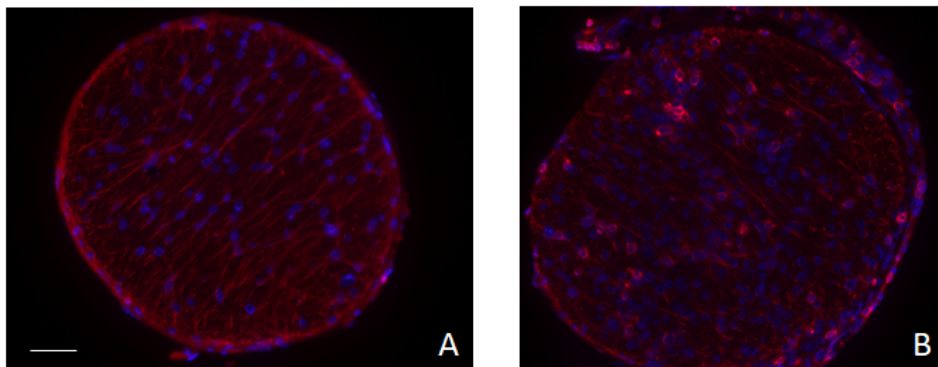


Abbildung 9: CD3-Immunfluoreszenz des N. opticus

Dargestellt sind repräsentative Querschnitte nach Immunfluoreszenz mit CD3 (rot) der Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: Score 2-Tier). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab in A (für A-B) entspricht 50 μ m.

Es zeigte sich keine Infiltration aktivierter T-Zellen im N. opticus des Kontrolltiers (A). In den Nerven der Score 2-Tiere konnte eine variierend starke Infiltration durch aktivierte T-Zellen festgestellt werden. In allen betroffenen Nerven waren Areale zu finden, die nicht durch die Infiltration durch T-Zellen betroffen waren. Die beobachtete Infiltration wurde im nächsten Schritt durch die Auszählung quantifiziert.

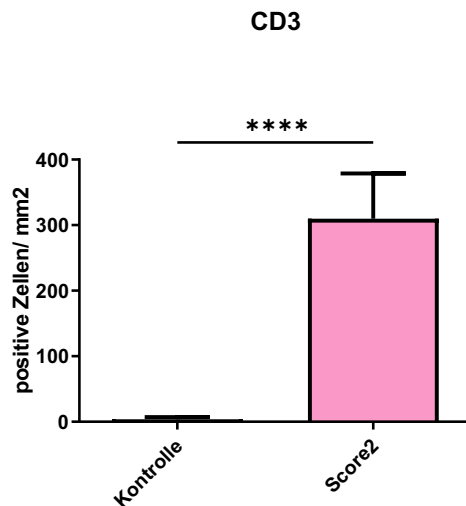


Abbildung 10: Auswertung CD3 immunpositiven Zellen

Dargestellt ist die Anzahl CD3-immunpositiver Zellen pro Fläche der Nn. optici im Gruppenvergleich. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Score 2-Gruppe (**** $p < 0,0001$).

Bereits bei der ersten optischen Kontrolle der Immunfluoreszenzen war eine deutliche Zunahme an CD-3 exprimierender T-Zellen in der Score 2 Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe zu erkennen. Dies konnte durch die quantitative Auswertung bestätigt werden. Es kam in den Nn. optici zur signifikanten Zunahme der CD3-immunpositiven Zellen pro Fläche in der Score 2-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$), passend zum Entzündungsgeschehen im Rahmen der EAE.

5.3.2. Anti-CD68-Immunfluoreszenz

Mit Hilfe des Oberflächenproteins CD68, das auf Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen exprimiert ist, wurde die Infiltration der Nerven durch CD68-exprimierende Immunzellen untersucht. Die Beurteilung der Stärke der Infiltration erfolgte im Gruppenvergleich.

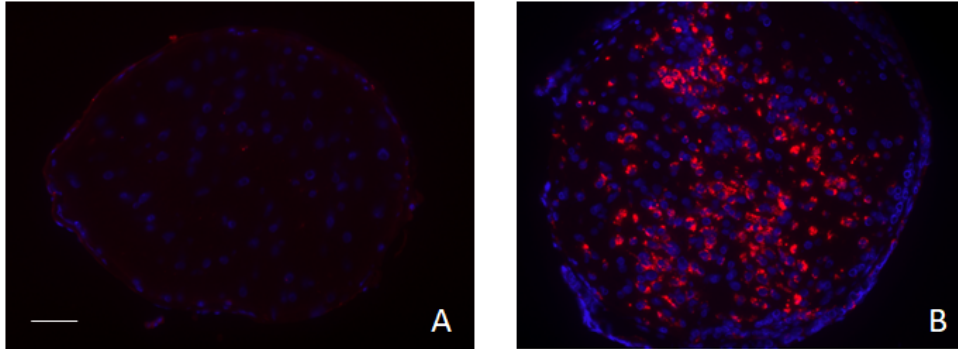


Abbildung 11: CD68-Immunfluoreszenz im N. opticus

Dargestellt sind repräsentative Querschnitte nach Immunfluoreszenz mit CD68 (rot) der Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: Score 2-Tier). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab in A (für A-B) entspricht 50 µm.

Es zeigte sich keine Infiltration durch Makrophagen/aktivierte Mikroglia im N. opticus des Kontrolltiers (A). Im Score 2-Tier (C) konnte man die Infiltration nahezu der gesamten zentralen Fläche des N. opticus beobachten. Im nächsten Schritt wurde das Ausmaß der Infiltration quantifiziert und dargestellt.

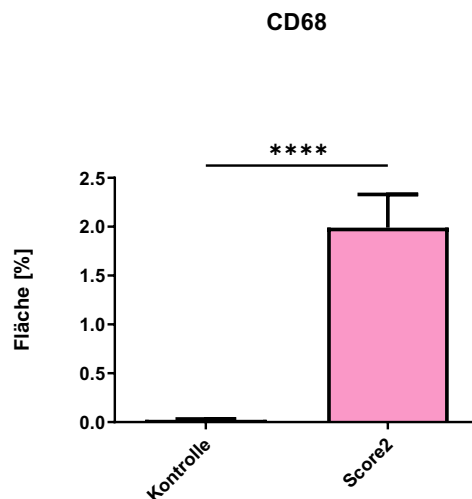


Abbildung 12: Auswertung CD68-Immunfluoreszenz

Dargestellt ist die CD68-immunpositive Fläche [%] im Gruppenvergleich. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Tieren der Score 2-Gruppe (**** $p < 0,0001$).

Sowohl optisch als auch nach quantitativer Analyse, war eine signifikante Zunahme der CD68-immunpositiven Zellen im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Score 2-Gruppe zu erkennen.

5.3.3. Hämatoxylin-Eosin

Es wurde eine histologische H.E.-Färbung angefertigt, um sich einen allgemeinen Überblick über Infiltrations- und Entzündungsprozesse zu verschaffen. Die Beurteilung der Infiltrationsprozesse erfolgte im Gruppenvergleich. Blau stellen sich basophile Strukturen wie DNA und Zellkerne da, rot-violett stellen sich azidophile Zellkomponenten wie zytoplasmatische Proteine dar.

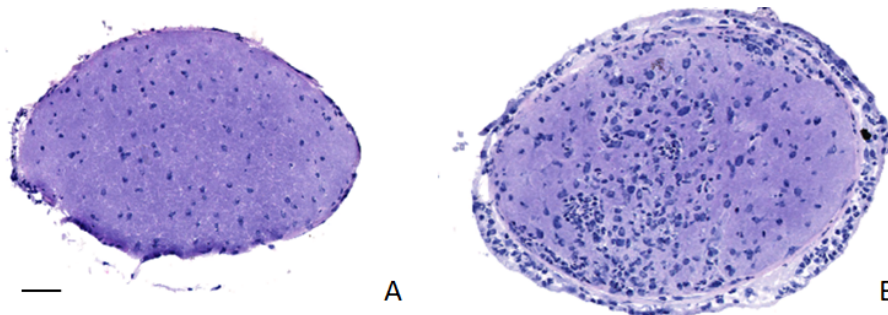


Abbildung 13: H.E.-Färbung des N. opticus

Dargestellt sind repräsentative Querschnitte der Nn. optici der Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: Score 2-Tier) nach histologischer H.E.-Färbung. Maßstab in A (für A-B) entspricht 50 μm .

Im Kontrolltier (A) zeigte sich die zu erwartende Menge und Verteilung an Zellkernen. Die Zellkerne stellten sich locker und homogen verteilt über die gesamte Fläche des Nervenquerschnitts dar. Bereits auf den ersten Blick zeigte sich eine deutliche Zunahme an Zellkernen in den optischen Nerven der Score 2-Tiere. Es waren sowohl randständige Ansammlungen von Zellkernen erkennbar als auch eine Infiltration der umgebenen Meningen sowie der zentralen Bereiche der optischen Nerven.

Zur Quantifizierung der Infiltrationsstärke und der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurde eine semiquantitative, verblindete Auswertung angefertigt.

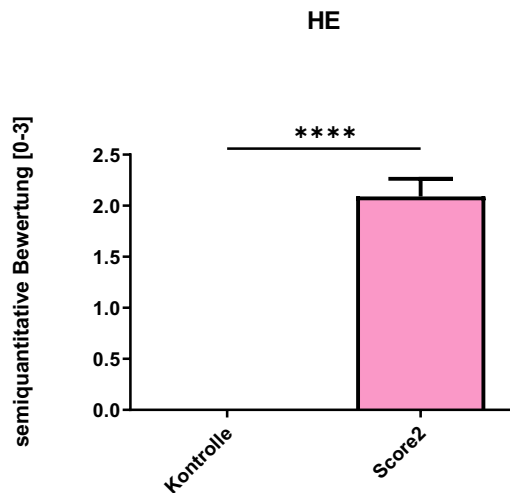


Abbildung 14: Auswertung der histologischen H.E.-Färbung

Dargestellt ist die semiquantitative Auswertung der in der H.E.-Färbung erkennbaren Kernansammlungen im Gruppenvergleich. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Es ließen sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Versuchsgruppen darstellen (**** $p < 0,0001$).

Bereits bei der optischen Analyse konnte man eine deutliche Zunahme der Menge darstellbarer Zellkerne in den Nerven erkennen. Nach zweifacher verblindeter Auswertung und Zuordnung semiquantitativer Score-Werte konnte dies bestätigt werden. Erkennbar waren randständige oder in den zentralen Anteilen des Nerven liegende Kernansammlungen. Die durch die Infiltration eingenommenen Flächen in den Nervenanschnitten der Score 2-Gruppe waren signifikant größer im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

5.4. Analyse der Demyelinisierung

Um die Demyelinisierung in den optischen Nerven beurteilen zu können, wurde eine LFB- und PAS-Färbung durchgeführt. In der LFB-Färbung ist Myelin türkis dargestellt und ließ sich so gut beurteilen. Durch die PAS-Färbung wurden Glykoproteine und Glykolipide dargestellt, welche sich gehäuft im Myelin finden und so ebenfalls die Untersuchung der Myelinisierung der Nerven ermöglichten.

5.4.1. Luxol-Fast-Blue- Histologie

Zur Beurteilung der Myelinisierung der Nerven wurde eine LFB-Färbung angefertigt. Die Myelinisierung wurde im Gruppenvergleich beurteilt.

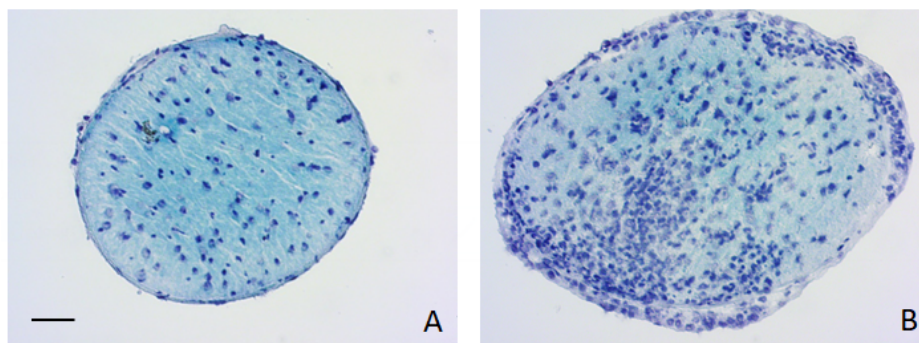


Abbildung 15: LFB-Färbung des N. opticus

Dargestellt sind repräsentative Querschnitte nach histologischer LFB-Färbung beider Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: Score 2-Tier). Myelin türkis, Zellkerne dunkelblau darstellbar. Maßstab in A (für A-B) entspricht 50 µm.

Im Kontrolltier (A) stellten sich ähnlich wie in der HE-Färbung locker verteilte Zellkerne und eine homogene Myelinisierung des Nerven dar.

In den Nervenanschnitten der Score 2-Tiere ließen sich auch in der LFB-Färbung die schon in der H.E.-Färbung dargestellten Zonen mit Zellkernansammlungen nachweisen. Anhand der weniger ausgeprägten Türkisfärbung in den Nerven der Score 2-Tiere waren deutlich demyelinisierte Bereiche nachweisbar. Besonders waren randständig große Bereiche von Zellkernansammlungen mit besonders hoher Zellzahl, die sich nach zentral mit abnehmender Zellzahl ausbreiteten, erkennbar. Auffällig war, dass sich die Bereiche, in denen eine verminderte Myelinisierung zu erkennen waren, teils mit den Bereichen der vermehrten Infiltration deckten.

Um das Ausmaß der Demyelinisierung zu bestimmen, wurde eine semiquantitative Auswertung angefertigt.

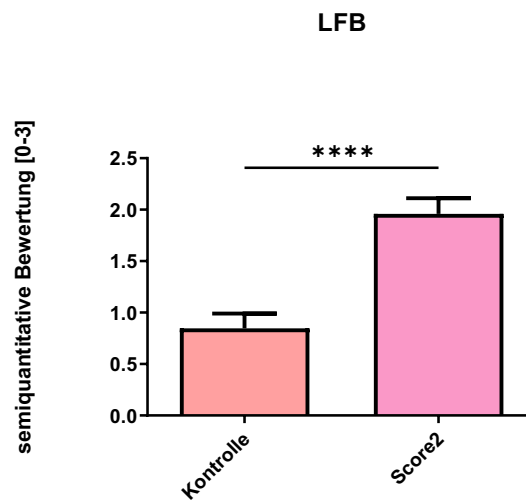


Abbildung 16: Auswertung der LFB-Färbung

Dargestellt ist die semiquantitative Auswertung der LFB-Färbung im Gruppenvergleich. Zunehmende Scores weisen auf eine größere demyelinisierte Fläche in den histologischen Färbungen der optischen Nerven hin. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Versuchsgruppen (**** $p < 0,0001$).

Es ließen sich sowohl optisch als auch semiquantitativ deutliche Unterschiede in der Stärke der Demyelinisierung feststellen. Im Vergleich der Score 2- mit der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der Myelinisierung in den optischen Nerven. Bereiche stärkerer Infiltration deckten sich mit Bereichen stärkerer Demyelinisierung.

5.4.2. Perjod-Säure-Schiff- Histologie

Ergänzend wurde zur Beurteilung der Myelinisierung der Nerven eine PAS-Färbung angefertigt. Die Myelinisierung wurde im Gruppenvergleich beurteilt. Auch in der PAS-Färbung wird das Hämatoxylin zur Darstellung der Zellkerne eingesetzt.

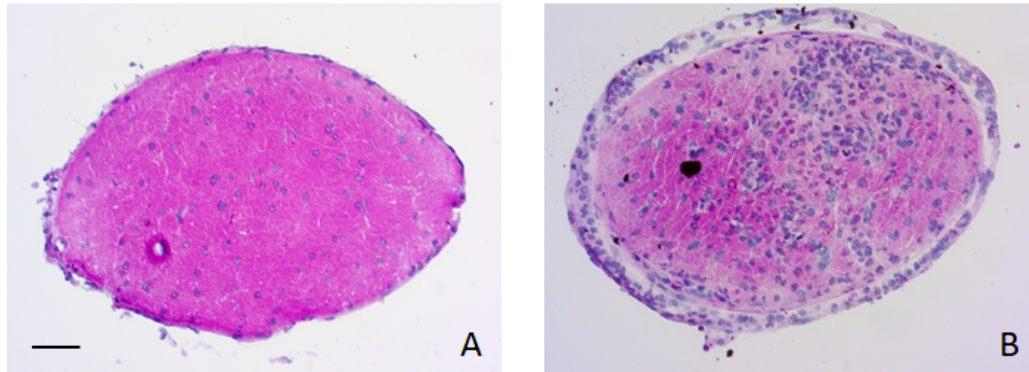


Abbildung 17: PAS-Färbung des N. opticus

Dargestellt sind repräsentative Querschnitte nach histologischer PAS-Färbung der Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: Score 2-Tier). Pink kommt Myelin auf Basis einer Glykoproteinfärbung zur Darstellung, die Zellkernen sind durch Hämatoxylin blau gefärbt. Maßstab in A für A-B entspricht 50 µm.

Die Ergebnisse der PAS-Färbung deckten sich mit denen der H.E.- und LFB-Färbung. In optischen Nerven der Kontrolltiere (A) zeigten sich locker verteilte Zellkerne und eine homogene Färbung des Myelins über die gesamte Fläche des Nervens. Im Score 2-Tier fielen randständige Plaques von extremer Zellzahlvermehrung auf, die sich nach zentral ausbreiteten. In den Bereichen der Zellkernvermehrung war eine deutliche Demyelinisierung zu erkennen. Ebenso wie in den LFB und H.E.-Färbungen war auch hier eine Infiltration der den Nerv umgebenden Meningen erkennbar.

Die Demyelinisierung und die Infiltrationsstärke wurde im nächsten Schritt durch eine semiquantitative zweifache verblindete Auswertung bestätigt.

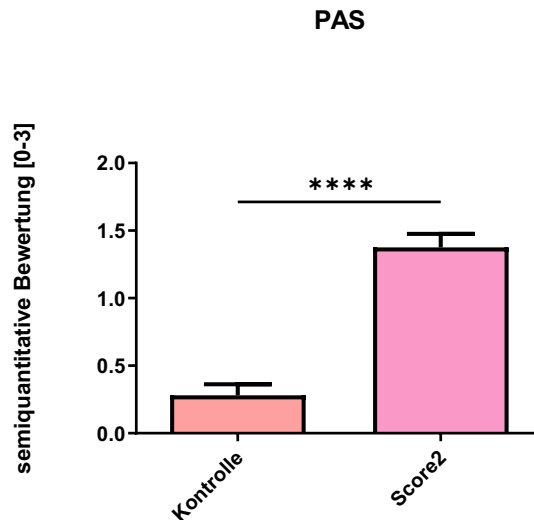


Abbildung 18: Auswertung der PAS-Färbung

Dargestellt ist die semiquantitative Auswertung der PAS-Färbung im Gruppenvergleich. Höhere Scores bedeuten eine Abnahme der Myelin-spezifischen-Pinkfärbung. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Versuchsgruppen (**** $p < 0,0001$).

Die optisch erkennbaren Unterschiede im Ausmaß der Demyelinisierung wurden in der semiquantitativen Analyse bestätigt: Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Myelinisierung in der Score 2 Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigten sich in den Nn. optici von EAE-Tieren deutliche Veränderungen, die auf Inflammation und Demyelinisierung hinweisen. Bereits in der ultrastrukturellen Analyse waren Veränderungen im Sinne einer Zunahme des axonalen Innendurchmessers in den Nn. optici im Rahmen der EAE darstellbar. Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass sich sowohl entzündliche Prozesse im Sinne einer Infiltration durch Immunzellen als auch Demyelinisierung in den Nn. optici der EAE-Tiere abspielten.

In einem weiteren Schritt wurde der Hypothese nachgegangen, dass die Applikation von Probenecid die EAE-Pathologie nicht nur im Rückenmark sondern auch im N. opticus beeinflusst. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk gelegt auf die Analyse der Oligodendrozyten im N. opticus.

Es wurden daher – in Anlehnung an bereits durchgeführte Analysen im Rückenmark – die Oligodendrozyten der optischen Nerven analysiert. Besonderer Fokus lag auf der Betrachtung spezifischer Myelinproteine sowie der oligodendrozytären Gap Junction Proteine Cx29 und Cx47. Dabei wurde die Expression jeweils in Tieren der EAE-Gruppe, Probenecid- bzw. Solvent-Gruppe sowie der Score 2- und Kontrollgruppe vergleichend analysiert.

Um die Zahl vorhandener Oligodendrozyten sowie die Proteinmenge in den Nerven zu beurteilen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen die oligodendrozytären Proteine Olig2, OSP, Connexin47 (Cx47) und Connexin29 (Cx29) angeschlossen. Es wurde die Hypothese verfolgt, dass die Probenecid-Behandlung in einem verminderten Untergang der Oligodendrozyten resultiert.

5.4.3. Olig2- Immunfluoreszenz

Um die Anzahl von Oligodendrozyten in den optischen Nerven zu beurteilen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen den oligodendrozytären Transkriptionsfaktor Olig2 angefertigt. Olig2 wird sowohl von reifen Oligodendrozyten als auch von oligodendrozytären Vorläuferzellen exprimiert.

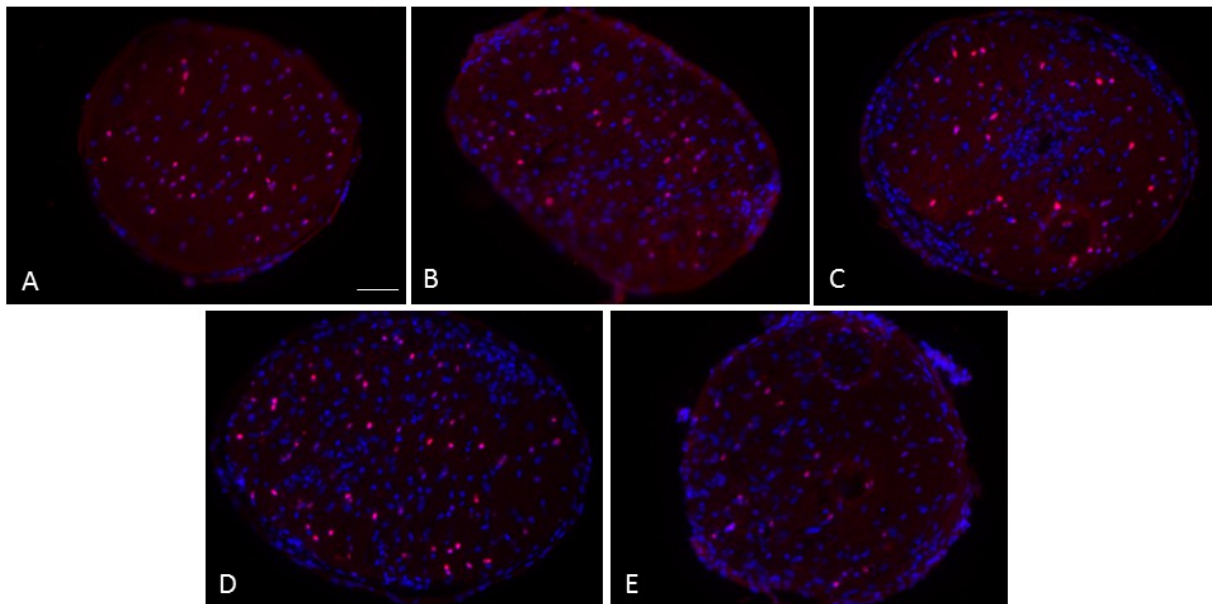


Abbildung 19: Olig2-Immunfluoreszenz des N. opticus

Abgebildet sind repräsentative Querschnitte von Nn. optici nach Immunfluoreszenz mit Olig2 (rot) aller Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: EAE-Tier, C: Score 2-Tier, D: Solvent-Tier, E: PBN-Tier). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab in A (für A-E) entspricht 50 µm.

Bei der Beurteilung der Menge an Olig2-positiven Oligodendrozyten beziehungsweise deren Vorläuferzellen in den Nerven zeigte sich ein gutes Signal bei der Färbung mittels Olig2. In allen Versuchsgruppen zeigte sich eine lockere Verteilung von immunpositiven Zellen über die gesamte Fläche der Nervenanschnitte. Es ließen sich dabei keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen feststellen.

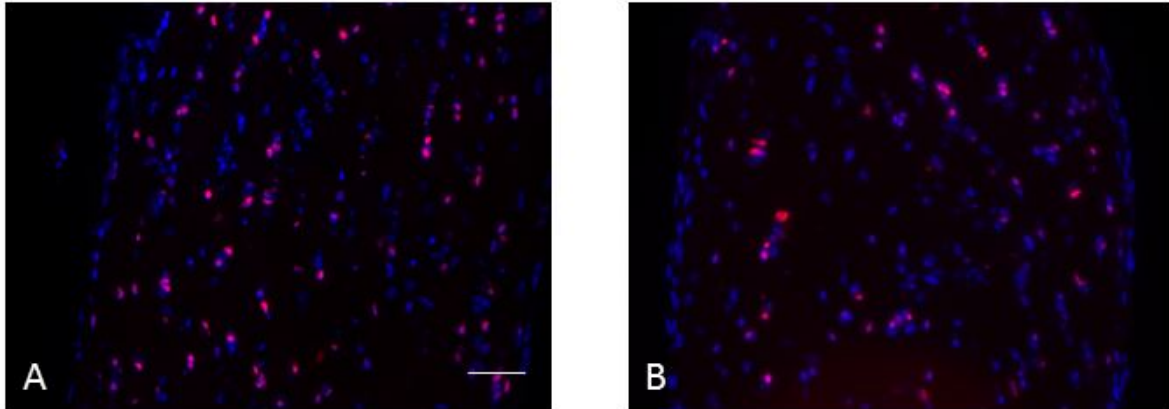


Abbildung 20: Olig2-Immunfluoreszenz an Längsschnitten der Nn. optici

Dargestellt sind repräsentative Längsschnitte, nach Immunfluoreszenz mit Olig2 (rot), von einem Kontrolltier (A) und einem EAE-Tier (B). Die Zellkerne wurden mittel DAPI (blau) gefärbt. Maßstab in A (für A-B) entspricht 50 μm .

Im Versuch segmentale Entzündungsprozesse darzustellen, wurden exemplarisch Längsschnitte der Nn. optici angefertigt. Da jedoch nur das kurzstreckige Anschneiden der Nn. optici gelang, erfolgte die Färbung dieser Längsschnitte exemplarisch. Eine gesonderte Auswertung im Gruppenvergleich wurde nicht durchgeführt. In den Längsschnitten zeigte sich ein deutliches Olig2-Signal und ebenfalls eine lockere Verteilung immunpositiver Zellen über die gesamte abgebildete Fläche, aber keine regionalen Unterschiede in der Zahl vorhandener Oligodendrozyten. Im Folgenden dargestellt ist daher die Auswertung der gefärbten Querschnitte.

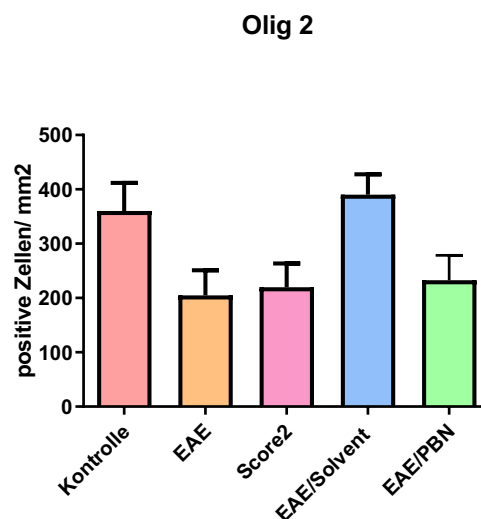


Abbildung 21: Auswertung der Olig2- Immunfluoreszenz (Querschnitte)

Dargestellt ist die Anzahl der durch Olig2-immunmarkierten Zellen im Gruppenvergleich. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Versuchsgruppen.

Die Färbung mittels Olig2-Antikörper wurde genutzt, um die Anzahl an vorhandenen Oligodendrozyten in den Nerven zu beurteilen. Obwohl in den vorangegangenen Auswertungen eine signifikante Abnahme des Myelins in EAE-Tieren gezeigt werden konnte, ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl Olig2-immunpositiver Zellen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen feststellen.

5.4.4. Oligodendrozyten-spezifisches Protein (OSP)

Die Färbung mittels OSP wurde angefertigt, um die Menge an durch Oligodendrozyten gebildetem Myelin in den Nerven zu beurteilen und dadurch einen Rückschluss auf die Menge an vorhandenen Oligodendrozyten zu ziehen.

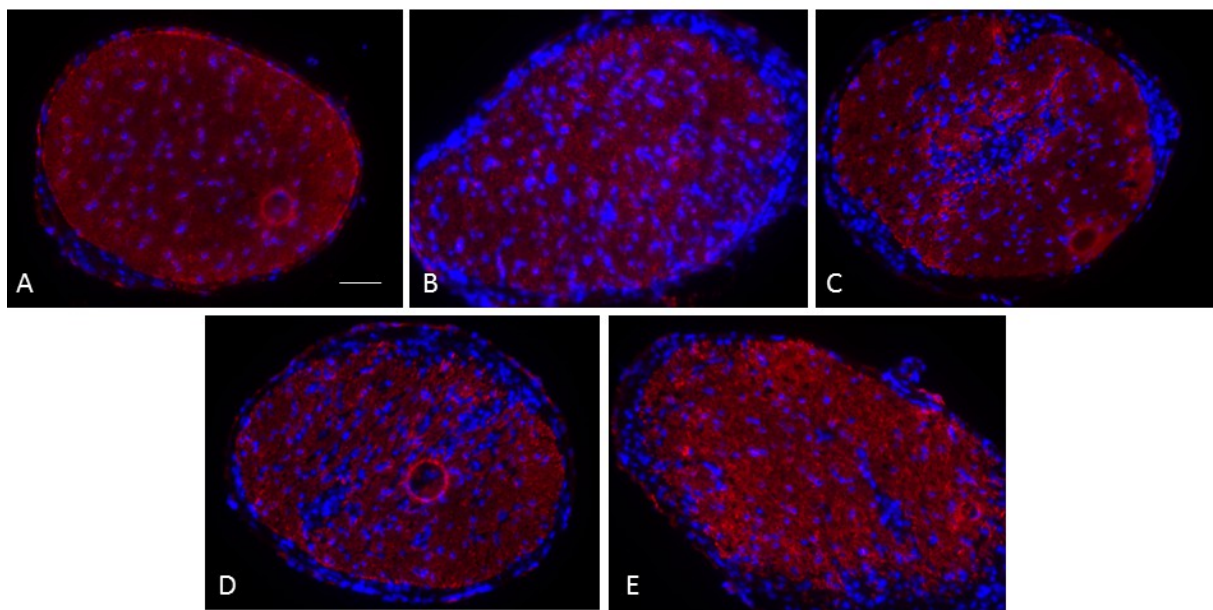


Abbildung 22: OSP-Immunfluoreszenz des N. opticus

Dargestellt sind Querschnitte nach Immunhistochemie mit OSP (rot) aller Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: EAE-Tier, C: Score 2-Tier, D: Solvent-Tier, E: PBN-Tier). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab in A (für A-E) entspricht 50 µm.

Das Kontrolltier (A) stellt sich mit gleichmäßig verteilten Zellkernen und gleichmäßiger Expression von OSP dar. In den anderen Versuchsgruppen konnte zwar mittels DAPI (blau) eine deutliche Vermehrung von darstellbaren Zellkernen im Sinne einer Infiltration durch Immunzellen festgestellt werden. Es lag jedoch kein Unterschied in der Expression von OSP im Vergleich zur Kontrollgruppe vor.

Obwohl sich zwar vereinzelt Areale mit vermehrter Expression von OSP, zum Beispiel in der PBN-Gruppe zeigten, konnte in der quantitativen Auswertung kein signifikanter Unterschied in der Expression festgestellt werden.

OSP

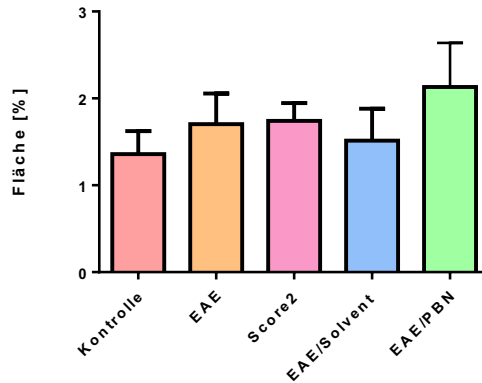


Abbildung 23: Auswertung der OSP-Immunfluoreszenz

Dargestellt ist die durch OSP markierte Fläche [%] im Gruppenvergleich. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Im Gruppenvergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Die OSP-immunpositive Fläche unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

5.4.5. Connexin 47

Cx bilden als transmembranäre Proteine Gap Junctions und ermöglichen dadurch die interzelluläre Kommunikation durch den Austausch von Signal- und Botenstoffen und Stoffwechsel durch den Austausch von Energiequellen (HERVÉ, DERANGEON, 2013). Sowohl in akuten als auch in chronischen Läsionen, die durch MS verursacht werden, lässt sich eine Veränderung der glialen Connexinexpression beobachten.

Cx47 wird von reifen Oligodendrozyten und oligodendrozytären Vorläufern exprimiert, es wurde eine Färbung mit Cx47 angefertigt, um die oligodendrozytäre Ausstattung der Nerven, sowie die Connexinexpression im Rahmen der EAE zu beurteilen (MENICHELLA et al., 2003; PAPANEOPHYTOU et al., 2018).

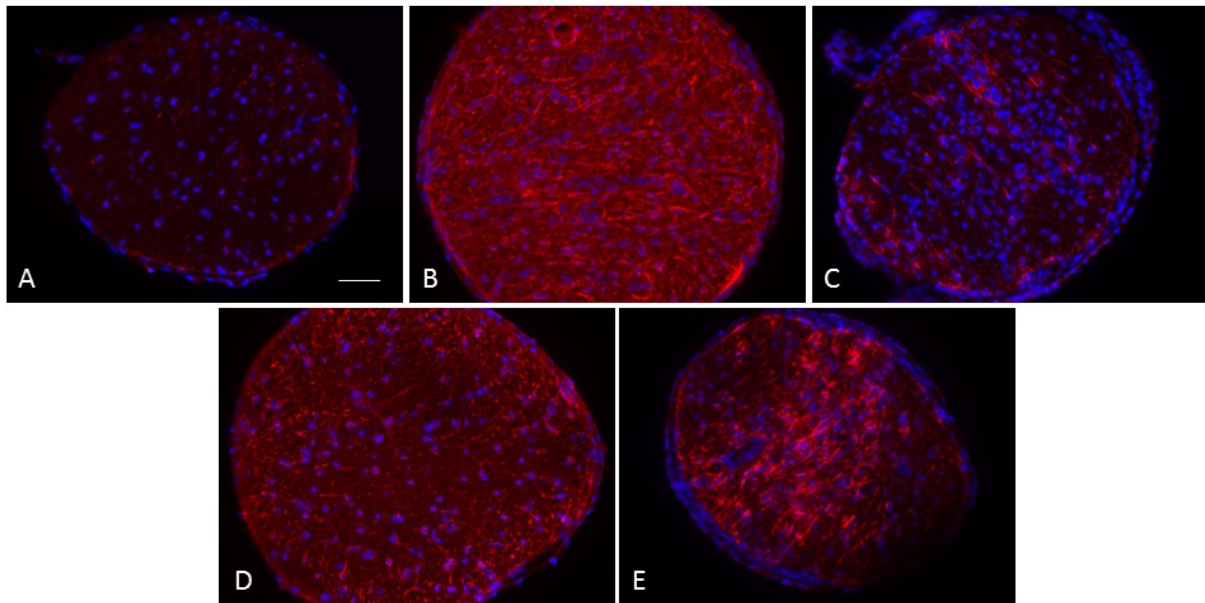


Abbildung 24: Cx47-Immunfluoreszenz des N. opticus

Dargestellt sind repräsentative Querschnitte nach Immunhistochemie mit Cx47 (rot) aller Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: EAE-Tier, C: Score 2-Tier, D: Solvent-Tier, E: PBN-Tier). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab in A (für A-E) entspricht 50 µm.

Es ließ sich in allen Versuchsgruppen zeigte sich eine Expression von Cx47 in den optischen Nerven. Im Kontrolltier ließ sich flächig ein Signal durch Cx47 darstellen, jedoch zeigten sich keine Bereiche verstärkter oder besonders intensiver Expression. Im EAE- (B), Score 2- (C) und Solvent-Tier (D) war hingegen randständig sowie in Bereichen mit vermehrter Zellzahl ein leichter Anstieg Cx47-Immunsignals zu erkennen. Es zeigten sich in allen drei analysierten Nerven Areale, in denen kein Cx47-Signal feststellbar war. Im PBN-Tier war hingegen eine deutliche Zunahme der Cx47-Expression erkennbar. Diese zog bandförmig durch den mittleren Anteil des Nervens, rechts und links davon zeigten sich Bereiche mit deutlich weniger Expression von Cx47. Ähnliche Muster zeigten sich in allen Versuchstieren der PBN-Gruppe. Im nächsten Schritt wurde die Fläche des Signals quantifiziert und dargestellt.

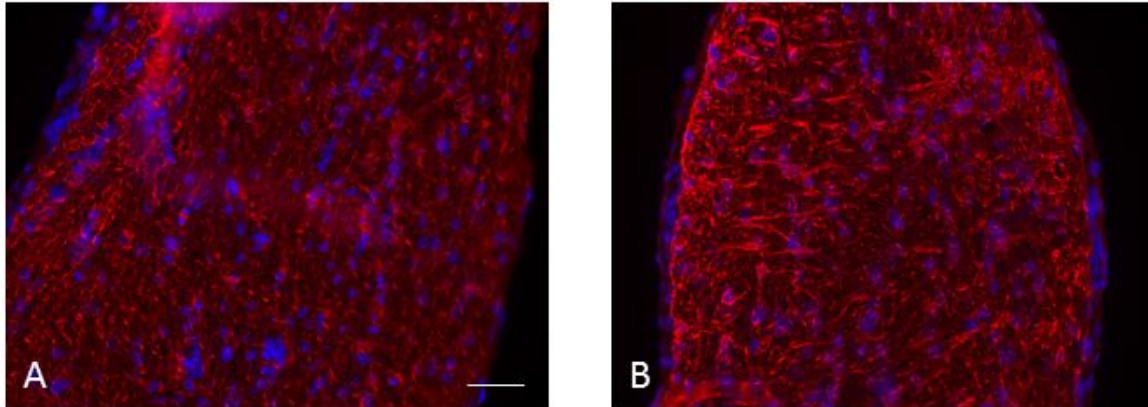


Abbildung 25: Längsschnitte Cx47

Dargestellt sind repräsentative Längsschnitte, nach Immunhistochemie mit Cx47, von einem Kontrolltier (A) und einem EAE-Tier (B). Maßstab in A (für A-B) entspricht 50 μm . Bildvergrößerung x20.

Es wurden exemplarisch Längsschnitte mit Cx47 gefärbt, um zu untersuchen, ob sich segmentale Unterschiede in der Expression von Cx47 feststellen ließen. Dies ist in den analysierten Abschnitten nicht der Fall.

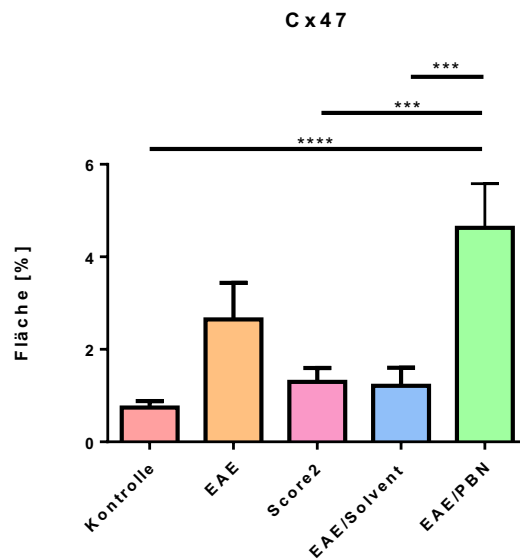


Abbildung 26: Auswertung der Cx47-Immunfluoreszenz

Dargestellt ist die durch Cx47 immunmarkierte Fläche [%] im Gruppenvergleich. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Im Gruppenvergleich bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der PBN-Gruppe und der Kontroll-, Score 2- und Solvent-Gruppe. Es bestand kein signifikanter Unterschied zur EAE-Gruppe, die sich in Bezug auf die Cx47-Expression jedoch auch nicht signifikant von der Kontroll-, Score2-, und Solvent-Gruppe unterschied (***) $p < 0,001$, **** $p < 0,001$).

Es ließ sich sowohl bei optischer Kontrolle als auch quantitativ eine signifikante Zunahme der Cx47-immunpositiven Fläche in der PBN-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, der Solvent- und der Score 2-Gruppe feststellen. Nicht signifikant unterschied sich hingegen die Cx47-immunpositive Fläche in der PBN-Gruppe verglichen mit der EAE-Gruppe. Auch zwischen den anderen Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Immunmarkierung von Cx47.

5.4.6. Connexin 29 (Cx29)

Cx29 ist ein weiteres oligodendrozytäres Gap Junction Protein, das insbesondere an der adaxonalen Myelinmembran nachgewiesen wurde (KLEOPA et al., 2004). Die Immundetektion von Cx29 wurde genutzt, um das Vorhandensein oligodendrozytärer Cx29 Connexone zu beurteilen. Als möglicher Bindungspartner des Kaliumkanals Kv1.1 kann die Expression von Cx29 als Hinweis auf die Integrität der axoglialen Einheit gewertet werden (KLEOPA et al., 2004; PAPANEOPHYTOU et al., 2019).

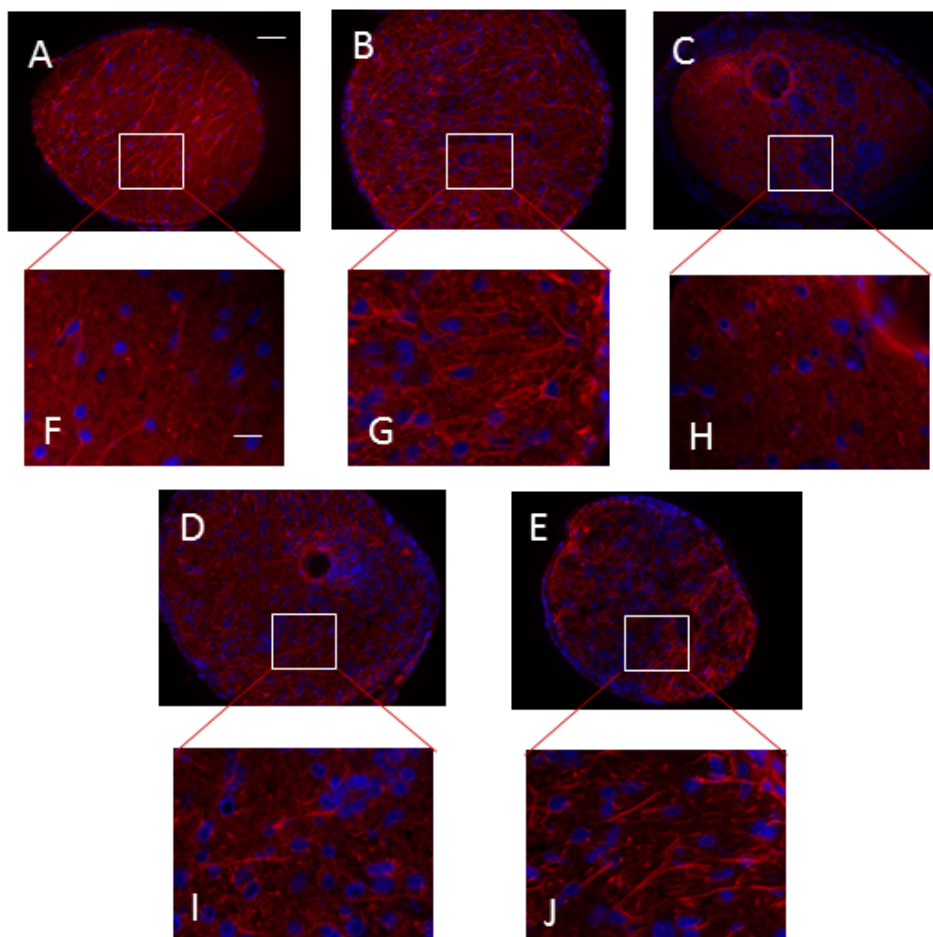


Abbildung 27: Cx29-Immunfluoreszenz im N. opticus

Dargestellt sind repräsentative Querschnitte nach Immunfluoreszenz mit Cx29 (rot) aller Versuchsgruppen (A: Kontroll-Tier, B: EAE-Tier, C: Score 2-Tier, D: Solvent-Tier, E: PBN-Tier). Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) gefärbt. Maßstab in A, (für A-E) entspricht 50 μm , Maßstab in F (für F-J) entspricht 15 μm . Bildvergrößerung A-E x20, F-J x40.

In allen Versuchsgruppen konnte die Cx29-Immunfluoreszenz detektiert werden. Zur besseren Beurteilung wurde in den Bildern F-J eine höhere Vergrößerung dargestellt. Das Cx29-Immunsignal stellte sich stellenweise punktförmig dar, wie für Gap Junction Proteine beschrieben. Jedoch ließen sich optisch nur geringfügige Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen den Gruppen erkennen.

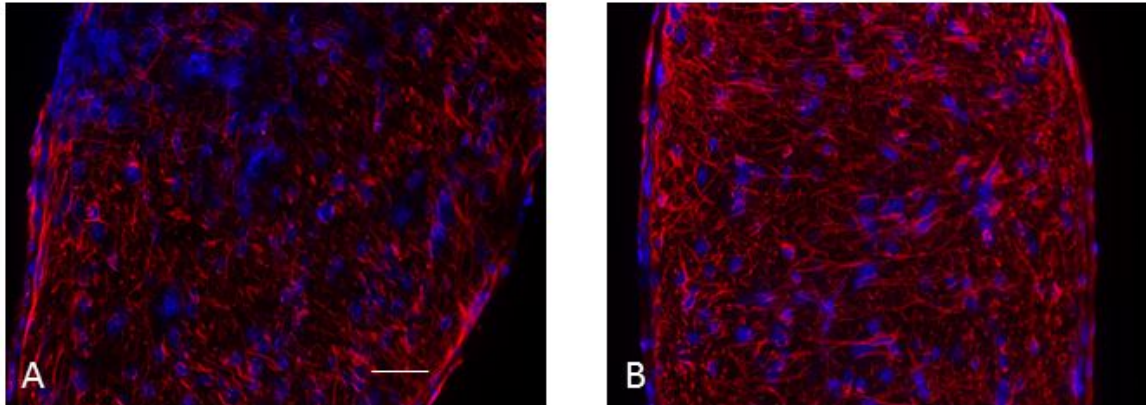


Abbildung 28: Cx29-Immunfluoreszenz in Längsschnitten der Nn. optici

Dargestellt sind repräsentative Längsschnitte, nach Immunhistochemie mit Cx29 (rot), von einem Kontrolltier (A) und einem EAE-Tier (B). Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) gefärbt. Maßstab in A (für A-B) entspricht 50 μ m.

Es wurden ebenfalls exemplarisch Längsschnitte angefertigt und gefärbt, um zu untersuchen, ob sich regionale Unterschiede in der Expression von Cx29 nachweisen ließen. In den kurzstreckigen Längsschnitten konnten keine lokalen Unterschiede in der Expression von Cx29 im Sinne eines Demyelinisierungsherdes dargestellt werden, daher wurde auf die Auswertung der Längsschnitte verzichtet. Es erfolgte die quantitative Auswertung der Querschnitte.

C x 29

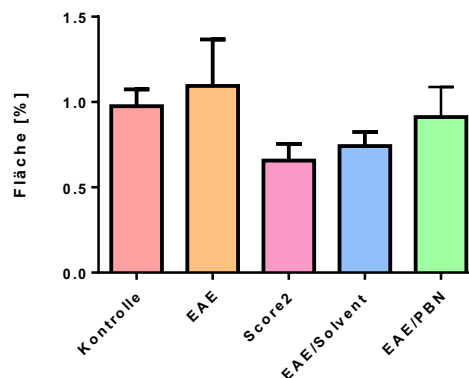


Abbildung 29: Auswertung der Cx29- Immunfluoreszenz (Querschnitte)

Dargestellt ist die durch Cx29 markierte Fläche [%] im Gruppenvergleich. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt. Im Gruppenvergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Die quantitative Auswertung der Cx29-Immunfluoreszenz bestätigte den ersten optischen Eindruck, denn es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellen.

5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit dargestellt, dass sich im Rahmen einer EAE auch Prozesse in den Nn. optici abspielen. Zunächst konnte auf ultrastruktureller Ebene demonstriert werden, dass es zu einer Zunahme des axonalen Innendurchmessers im Sinne einer Schwellung der Nerven, am ehesten im Rahmen eines Zellödems, und damit zu einer verminderten Anzahl an darstellbaren Nervenanschnitten pro Bildausschnitt kommt.

In einem nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass es in den Nn. optici von Tieren, in denen eine EAE induziert wurde, im Vergleich zu Kontrolltieren zur Infiltration durch Makrophagen und T-Zellen im Sinne einer Entzündung kam. Im Bereich der Infiltration war eine begleitende Demyelinisierung in den Nn. optici der Versuchstiere zu erkennen.

Die Applikation von PBN, einem Panx1-Inhibitor, verhindert die motorische Symptomatik der EAE bei präventiver Gabe, beziehungsweise stabilisiert die motorische Symptomatik der EAE bei therapeutischer Gabe. Daher wurden in dieser Arbeit die Effekte von PBN auf die EAE-assoziierte Symptomatik im N. opticus untersucht. In einem weiteren Schritt wurden die Oligodendrozyten in den Nerven im Hinblick auf Anzahl und Expression oligodendrozytärer Myelin- und Gap Junction-Proteine im Gruppenvergleich analysiert.

Im Gegensatz zu Befunden aus dem Rückenmark war in den optischen Nerven lediglich für Cx47 eine signifikante Veränderung erkennbar: Die Cx47-immunpositive Fläche nahm in EAE-Tieren nach PBN-Applikation signifikant zu, verglichen mit den Werten der Kontroll-, Score2-, und Solvent-Gruppe. Die Expression von OSP, Olig2 und Cx29 blieb hingegen unverändert. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass es analog zur MS auch in der EAE zu entzündlichen Prozessen und Demyelinisierung im N. opticus kommt. Es konnte kein positiver Effekt auf diese Prozesse durch die Applikation des Pannexin 1-Inhibitors Probenecid in den Nn. optici dargestellt werden.

6. Diskussion

6.1. Veränderungen im N. opticus im Rahmen der EAE

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Schritt ultrastrukturelle Veränderungen der Nn. optici im Rahmen einer EAE analysiert. Mausmodelle der MS und der damit einhergehenden optischen Neuritis ermöglichen es, die Verbindung zwischen Pathologie und funktionellen Einschränkungen genauer zu analysieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das gut etablierte Modell der EAE genutzt. Die Hauptsymptomatik im Rahmen der EAE sind aufsteigende motorische Läsionen, welche durch Herde von Inflammation und Demyelinisierung verursacht werden. Da MS-Patient/-innen häufig unter einer NNO leiden, erscheint es sinnvoll, die Pathologien der EAE auch mit Fokus auf das Geschehen in den Nn. optici zu untersuchen. In vorangegangenen Studien wurde mittels murin adaptierter MRT-Bildgebung axonaler Untergang, Demyelinisierung, zelluläre Infiltrate und Ödem des N. opticus analysiert (LIN et al., 2017). Als Resultat von Zellinfiltration und Inflammation in der Frühphase der EAE konnte in den Nn. optici der Versuchstiere eine deutliche Ödembildung dargestellt werden. Diese trat charakteristischerweise auf, bevor eine Demyelinisierung manifest wurde (LIN et al., 2017). Der Beginn der NNO in den Versuchstieren ist assoziiert mit inflammatorischer Zellinfiltration und mutmaßlichem Ödem, was zur in der MRT-Bildgebung quantifizierbaren Schwellung der Nn. optici führt (LIN et al., 2017). Auch in anderen Studien zeigte sich, dass sich zunächst ein Anschwellen des N. opticus feststellen lässt. Erst nach dessen Rückgang kommt es zu einer deutlichen Abnahme des Durchmessers der Nn. optici als Ausdruck des Untergangs von Myelin und dem Verlust an Substanz der Nn. optici (HAYREH et al., 1981). Zu beachten ist, dass sich in Studien, in denen eine vergleichende Analyse beider Nn. optici erfolgt, ein zweizeitiger Befall der beiden Augen zeigt, das heißt häufig wurden zwei verschiedene Zeitpunkte identifiziert, zu denen es erstmals zu Pathologien in den Nn. optici der betroffenen Tiere kommt (LIN et al., 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurden Ultradünnschnitte der Nn. optici von EAE-Tieren mit dem klinischen Score von 1,5 sowie von Sham-Tieren angefertigt, um die Unterschiede im axonalen Durchmesser und der Myelinisierung in den Nn. optici quantifizieren zu können. Dabei zeigte sich, dass in einem gleichgroß gewählten Bildausschnitt bei den Sham-Tieren deutlich mehr axonale Anschnitte abgebildet wurden als in den EAE-Tieren. In einem nächsten Schritt wurde der durchschnittliche axonale Durchmesser in den beiden Versuchsgruppen ermittelt, auch hier zeigte sich ein signifikant größerer Durchmesser in der EAE-Gruppe verglichen mit der Sham-Gruppe. Dies stützt die Beobachtung vorangegangener Studien, dass es zunächst zu einem Anschwellen der Nn. optici kommt, bevor die häufig beschriebene Atrophie der Nn. optici zu beobachten ist. Der Ödembildung ist eine besondere Bedeutung beizumessen, da in der Vergangenheit gezeigt wurde, dass der dadurch auf die Nervenfasern ausgeübte Druck

eine Verlangsamung der Signalweiterleitung bewirkt (KIPP et al., 2012). Die Ödembildung lässt sich besonders in der Frühphase der EAE und vor Beginn der Demyelinisierung darstellen (FAIRLESS et al., 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der Nn. optici in diesem Versuchsteil in der Frühphase der EAE: Der klinische Score von 1,5 wurde durchschnittlich am 12. Tag nach Induktion der EAE erreicht.

Es ist bei der Analyse der Gruppen jedoch zu bedenken, dass auch Sham-Tiere eine milde Form der optischen Neuritis entwickeln. In H.E.-gefärbten Schnitten der Nn. optici von Tieren, die unter Behandlung nach Sham-Protokoll, wie zu erwarten, keine klinischen Symptome entwickelten, ließen sich dennoch Immunzellinfiltrationen nachweisen (CRUZ-HERRANZ et al., 2019). Es scheint also auch die alleinige Injektion des PTX zusammen mit dem Adjuvans eine gewisse Immunreaktion hervorzurufen. Trotzdem ist es erst die Immunisierung mittels MOG, die die bekannte Pathologie und das Vollbild der EAE hervorrufen kann. Sham-Tiere entwickeln im Allgemeinen keine klinisch sichtbare Pathologie (CRUZ-HERRANZ et al., 2019). Auch mittels optischer Kohärenztomographie konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass es in der Frühphase einer EAE zum Anschwellen der inneren Ganglienzellschicht der Retina, mit Betonung der Schwellung im Bereich des augennahen Anteils der optischen Nerven, am ehesten im Sinne eines Ödems, kommt. In ultrastrukturellen Analysen zeigt sich auch in den retinalen Axonen in Analogie zur vorliegenden Arbeit eine Vergrößerung des axonalen Innendurchmessers (MANOGARAN et al., 2019). Bisher durchgeführte Arbeiten konzentrieren sich jedoch eher auf die retinalen Axone, sowie auf Veränderungen im Bereich der Retina, in der vorliegenden Arbeit erfolgt die ausschließliche Analyse der optischen Nerven.

Nachdem sich in der ultrastrukturellen Analyse die Schwellung der Nerven zeigte und damit auch eine Beteiligung des optischen Systems in der Frühphase der EAE nachvollziehbar war, erfolgte in einem zweiten Schritt die Analyse der Immunreaktion und Demyelinisierung in den Nn. Optici mittels Histologie und Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten. Dazu wurden die Nerven von Kontrolltieren mit denen von EAE-Versuchstieren, die bei Erreichen von Score 2 euthanasiert wurden, verglichen. Weitere strukturelle Änderungen im Rahmen der MS schließen Demyelinisierung, axonalen Untergang und Gliose ein (CONSTANTINESCU et al., 2011). Die akute Läsion präsentiert sich mit Infiltration von Immunzellen und Demyelinisierung (Makrophagen enthalten Zelldetritus), die chronische Läsion zeigt Demyelinisierung und weniger Zellinfiltration in Kombination mit axonalem Untergang, dadurch kommt das plaqueähnliche Aussehen zustande (CONSTANTINESCU et al., 2011). Die in den akuten Läsionen vorhandenen Immunzellen sind Makrophagen/aktivierte Mikroglia und T-Lymphozyten, dies konnte in der vorliegenden Arbeit auch in den Nn. optici demonstriert werden: In der vergleichenden Analyse waren in den Nerven der Versuchstiere der EAE-Gruppe die Einwanderung von T-Lymphozyten und Makrophagen/aktiverter Mikroglia sowie die daraus resultierende Demyelinisierung darstellbar. In den Kontrolltieren zeigte sich keine

Infiltration durch Immunzellen, sodass in Analogie zur Studienlage auch hier gezeigt werden konnte, dass es im Rahmen der EAE nicht nur zu einer Schwellung der Nn. opticii in der Frühphase, sondern im Verlauf auch zur Infiltration durch Immunzellen kommt.

Bei Patienten, die von einer MS betroffen sind, zeigt sich eine ausgeprägte meningeale Infiltration und Inflammation. Auch in den Versuchstieren konnte eine starke Infiltration in den Meningen, die den N. opticus umgeben, dargestellt werden (KIPP et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit erfolgte keine weitere Auswertung diesbezüglich, in weiterführenden Untersuchungen, wäre dies aber als interessanter Ansatz denkbar. Zusammenfassend konnte also dargelegt werden, dass bei der Induktion eine EAE auch in den N. optici sowohl in der Frühphase als auch im Verlauf die Veränderungen abbildbar sind, die sich im Rückenmark darstellen lassen.

Chronische MS-Läsionen präsentieren sich Plaque-artig mit Gliose und Demyelinisierung. Induziert man im ZNS akute Läsionen zum Beispiel durch eine Stichverletzung können reife Oligodendrozyten durch die Expression von astrozytären Genen sich über eine Übergangsform, in der ein Mischbild aus astrozytären und oligodendrozytären Genen exprimiert wird, in Astrozyten umwandeln (BAI et al., 2023). In den durch die Stichverletzung entstehenden glialen Narben zeigen sich zahlreiche Astrozyten, die aus Oligodendrozyten entstanden sind (BAI et al., 2023). Gegebenenfalls wäre es in weiterführenden Untersuchungen interessant zu überprüfen, ob dies auch im Rahmen der EAE im optischen Nerv geschieht und zu welchem Zeitpunkt die Umwandlung der Oligodendrozyten beginnt.

6.2. MS und optische Neuritis

Bei 20% der MS Patient/-innen äußert sich der erste Schub durch eine NNO. Bis zu 50% der Patienten erleben im Verlauf der MS-Erkrankung eine Phase von NNO. Normalerweise verläuft die NNO bei MS Patient/-innen selbstlimitierend und wenige Wochen nach Erkrankungsbeginn kommt es zur Erholung der Sehkraft. Es sind jedoch auch Verläufe beschrieben, die mit bleibenden visuellen Einschränkungen einhergehen (DOOLEY, FOROOZAN, 2010). Als NNO wird eine akute inflammatorische demyelinisierende Erkrankung des N. opticus bezeichnet, welche als primäres Phänomen oder im Rahmen einer anderen neurologischen Erkrankung auftreten kann. Assoziierte neurologische Erkrankungen sind in diesem Fall die MS oder Erkrankungen aus dem Formenkreis der Neuromyelitis optica. Die NNO ist der häufigste Grund für Visusverlust bei jungen Erwachsenen (PETZOLD et al., 2014). Die Patienten beschreiben einen unilateralen Visusverlust, der unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Dabei kann der Visusverlust einhergehen mit retrobulbärem Schmerz, Dyschromatopsie und, je nach zugrunde liegender Erkrankung, systemischen oder neurologischen Symptomen (CELLINA et al., 2019). Da die NNO eines der häufigsten und spezifischsten Frühsymptome der MS ist, kommt ihrer Diagnose und Behandlung eine wichtige

Rolle zu. Je früher die korrekte Diagnose einer NNO gestellt werden kann, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass auch die Diagnose der MS gestellt werden kann (CELLINA et al., 2019). Auch für die Forschung ist dies ein interessanter und bedenkenswerter Ansatz, da viele Patient/-innen viele Jahre auf die Erstdiagnose der MS warten und viele Jahre ohne korrekte Therapie verbringen (CELLINA et al., 2019). Gerade im Forschungskontext war es bisher jedoch häufig so, dass neue Therapien gegen MS präklinisch beziehungsweise prophylaktisch getestet wurden. Dies ermöglicht eine deutlich schlechtere Übertragbarkeit auf die klinische Situation der Patient/-innen.

Die Diagnosestellung der MS ist vor allem deshalb besonders schwierig, weil es kein spezifisches Testverfahren gibt, sondern die Diagnose in Zusammenschau klinischer und technischer Befunde gestellt werden muss. Wichtigstes Diagnosekriterium ist dabei der klinische Schub (FORD, 2020). In der Diagnosestellung ist die genaue Analyse der präsentierten Symptome und die Krankheitsgeschichte der Erkrankten besonders wichtig, da eine weitere Voraussetzung für die Diagnosestellung einer MS die räumliche (Dissemination in Space, DIS) und zeitliche (Dissemination in time, DIT) Dissemination der Symptome ist (FORD, 2020). Es wird immer wieder versucht Biomarker zu identifizieren, die ein frühes Erkennen einer MS ermöglichen, zuletzt hat sich gezeigt, dass eine Erhöhung von Leichtketten-Neurofilament im Serum ein Anzeichen für axonale Degeneration ist, jedoch kommt es nicht nur im Rahmen einer MS zu axonaler Degeneration, sodass es bisher keine spezifischen Biomarker gibt (PYKA-FOŚCIAK et al., 2023).

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass viele Patient/-innen Jahre auf die Erstdiagnose einer MS warten. Bis zur Diagnosestellung kommt es unter Umständen zu weiter fortschreitenden Einschränkungen und Verlust neurologischer Kapazität, da ohne Diagnosestellung auch keine Therapie erfolgt. Betrachtet man bisherige Forschungs- und Therapieansätze, so werden besonders im Forschungskontext viele neue Therapien bereits präventiv, also vor dem Einsetzen erster Symptome, gemeinsam mit der Induktion der EAE in den Tieren begonnen. Diese Konstellation ist jedoch nicht auf das Leben der Patient/-innen zu übertragen, da die Einleitung der Therapie in nahezu allen Fällen erst lange nach dem Auftreten erster Symptome begonnen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein therapeutischer Ansatz und kein präventiver Ansatz verfolgt, was bedeutet, dass die Versuchstiere nicht schon parallel mit der Induktion der EAE mit dem Therapeutikum behandelt wurden, sondern erst, als bereits eine deutliche klinische Symptomatik ausgebildet war. So wurde analysiert, ob Probenecid auch auf eine bereits manifeste EAE einen protektiven Effekt hat. Dies ermöglicht die bessere Übertragbarkeit auf die Situation der Patient/-innen, da aktuell auf Grund der erschwerten Diagnosestellung eine präklinische Therapie nicht möglich ist.

6.3. EAE und Retinale Veränderungen

Die Retina ist ein wertvolles Modell um neuronale Struktur, Funktionalität und Krankheitsprozesse zu untersuchen. Zudem ist es möglich einen guten Überblick über Faktoren, die die neuronale Gesundheit beeinflussen, zu gewinnen (TEMPONE et al., 2024). Im Rahmen der EAE kommt es nicht nur zu Veränderungen im N. opticus. Der Beginn der Pathologie und der deutlich schwerere Befall des augenahen Anteils der Nn. optici legen die Vermutung nahe, dass auch die Retina von den Pathologien der EAE betroffen sein könnte. Es ist bekannt, dass wiederholte Episoden von optischer Neuritis bei MS Patient/-innen zu kumulativem und extensivem axonalen Schaden und visuellen Einschränkungen führt (KIM et al., 2019).

Misst man die Dicke der retinalen Ganglienzellschicht mittels optischer Kohärenztomographie, so zeigt sich, dass sie bereits nach einer einzigen Episode einer optischen Neuritis deutlich reduziert ist, verglichen mit einem Auge, das noch keine Episode einer optischen Neuritis durchlaufen hat. Dabei ist zu beachten, dass sich im Anschluss ein Zusammenhang zwischen der gemessenen Dicke der retinalen Ganglienzellschicht und der Behinderung und Krankheitsdauer der Patienten herstellen lässt. Je schlimmer die Patienten betroffen sind, desto dünner ist die retinale Ganglienzellschicht (KIM et al., 2019).

Traditionell wird die Neurodegeneration im Rahmen der Multiplen Sklerose und der EAE als sekundäres Geschehen und somit als Folge der durch Inflammation und zelluläre Infiltration verursachten Demyelinisierung betrachtet (FAIRLESS et al., 2012). Ergebnisse optischer Kohärenztomographie-Messungen bei Patient/-innen mit MS regen jedoch die Diskussion an, ob die Neurodegeneration nicht auch als primärer Prozess betrachtet werden muss, da auch die nicht-myelinisierte Retina von Neurodegeneration im Rahmen der MS und EAE betroffen ist (FAIRLESS et al., 2012).

Betrachtet man die Pathologien im N. opticus im Rahmen der EAE, so zeigt sich, dass es erst zu axonalem Untergang und Demyelinisierung kommt, wenn die Tiere klinische Symptome entwickeln. Analysiert man jedoch die Zahl retinaler Ganglienzellen, so zeigt sich, dass diese bereits eine Woche vor Beginn der klinischen Symptomatik und Demyelinisierung im N. opticus beginnen unterzugehen (FAIRLESS et al., 2012). Betrachtet man vergleichend eine Sham-Versuchsgruppe, lässt sich hier kein Untergang retinaler Ganglienzellen darstellen (FAIRLESS et al., 2012). Unter dem Elektronenmikroskop betrachtet zeigen sich Vakuolen zwischen Axolemm und Myelinschicht sowie ein Schrumpfen der Axone (FAIRLESS et al., 2012). Obwohl keine Auswertung hinsichtlich dieser Gesichtspunkte der in der vorliegenden Arbeit angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte, zeigte sich rein optisch auch hier ein häufigeres Ablösen der Axone von ihren Myelinhüllen. Zusammenfassend konnten Inflammation und Demyelinisierung in der präklinischen Phase nicht dargestellt werden, die axonale Degeneration scheint aber zeitgleich mit dem Untergang der retinalen Ganglienzellen

zu beginnen (FAIRLESS et al., 2012). Betrachtet man den Zeitpunkt, zu dem es zu einer ersten Permeabilitätserhöhung der BBB kommt, so zeigt sich, dass eine enge zeitliche Korrelation zwischen der Permeabilitätserhöhung und dem Beginn des Untergangs von RGZs herzustellen ist (FAIRLESS et al., 2012). Des Weiteren lässt sich bei FAIRLESS et al., 2012 schon vor Beginn der klinischen Symptomatik eine erhöhte Anzahl an CD68-immunpositiven Zellen in den Nn. optici darstellen. Betrachtet man deren räumliche Verteilung, so lässt sich eine besonders hohe Anzahl im augennahen Anteil des N. opticus darstellen, während die Zahl CD68-immunpositiver Zellen in Richtung des Chiasmas immer weiter abnimmt. Auch hier lässt sich ein enger zeitlicher Zusammenhang mit der Permeabilitätserhöhung der BBB herstellen (FAIRLESS et al., 2012). Betrachtet man das Rückenmark der Tiere zur gleichen Zeit, ist auch hier erkennbar, dass Myelinpathologie und Inflammation noch nicht eingesetzt haben, es jedoch ebenfalls schon zu axonaler Degeneration gekommen ist. An manchen Stellen im Rückenmark konnten mit Beginn der klinischen Symptomatik vollkommen intakte Myelinhüllen ohne Axone dargestellt werden (FAIRLESS et al., 2012). Zu beachten ist, dass sich bereits eine Infiltration durch Immunzellen der Meningen der Nn. optici zeigt, bevor es zur eigentlichen Infiltration der Nn. optici und zur Ausbildung der klinischen Symptomatik kommt; zudem erfolgt bereits frühzeitig eine Infiltration des Liquors, der die Nn. optici umgibt (FAIRLESS et al., 2012; MANOGARAN et al., 2019; SHIN et al., 2021). Erst mit Beginn der zellulären Infiltration und der Inflammation zeitgleich mit Beginn der klinischen Symptomatik kommt es zur Demyelinisierung. Diese Entdeckungen legen nahe, dass die Neurodegeneration wahrscheinlich auch als primärer Prozess und nicht nur als sekundäre Folge der Demyelinisierung betrachtet werden sollte (FAIRLESS et al., 2012). All diese Erkenntnisse führen zu der Frage, ob eine Therapie, die auf die Verhinderung der Demyelinisierung und eine Unterstützung der Remyelinisierung im N. opticus ausgerichtet ist, überhaupt den gewünschten Effekt bringen kann, wenn bereits lange vor Beginn der Demyelinisierung der Untergang der RGZs stattfindet, deren Axone den N. opticus bilden. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die geringen Unterschiede in der Quantität an Olig2-immunmarkierten Zellen, sowie dem nicht vorhandenen Unterschied des Nachweises von OSP zwischen den Versuchsgruppen sein. Wenn bereits lange vor Beginn der Therapie der Untergang der retinalen Ganglienzellen erfolgt ist und es damit einhergehend zur Degeneration der Axone im N. opticus gekommen ist, kann auch unter Therapie keine Remyelinisierung erfolgen. Es kann also auch nicht zu einer Zunahme an Olig2-immunpositiven Zellen kommen. Zudem könnten die bei (FAIRLESS et al., 2012) beschriebenen Myelinhüllen um retrahierte Axone eine Erklärung für den nicht vorhandenen Unterschied im Nachweis von OSP sein. Weder Olig2 noch OSP geben eine Aussage über das Vorhandensein und die Funktionalität der Axone im N. opticus. An dieser Stelle wäre es

denkbar und interessant, zum gleichen Zeitpunkt eine erneute elektronenmikroskopische Darstellung anzufertigen, um die Axone besser beurteilen zu können.

Zudem ist zu beachten, dass eine verminderte retinale Dicke auch bei Patienten mit MS mittels optischer Kohärenztomographie gemessen wurde, die keine Episode einer optischen Neuritis erlebt hatten. Damit scheint die Pathologie in der Retina tatsächlich losgelöst von der Demyelinisierung im N. opticus zu sein (KIM et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Versuch Längsschnitte anzufertigen, um so einen möglichst umfassenden Überblick über die ablaufende Pathologie in den Nerven zu gewinnen. Die Kombination aus einer Einbettung, die primär auf die Anfertigung von Querschnitten ausgerichtet war, und der Schnittdicke hat es jedoch zum aktuellen Zeitpunkt unmöglich gemacht, ausreichend lange Abschnitte darstellen, die eine Auswertung und genauere Analyse sinnvoll erschienen ließen. Perspektivisch erscheint jedoch die Auswertung von Längsschnitten zur präzisen Analyse lokaler Unterschiede bzw. lokaler Inflammationszonen interessant, gerade weil im augennahen Anteil der Nerven in der Vergangenheit höhere Level an CD68-immunpositiven Zellen beschrieben wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass im augennahen Anteil eine stärkere Schädigung als im augenfernen Anteil zu erwarten ist (FAIRLESS et al., 2012).

6.4. Therapeutischer Ansatz durch Pannexin Inhibition

Panx1 ist zuständig für die Freisetzung von ATP aus verschiedenen Zelltypen. Dabei kann die Freisetzung durch verschiedene Signale getriggert werden. Panx1 wird ubiquitär exprimiert, unter anderem in neuronalen Vorläuferzellen und unreifen Neuronen (SWAYNE, BOYCE, 2017). ATP ist ein schneller Neurotransmitter; durch seine Freisetzung werden verschiedenste Prozesse vermittelt, wie zum Beispiel Wachstum und Differenzierung von Zellen, aber auch Zelluntergang. Der Effekt von ATP wird unter anderem vermittelt durch das Zusammenwirken von Panx1 und dem P2X7R Rezeptor. Das Zusammenwirken von Panx1 und dem P2X7R Rezeptor findet sich beispielsweise in neuronalen Vorläuferzellen. Auch hier kann durch ATP und Panx1 sowohl die Differenzierung als auch der programmierte Zelltod vermittelt werden (SWAYNE, BOYCE, 2017). Die Wirkung von Panx1 zeigt sich besonders, wenn man Panx1-defiziente Tiere betrachtet: Hier zeigt sich einerseits ein deutlich robusteres Neuritenwachstum und andererseits ein vermehrter Untergang von neuronalen Vorläuferzellen z.B. in der ventrikulären Zone des Gehirns (SWAYNE, BOYCE, 2017). Durch Panx1 wird im Rahmen eines Schlaganfalls die Apoptose der geschädigten Neuronen vermittelt. Im Anschluss an ein Hypoxie-Ischämie-Ereignis kommt es jedoch auch zur Inflammation, die über Panx1 vermittelt wird, da zerebrale Ischämie als potenter Stimulator des Inflammasoms wirkt (FREITAS-ANDRADE et al., 2017).

Blockiert man Panx1 pharmakologisch, wie zum Beispiel mittels Probenecid, so kommt es im Anschluss an einen ischämischen Schlaganfall zu verbessertem neuronalen und oligodendro-

zytären Überleben, einer verminderten Infarktarealgröße und verminderter Gliose, da über Panx1 nicht ATP als Signal für Makrophagen/aktivierte Mikroglia ausgeschüttet werden kann und es zu einer verminderten Aktivierung des Inflammasoms kommt (FREITAS-ANDRADE et al., 2017). Überträgt man diese Entdeckung auf die EAE würde man erwarten, dass es durch die Inhibition von Panx1 und die dadurch verhinderte Aktivierung des Inflammasoms zu einem verminderten Untergang von Oligodendrozyten und einer verminderten Demyelinisierung in den behandelten Versuchstieren kommt. In Tieren, in denen das Inflammasom durch die Gabe von MCC950 blockiert wurde, kommt es zu einem verminderten EAE-assoziierten Untergang von Neuronen, sowie zu einer verminderten Inflammation mit verbesserter Axonlänge und Axondicke (HOU et al., 2023; HOU et al., 2020). Verabreicht man Probenecid Versuchstieren, die eine EAE induziert bekommen haben und bereits einen klinischen Score von 2 erreicht haben, so kommt es einem Stopp des Voranschreitens der klinischen Symptomatik (HAINZ et al., 2017). Die Versuchstiere zeigen keine weitere Verschlechterung der klinischen Symptomatik und wiesen ein signifikant verlängertes Überleben verglichen mit den nicht behandelten Versuchstieren auf (HAINZ et al., 2017).

Analysiert man Schnitte des Rückenmarks der behandelten Tiere und vergleicht sie mit den nicht behandelten Tieren, so kommt es zu einer signifikanten Verminderung von CD3 positiven T-Zellen und Mikroglia, was gleichzusetzen ist mit einer verminderten Inflammation in den PBN-behandelten Tieren. Darüber hinaus zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der klinischen Schwere der EAE und der histologisch dargestellten Infiltration durch CD3- und CD68- immunpositiven Zellen (HAINZ et al., 2017). Es zeigte sich jedoch nicht nur eine im Vergleich stärkere Inflammation (mehr Infiltration durch CD3 positive T-Zellen und aktivierte Mikroglia), sondern auch eine deutlich verminderte Zahl an Oligodendrozyten und eine deutliche Läsionsvergrößerung in den nicht behandelten Tieren (HAINZ et al., 2017).

Dabei stellt sich die Frage, warum sich die Ergebnisse der besprochenen Studie nicht synonym in den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten: Im optischen Nerv war kein signifikanter Unterschied in der Expression von Olig2, OSP und Cx29 zwischen den Versuchsgruppen detektierbar und es ließ sich keine Verminderung der Demyelinisierung, keine Verminderung der Infiltration durch inflammatorische Zellen, beziehungsweise eine Zunahme der Expression von Olig2 oder OSP in den Nn. optici der Probenecid-behandelten Tiere darstellen. Ein Erklärungsansatz dafür könnte, wie zuvor besprochen, sein, dass im N. opticus nicht die Demyelinisierung der primäre Prozess und die Neurodegeneration der sekundäre Prozess ist, sondern Demyelinisierung und neuronale Degeneration als nebeneinander existierende Prozesse betrachtet werden müssen.

Die Demyelinisierung und Inflammation im Rückenmark und im N. opticus setzen zeitgleich mit Beginn der klinischen Symptomatik ein. Wartet man bis zur Entwicklung eines klinischen Score 2, finden sich bereits große Areale von Demyelinisierung und Neurodegeneration. Im

N. opticus wird die Neurodegeneration jedoch nicht nur durch die Demyelinisierung vorangetrieben, sondern auch durch Prozesse, die von der Retina ausgehen. Der protektive Effekt von Probenecid auf das Rückenmark lässt sich unter anderem anhand der höheren Zahlen von Oligodendrozyten erkennen. Es kommt zur Einwanderung von neuronalen Vorläuferzellen und zur Remyelinisierung von demyelinisierten Axonen (HAINZ et al., 2017). Sind jedoch im N. opticus durch den Untergang der retinalen Ganglienzellen weniger Axone vorhanden, die durch die neuronalen Vorläuferzellen myelinisiert werden können, kann sich unter Umständen auch kein protektiver Effekt von Probenecid einstellen. Zudem gilt weiterhin zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen den augenahen und augefernen Anteilen des N. opticus unterschieden wurde, was eine eingeschränkte Vergleichbarkeit bedeutet.

Drüber hinaus ist zu beachten, dass nicht nur eine Pannexinblockade, sondern auch viele andere Therapeutika, wie zum Beispiel die Blockade der sauren Sphingomyelinase durch Amitriptylin, oder die Behandlung mittels des CD52-Antikörpers Alemtuzumb, oder die Blockade des NLRP3 Inflammasoms mittels MCC950 einen positiven Effekt auf Versuchstiere in denen eine EAE induziert wurde haben kann (CHAMI et al., 2017; HAO et al., 2021; HOU et al., 2023). Bis alle Mechanismen, die an der Entstehung einer MS beteiligt sind, entschlüsselt sind, wird keine optimale Therapie zu finden sein.

6.5. Connexin 47

Veränderungen in der Expression glialer Connexine werden bei vielen demyelinisierenden Erkrankungen beobachtet. Beispiele dafür sind nicht nur Multiple Sklerose, sondern auch die konzentrische Sklerose Baló oder die Neuromyelitis Optica (MARKOULLIS et al., 2012; MASAKI et al., 2012; ZHAO et al., 2020).

Connexine als transmembranäre Proteine bilden Gap Junctions und ermöglichen dadurch die interzelluläre Kommunikation durch den Austausch von Signal- und Botenstoffen und Stoffwechsel durch den Austausch von Energiequellen (HERVÉ, DERANGEON, 2013).

Sowohl in akuten als auch in chronischen Läsionen, die durch MS verursacht werden, lässt sich eine Veränderung der glialen Connexinexpression beobachten. Da zelluläre Energiequellen, wie Laktat und Glukose, durch Gap Junctions von Astroglia an Oligodendrozyten weitergegeben werden, besteht die Möglichkeit, dass der Verlust von Oligodendrozyt-Astrozyt-Gap-Junctions durch den dadurch entstehenden Energieverlust an dem Prozess der Demyelinisierung beteiligt ist (MASAKI et al., 2013; MASAKI et al., 2012).

Cx47 wird besonders an den Perikaryen und proximalen Fortsätzen von Oligodendrozyten exprimiert (KAMASAWA et al., 2005). Seine Aufgabe besteht in der Bildung von homo- und heterotypen Gap junctions und dadurch der Vernetzung der einzelnen Zellen miteinander (KLEOPA et al., 2004). Cx47 bildet homotype Oligodendrozyt-Oligodendrozyt-Gap Junctions,

heterotype Oligodendrozyt-Oligodendrozyt-Gap Junctions mit Cx32 und heterotope Oligodendrozyt-Astrozyt Gap Junctions mit Cx43 (EUGENIN et al., 2012; KLEOPA et al., 2004; NAGY et al., 2004).

Mutationen des für Cx47 kodierenden Gens äußern sich in einer hypomyelinisierenden Leukodystrophie, die sich Pelizaeus-Merzbacher-ähnliche Krankheit nennt. Die Krankheit geht einher mit einer progressiven Spastik und Ataxie. Interessanterweise zeigen sich in Mäusen, in denen nur das kodierende Gen für Cx47 ausgeschaltet wurde (Cx47-KO-Mäuse), weder neurologische Symptome noch eine Demyelinisierung (BUGIANI et al., 2006). Betrachtet man jedoch KO-Mäuse, in denen nicht nur Cx47 sondern auch Cx32 ausgeschaltet wurde (Doppel-Knock out-Mäuse, dKO-Mäuse), so zeigt sich, dass weder eine suffiziente Myelinisierung, noch das Überleben der Tiere möglich war (MENICHELLA et al., 2003). Drei Wochen postnatal entwickeln die Cx32/Cx47-dKO-Mäuse einen groben Intentionstremor, dieser aggraviert im Laufe der Zeit. In der vierten bis fünften postnatalen Woche entwickeln die Mäuse tonische Krampfanfälle, Anfallsfrequenz und -intensität sind ebenfalls im Laufe der Zeit zunehmend, bis die Mäuse typischerweise im Alter von sechs Wochen versterben (MENICHELLA et al., 2003). Histologisch weisen die Mäuse deutlich dünnere Myelinschichten, bis hin zu Herden vollkommener Demyelinisierung, verglichen mit Kontroll-Tieren auf. Es zeigt sich des Weiteren eine ausgeprägte Vakuolisierung des Myelins und es zeigen sich apoptotische Zellen, die darauf hindeuten, dass der Untergang von Oligodendrozyten an den pathologischen Prozessen beteiligt ist (MENICHELLA et al., 2003). Zusammenfassend kann man sagen, dass der doppelte Verlust von Cx32 und Cx47 zu einem komplexen pathologischen Gesamtbild mit Demyelinisierung und oligodendrozytärem Untergang führt (MENICHELLA et al., 2003). Ableiten lässt sich aus diesen Entdeckungen, dass Kommunikation über Gap Junctions und das Vorliegen verschiedenster Connexine essenziell für den Erhalt der Myelinisierung im ZNS sind (MENICHELLA et al., 2003). Des Weiteren ist anzunehmen, dass vor allem die fehlende Möglichkeit zur Bildung von Astrozyt-Oligodendrozyt-Gap Junctions und die damit einhergehende Beteiligung am pan-glialen Synzytium ursächlich für die starke Ausprägung der Pathologie ist (MENICHELLA et al., 2003). Ebenso ist zu beachten, dass die Pathologie in den dKO-Mäusen vor allem im N. opticus und Pons sehr stark, jedoch nur milde im korticospinalen Bereich und N. trigeminus ausgeprägt ist (MENICHELLA et al., 2003).

Induziert man eine EAE in den Cx47-KO-Mäusen, so erkrankten die Cx47-KO-Mäuse verglichen mit Tieren, die Cx47 exprimieren, deutlich früher und schwerer (ZHAO et al., 2020). Untersucht man im nächsten Schritt die Myelinisierung des Rückenmarks der betroffenen Tiere, so zeigt sich auch hier, dass die Cx47-KO-Mäuse deutlich größere demyelinisierte Areale aufweisen. Die Tiere sind jedoch nicht nur von einer stärkeren Demyelinisierung betroffen. Es zeigt sich auch eine signifikant stärkere Infiltration durch CD3 immunpositive T-

Zellen und Makrophagen. Trägt man das Verhältnis der Stärke der Infiltration durch CD3 immunpositive T-Zellen und die Myelindichte im Rückenmark gegeneinander auf, so zeigt sich eine starke negative Korrelation (ZHAO et al., 2020).

Betrachtet man Wildtyp-Tiere und analysiert die Expression von Cx47 über den Krankheitsverlauf hinweg, so zeigt sich, dass es in der akuten Phase der EAE zu einer deutlichen Reduktion der Expression von Cx47 kommt (ZHAO et al., 2020). Doch nicht nur die Expression von Cx47 ist in der akuten Phase der EAE reduziert, auch die Expression oligodendrozytärer Gene im Allgemeinen ist deutlich vermindert. In den Cx47-KO-Mäusen zeigt sich eine deutlich erhöhte Expression pro- und antiinflammatorischer Gene, wobei die Erhöhung der Expression proinflammatorischer Gene auch in der chronischen Phase der EAE persistiert, während es zu einem Rückgang der Expression antiinflammatorischer Gene kommt. Genexpressionsanalysen zeigten, dass ein Knock-out von Cx47 zur vermehrten Expression solcher Gene führt, die eine Rolle in der angeborenen Immunantwort und in inflammatorischen Prozessen spielen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Cx47-KO-Mäuse in der EAE eine aggravierte akute und chronische Neuroinflammation zeigen (ZHAO et al., 2020). Cx47 scheint dabei eine tragende Rolle in der Kontrolle der Neuroinflammation zu spielen. Analysiert man die Mikroglia von Cx47-KO-Mäusen, so zeigten sich erhöhte Level an Chemokinen. Diese können durch verschiedene Prozesse zur verstärkten Einwanderung von CD3-immunpositiven T-Zellen führen und so eine verstärkte Neuroinflammation verursachen (ZHAO et al., 2020). In der chronischen Phase der EAE in Cx47-KO-Mäusen zeigen sich persistierend erhöhte Level an CD3-immunpositiven T-Zellen im ZNS der betroffenen Versuchstiere, die mit einer erhöhten Rückfallrate und einer aggravierten Klinik korrelieren (ZHAO et al., 2020). Dies ist also nicht durch ein Versagen der Remyelinisierung zu erklären, sondern durch ein verstärktes proinflammatorisches Milieu, verursacht durch den Knock-out von Cx47. Normalerweise nimmt in der chronischen Phase der EAE die Infiltration durch CD3-immunpositive T-Zellen und Makrophagen ab. Durch den Knock-out von Cx47 werden jedoch immer mehr CD-immunpositive T-Zellen rekrutiert und es kommt zu einem direkten neuronalen Schaden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ablation von Cx47 Oligodendrozyt-Astrozyt-Gap Junctions unterbricht und das ZNS-Gewebe in einen deutlich aggravierten proinflammatorischen Zustand versetzt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der PBN-Gruppe vergleichen mit den anderen Versuchsgruppen eine deutliche Hochregulierung der Expression von Cx47. Der in dieser Arbeit beobachteten Hochregulierung der Expression von Cx47 in der PBN-Gruppe kann also ein neuroprotektiver Effekt beigemessen werden. Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass Krankheiten bei denen es zu Fehlpaarung von Gap Junctions oder deren Unterbrechung kommt, im Allgemeinen mit dem Untergang von Astrozyten und Oligodendrozyten, Vakuolenbildung im Myelin, Inflammation und Einwanderung von Phagozyten einher gehen (LAPATO, TIWARI-WOODRUFF, 2018). Ein

intaktes pangliales Netzwerk, dessen fester Bestandteil Cx47 ist, hat daher große Bedeutung für die Aufrechterhaltung physiologischer ZNS-Funktionen (LAPATO, TIWARI-WOODRUFF, 2018).

Bisher eingesetzte Therapeutika konzentrieren sich nahezu ausschließlich auf immunmodulatorische und immunsuppressive Ansatzpunkte, versprechen also nur einen Erfolg in der Therapie der RRMS. Wenn es hingegen zum Übergang in die SPMS kommt und somit autoimmune Schädigungsmechanismen in den Hintergrund treten, zeigten die Therapeutika keine oder nur geringe Wirkung. Daher sollte sich die Entwicklung zukünftiger Therapeutika auf einen neuroprotektiven und reparaturbasierten Mechanismus konzentrieren. Auch hier ist auf die Sonderstellung des PBNs hinzuweisen. Durch den Ansatz am Panx1 wirkt es einerseits immunmodulatorisch und kann Einfluss auf die autoimmunvermittelten Schädigungsmechanismen nehmen, andererseits ist ihm durch die beobachtete Hochregulation der Expression von Cx47 ein neuroprotektiver Effekt zuzuschreiben (CONSTANTINESCU et al., 2011).

6.6. Pannexine, Connexine und assoziierte Erkrankungen

Pannexine und Connexine sind essenziell, um die physiologischen Funktionen des ZNS aufrecht zu erhalten. Connexine verbinden Neuronen durch die Bildung von Kanälen elektrisch miteinander, in Gliazellen hingegen sind sie beteiligt an einer Reihe homöostatischer Prozesse, wie der Pufferung von Kalium oder der Vermittlung glutamaterger Effekte (BATTEFELD et al., 2016; GALARRETA, HESTRIN, 1999).

Aber auch para- und autokrine Kommunikation wird mittels Connexinen und Pannexinen vermittelt, sodass sie eine wichtige Rolle in der Funktion und Plastizität von Synapsen spielen (PROCHNOW et al., 2012; THOMPSON et al., 2008). Dysregulation von Pannexinen und Connexinen geht einher mit neurodegenerativen Erkrankungen und auch im Rahmen der Entstehung von Epilepsien wird Pannexinen und Connexinen eine Rolle zugeschrieben. Es kommt zur Entkopplung panglialer Gap Junctions, dadurch zur nicht-regulierten Freisetzung von Neurotransmittern und dysregulierter neuronaler Aktivität (BEDNER et al., 2015; MARKOULLIS et al., 2012).

Neuronale Gap junctions sind jedoch nicht nur an der Regulation der Erregbarkeit einer Zelle, sondern auch an Prozessen wie Lernen und Erinnerung beteiligt. Cx36-KO-Mäuse zeigen ein deutlich schlechteres räumliches Lernvermögen und eine schlechtere Objekterkennung als Tiere, die Cx36 regulär exprimieren. Des Weiteren kommt es zu einer Verschlechterung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses (FRISCH et al., 2005). Besonders die Pufferung von Kalium stellt eine wichtige Aufgabe des panglialen Netzwerks dar. Astrozyten und Oligodendrozyten in der Nähe der depolarisierenden Zelle nehmen Kalium auf und eliminieren es durch den Abtransport mittels des Blutstroms. Dadurch kommt es zur Stabilisierung des Ruhepotentials

der Zellmembranen. Ist der Abtransport insuffizient, sinkt die Stabilität des Ruhepotentials und es kann zu spontaner Erregung der Neurone kommen (BATTEFELD et al., 2016). Bedenkt man diesen Mechanismus wird schnell klar, dass ein reibungsloser Ablauf der Pufferung essenziell ist, um epileptogene Potentiale zu verhindern. Entsprechend führt eine Störung dieses Ablaufs zu einer Übererregbarkeit der Neuronen (APOSTOLIDES, TRUSSELL, 2013). Pannexine und Connexine sind also wichtig für die physiologische neuronale Erregbarkeit und Resistenz des ZNS gegen Krampfanfälle (APOSTOLIDES, TRUSSELL, 2013).

Panx1 spielt aber nicht nur im Rahmen der Epilepsie eine Rolle, sondern durch seine Funktion als ATP-Kanal auch bei der Entwicklung von neuropathischem Schmerz und beim Opioid-Entzug. Durch die vermehrte Expression von Panx1 im Rückenmark von Versuchstieren, die neuropathischen Schmerz entwickeln, kommt es zur vermehrten Freisetzung von ATP. Die ATP-Freisetzung resultiert in Mikrogliaaktivierung und Inflammation in den betroffenen Regionen. Diese persistiert bei der Entwicklung von neuropathischem Schmerz. Neuropathischer Schmerz kann also als Folge chronischer Inflammation, getriggert durch die Freisetzung von ATP, betrachtet werden. Die Rolle von Panx1 an der Aufrechterhaltung dieser Prozesse wird gestützt durch die Beobachtung, dass Panx1-KO-Tiere keinen neuropathischen Schmerz entwickeln (LAPATO, TIWARI-WOODRUFF, 2018). Auch die vorliegende Arbeit legt nahe, dass Pannexine und Connexine durch ihre vielfältigen Funktionen und die Beteiligung an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen auch in Zukunft ein relevantes Forschungsthema bleiben.

6.7. Versuchsaufbau und Ausblick

Betrachtet man die vorliegende Arbeit und ihre Ergebnisse, so ist zu beachten, dass die Gruppengröße mit $n=3$ klein ist. Manche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hätten sich eventuell erst bei der Einbeziehung größerer Versuchsgruppen dargestellt. Dennoch zeigten sich auch bei dieser kleinen Entität signifikante Unterschiede, einerseits bei der Quantifizierung inflammatorischer Parameter zwischen EAE- und Kontrolltieren, andererseits auch bei den ultrastrukturell-morphologischen Auswertungen.

Die Versuchstiere für die vorliegende Arbeit wurden randomisiert einer größeren Population entnommen. Im Vergleich der beiden Populationen miteinander ist zu beachten, dass die Tiere der EAE-Gruppe der Gesamtpopulation mit einem durchschnittlichen klinischen Score von 4 schwerer erkrankt waren als die Tiere der Subpopulation der vorliegenden Arbeit, welche im Durchschnitt einen klinischen Score von 3 erreichten.

Des Weiteren gilt es zu bedenken, dass jeweils nur ein N. opticus der betroffenen Tiere aufgearbeitet wurde, so dass Gefrierschnitte angefertigt werden konnten. Der zweite N. opticus wurde in Paraffin eingebettet. Interessant wäre, in zukünftigen Studien das verbliebene Material der Versuchstiere aus beiden Fixierungsmethoden zu vergleichen und unter dem

Aspekt zu analysieren, ob sich ein ähnlicher Befund in beiden Nn. opticii erheben lässt. Gerade beim Menschen äußert sich eine optische Neuritis in der ersten Attacke unilateral und erst im Verlauf kann es zur Beteiligung des zweiten N. opticus kommen (CELLINA et al., 2019). Es wird beschrieben, dass nicht alle Nn. optici von EAE induzierten Versuchstieren eine optische Neuritis entwickeln (CELLINA et al., 2019). Dies ist jeweils nur ein sehr kleiner Bestandteil der gesamten Versuchsgruppe, könnte jedoch dafür Erklärung sein, dass sich z.B. in einem Versuchstier der Solvent-Gruppe nahezu keine Pathologie im N. opticus nachweisen ließ. An dieser Stelle wäre es besonders interessant, vergleichend den in Paraffin eingebetteten N. opticus zu analysieren. Ebenso wird auch beschrieben, dass es zu einem zweizeitigen Befall der Nn. optici kommen kann (Lin T. H. et al. 2017), auch dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlich starke Ausprägung der NNO zwischen den Versuchsgruppen sein.

Die Infiltration durch Immunzellen und die Inflammation im N. opticus beginnt an dessen augennahen Anteil, da hier die Blut-Hirn-Schranke durchlässiger ist als im weiteren Verlauf des Nervs. Dadurch zeigt zu Beginn der EAE der Anfangsteil des N. opticus eine stärkere Pathologie, mit Fortschreiten der klinischen Symptomatik kommt es jedoch auch zu einem globaleren Befall des N. opticus (MANOGARAN et al., 2018). Bei der Einbettung und Ausrichtung der Nn. optici beim Anfertigen der Gefrierschnitte wurde die Position des Nerven (Chiasma-nah *versus* augenah) nicht beachtet. Es wurden Serienschnitte angefertigt, um eine möglichst große Distanz innerhalb des Nervens abzubilden, trotzdem bleibt nach Anfertigung der Schnitte eine gewisse Menge Gewebe übrig. Bei manchen Tieren ist dieser nicht-analytierte Teil der augenahe Anteil, bei anderen der Chiasma-nahe Anteil. Bei weiterführenden Studien wäre die reproduzierbare Positionierung der Nerven ein wichtiger technischer Aspekt, um vergleichbare Daten zu erhalten. Des Weiteren wäre es spannend, eine Methode zu entwickeln, mit der längerstreckige Längsschnitte angefertigt werden können, da diese den besten Überblick über alle im N. opticus ablaufenden Prozesse liefern würden. In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass sich schon vor Beginn der klinischen Symptomatik eine Infiltration durch Immunzellen in den Meningen des N. opticus darstellen lässt (FAIRLESS et al., 2012). Daher könnte ein interessanter Vergleich sein, ob sich dies auch in den Meningen des Rückenmarks darstellen lässt.

Ebenso ließ sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachweisen, dass es in den Nn. optici vor Beginn der Demyelinisierung zum Zeitpunkt des Zellödems bereits zur Vakuolenbildung zwischen Axolemm und Myelinscheide sowie zur Atrophie der Axone gekommen war (FAIRLESS et al., 2012). Es könnte also auch die Auswertung der hier vorliegenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen unter diesen Gesichtspunkten erfolgen und in einem weiteren Schritt ein Vergleich mit PBN-behandelten Tieren durchgeführt werden.

Zudem ist anzumerken, dass bereits viele Untersuchungen den Nachweis von Cx32 im Rahmen der EAE betreffend erfolgt sind, sodass sich in der vorliegenden Arbeit gegen die erneute Untersuchung unter diesem Gesichtspunkt entscheiden wurde.

Inzwischen gibt es neue EAE-Induktionsprotokolle, welche durch die Verwendung von MOG₁₋₁₂₅, statt klassisch MOG₃₅₋₅₅, eine B-Zell-abhängige Form der EAE induzieren (JOLY et al., 2022). Hierbei zeigt sich eine mildere Ausprägung der EAE verglichen mit den klassischen Induktionsprotokollen. Es kommt zu anhaltenden Einschränkungen der Sehschärfe durch anhaltende Inflammation in den Nn. optici, jedoch ohne Tod der RGZs, sowie zu reversiblen retinalen Einschränkungen (JOLY et al., 2022). Damit wird die B-Zell-abhängige-EAE zu einem interessanten Modell, um Therapien zu testen, welche auf den Erhalt der Oligodendrozyten und Axone ausgerichtet sind (JOLY et al., 2022). Insgesamt werden B-Zell basierte Modelle durch die Präsentation von Autoantikörpern an Th-Zellen zu immer wichtigeren Forschungsmodellen um die Beteiligung des Myeloiden Systems an der Entstehung einer MS besser zu verstehen (GUPTA et al., 2023; THOMANN et al., 2023).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine EAE auch in optischen Nerven symptomatisch wird und in Inflammation, Zellinfiltration, Demyelinisierung sowie ultrastrukturellen Veränderungen resultiert. Die Applikation des Pannexin-Inhibitors PBN resultierte zum analysierten Zeitpunkt im optischen Nerv lediglich in einer Erhöhung der Cx47-Proteinexpression. Die funktionelle Bedeutung dieser Daten bleibt in weiterführenden Studien zu klären.

7. Bibliographie

1. Apostolides PF, Trussell LO (2013) Regulation of interneuron excitability by gap junction coupling with principal cells. *Nat Neurosci* 16:1764-1772
2. Bai X, Zhao N, Koupourtidou C, Fang LP, Schwarz V, Caudal LC, Zhao R, Hirrlinger J, Walz W, Bian S, Huang W, Ninkovic J, Kirchhoff F, Scheller A (2023) In the mouse cortex, oligodendrocytes regain a plastic capacity, transforming into astrocytes after acute injury. *Dev Cell* 58:1153-1169.e1155
3. Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14108-14113
4. Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46
5. Basu R, Sarma JD (2018) Connexin 43/47 channels are important for astrocyte/oligodendrocyte cross-talk in myelination and demyelination. *J Biosci* 43:1055-1068
6. Battefeld A, Klooster J, Kole MH (2016) Myelinating satellite oligodendrocytes are integrated in a glial syncytium constraining neuronal high-frequency activity. *Nat Commun* 7:11298
7. Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7:904-912
8. Beckmann A, Grissmer A, Krause E, Tschernig T, Meier C (2016) Pannexin-1 channels show distinct morphology and no gap junction characteristics in mammalian cells. *Cell Tissue Res* 363:751-763
9. Beckmann A, Hainz N, Tschernig T, Meier C (2019) Facets of Communication: Gap Junction Ultrastructure and Function in Cancer Stem Cells and Tumor Cells. *Cancers (Basel)* 11
10. Bedner P, Dupper A, Hüttmann K, Müller J, Herde MK, Dublin P, Deshpande T, Schramm J, Häussler U, Haas CA, Henneberger C, Theis M, Steinhäuser C (2015) Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138:1208-1222
11. Bergles DE, Richardson WD (2015) Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a020453
12. Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G (2007) Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282:31733-31743
13. Boassa D, Qiu F, Dahl G, Sosinsky G (2008) Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins. *Cell Commun Adhes* 15:119-132
14. Bompreszi R (2015) Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord* 8:20-30
15. Brunner C, Lassmann H, Waehnel TV, Matthieu JM, Lington C (1989) Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52:296-304
16. 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
17. Bugiani M, Al Shahwan S, Lamantea E, Bizzi A, Bakhsh E, Moroni I, Balestrini MR, Uziel G, Zeviani M (2006) GJA12 mutations in children with recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Neurology* 67:273-279
18. Cellina M, Floridi C, Rosti C, Orsi M, Panzeri M, Pirovano M, Ciocca M, Oliva G, Gibelli D (2019) MRI of acute optic neuritis (ON) at the first episode: Can we predict the visual outcome and the development of multiple sclerosis (MS)? *Radiol Med*

19. Ceronie B, Jacobs BM, Baker D, Dubuisson N, Mao Z, Ammoscato F, Lock H, Longhurst HJ, Giovannoni G, Schmierer K (2018) Cladribine treatment of multiple sclerosis is associated with depletion of memory B cells. *J Neurol* 265:1199-1209
20. Chami M, Halmer R, Schnoeder L, Anne Becker K, Meier C, Fassbender K, Gulbins E, Walter S (2017) Acid sphingomyelinase deficiency enhances myelin repair after acute and chronic demyelination. *PLoS One* 12:e0178622
21. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GS, Isakson BE, Bayliss DA, Ravichandran KS (2010) Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467:863-867
22. Colello RJ, Devey LR, Imperato E, Pott U (1995) The chronology of oligodendrocyte differentiation in the rat optic nerve: evidence for a signaling step initiating myelination in the CNS. *J Neurosci* 15:7665-7672
23. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517
24. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 164:1079-1106
25. Cruz-Herranz A, Dietrich M, Hilla AM, Yiu HH, Levin MH, Hecker C, Issberner A, Hallenberger A, Cordano C, Lehmann-Horn K, Balk LJ, Aktas O, Ingwersen J, von Gall C, Hartung HP, Zamvil SS, Fischer D, Albrecht P, Green AJ (2019) Monitoring retinal changes with optical coherence tomography predicts neuronal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 16:203
26. Dahl G (2018) The Pannexin1 membrane channel: distinct conformations and functions. *FEBS Lett* 592:3201-3209
27. Dai J, Bercury KK, Ahrendsen JT, Macklin WB (2015) Olig1 function is required for oligodendrocyte differentiation in the mouse brain. *J Neurosci* 35:4386-4402
28. Davis AA, Temple S (1994) A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372:263-266
29. Deng Z, He Z, Maksaev G, Bitter RM, Rau M, Fitzpatrick JAJ, Yuan P (2020) Cryo-EM structures of the ATP release channel pannexin 1. *Nat Struct Mol Biol* 27:373-381
30. Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I (2011) The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 18:21-29
31. Dooley MC, Foroozan R (2010) Optic neuritis. *J Ophthalmic Vis Res* 5:182-187
32. Doshi A, Chataway J (2017) Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med (Lond)* 17:530-536
33. Endong L, Shijie J, Sonobe Y, Di M, Hua L, Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A (2011) The gap-junction inhibitor carbenoxolone suppresses the differentiation of Th17 cells through inhibition of IL-23 expression in antigen presenting cells. *J Neuroimmunol* 240-241:58-64
34. Eugenin EA, Basilio D, Sáez JC, Orellana JA, Raine CS, Bukauskas F, Bennett MV, Berman JW (2012) The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:499-518
35. Fairless R, Williams SK, Hoffmann DB, Stojic A, Hochmeister S, Schmitz F, Storch MK, Diem R (2012) Preclinical retinal neurodegeneration in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 32:5585-5597
36. Fang M, Yamasaki R, Li G, Masaki K, Yamaguchi H, Fujita A, Isobe N, Kira JI (2018) Connexin 30 Deficiency Attenuates Chronic but Not Acute Phases of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Through Induction of Neuroprotective Microglia. *Front Immunol* 9:2588

37. Ffrench-Constant C, Miller RH, Burne JF, Raff MC (1988) Evidence that migratory oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells are kept out of the rat retina by a barrier at the eye-end of the optic nerve. *J Neurocytol* 17:13-25
38. Ford H (2020) Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Med (Lond)* 20:380-383
39. Freitas-Andrade M, Bechberger JF, MacVicar BA, Viau V, Naus CC (2017) Pannexin1 knockout and blockade reduces ischemic stroke injury in female, but not in male mice. *Oncotarget* 8:36973-36983
40. Frisch C, De Souza-Silva MA, Söhl G, Güldenagel M, Willecke K, Huston JP, Dere E (2005) Stimulus complexity dependent memory impairment and changes in motor performance after deletion of the neuronal gap junction protein connexin36 in mice. *Behav Brain Res* 157:177-185
41. Galarreta M, Hestrin S (1999) A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402:72-75
42. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221:7-14
43. Gao L, Macklin W, Gerson J, Miller RH (2006) Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Dev Biol* 290:277-286
44. Gupta S, Simic M, Sagan SA, Shepherd C, Duecker J, Sobel RA, Dandekar R, Wu GF, Wu W, Pak JE, Hauser SL, Lim W, Wilson MR, Zamvil SS (2023) CAR-T Cell-Mediated B-Cell Depletion in Central Nervous System Autoimmunity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 10
45. Hainz N, Wolf S, Tschernig T, Meier C (2016) Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation* 39:123-128
46. Hainz N, Wolf S, Beck A, Wagenpfeil S, Tschernig T, Meier C (2017) Probenecid arrests the progression of pronounced clinical symptoms in a mouse model of multiple sclerosis. *Sci Rep* 7:17214
47. Hainz N, Beckmann A, Schubert M, Haase A, Martin U, Tschernig T, Meier C (2018) Human stem cells express pannexins. *BMC Res Notes* 11:54
48. Hampton DW, Anderson J, Pryce G, Irvine KA, Giovannoni G, Fawcett JW, Compston A, Franklin RJ, Baker D, Chandran S (2008) An experimental model of secondary progressive multiple sclerosis that shows regional variation in gliosis, remyelination, axonal and neuronal loss. *J Neuroimmunol* 201-202:200-211
49. Hao W, Luo Q, Menger MD, Fassbender K, Liu Y (2021) Treatment With CD52 Antibody Protects Neurons in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice During the Recovering Phase. *Front Immunol* 12:792465
50. Harlow DE, Saul KE, Culp CM, Vesely EM, Macklin WB (2014) Expression of proteolipid protein gene in spinal cord stem cells and early oligodendrocyte progenitor cells is dispensable for normal cell migration and myelination. *J Neurosci* 34:1333-1343
51. Hayreh SS, Massanari RM, Yamada T, Hayreh SM (1981) Experimental allergic encephalomyelitis. I. Optic nerve and central nervous system manifestations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21:256-269
52. Herrera E, Agudo-Barriuso M, Murcia-Belmonte V (2019) Cranial Pair II: The Optic Nerves. *Anat Rec (Hoboken)* 302:428-445
53. Hervé JC, Derangeon M (2013) Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res* 352:21-31
54. Hou B, Zhang Y, Liang P, He Y, Peng B, Liu W, Han S, Yin J, He X (2020) Inhibition of the NLRP3-inflammasome prevents cognitive deficits in experimental autoimmune encephalomyelitis mice via the alteration of astrocyte phenotype. *Cell Death Dis* 11:377

55. Hou B, Yin J, Liu S, Guo J, Zhang B, Zhang Z, Yang L, Tan X, Long Y, Feng S, Zhou J, Wu Y, Wang X, Han S, Wang Z, He X (2023) Inhibiting the NLRP3 Inflammasome with MCC950 Alleviates Neurological Impairment in the Brain of EAE Mice. *Mol Neurobiol*
56. 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
57. 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
58. Joly S, Mdzomba JB, Rodriguez L, Morin F, Vallières L, Pernet V (2022) B cell-dependent EAE induces visual deficits in the mouse with similarities to human autoimmune demyelinating diseases. *J Neuroinflammation* 19:54
59. Kamasawa N, Sik A, Morita M, Yasumura T, Davidson KG, Nagy JI, Rash JE (2005) Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience* 136:65-86
60. Karussis D (2014) The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *J Autoimmun* 48-49:134-142
61. Kim NH, Kim HJ, Park CY, Jeong KS (2019) Retinal Degeneration After First-Ever Optic Neuritis Helps Differentiate Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front Neurol* 10:1076
62. Kipp M, van der Star B, Vogel DY, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S (2012) Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord* 1:15-28
63. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S (2017) Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol* 27:123-137
64. Kirchhoff F, Kettenmann H (1992) GABA Triggers a $[Ca^{2+}]_i$ Increase in Murine Precursor Cells of the Oligodendrocyte Lineage. *Eur J Neurosci* 4:1049-1058
65. Kleopa KA, Orthmann JL, Enriquez A, Paul DL, Scherer SS (2004) Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes. *Glia* 47:346-357
66. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y (2019) Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 8
67. Lapato AS, Tiwari-Woodruff SK (2018) Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial homeostasis & disease. *J Neurosci Res* 96:31-44
68. Libbey JE, Fujinami RS (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine* 29:3356-3362
69. Lin CH, Espreafico EM, Mooseker MS, Forscher P (1996) Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* 16:769-782
70. 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
71. Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148
72. Ludwig PE, Czyn CN (2019). Embryology, Eye Malformations. In StatPearls (Treasure Island FL, StatPearls Publishing LLC.).
73. Makris A, Piperopoulos A, Karmanioliou I (2014) Multiple sclerosis: basic knowledge and new insights in perioperative management. *J Anesth* 28:267-278
74. Mangalam A, Shahi SK, Luckey D, Karau M, Marietta E, Luo N, Choung RS, Ju J, Sompallae R, Gibson-Corley K, Patel R, Rodriguez M, David C, Taneja V, Murray J

- (2017) Human Gut-Derived Commensal Bacteria Suppress CNS Inflammatory and Demyelinating Disease. *Cell Rep* 20:1269-1277
75. Manogaran P, Walker-Egger C, Samardzija M, Waschkies C, Grimm C, Rudin M, Schippling S (2018) Exploring experimental autoimmune optic neuritis using multimodal imaging. *Neuroimage* 175:327-339
 76. Manogaran P, Samardzija M, Schad AN, Wicki CA, Walker-Egger C, Rudin M, Grimm C, Schippling S (2019) Retinal pathology in experimental optic neuritis is characterized by retrograde degeneration and gliosis. *Acta Neuropathol Commun* 7:116
 77. Manouchehrinia A, Constantinescu CS (2012) Cost-effectiveness of disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 12:592-600
 78. Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N, Hadjisavvas A, Roncaroli F, Reynolds R, Kleopa KA (2012) Gap junction pathology in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol* 123:873-886
 79. Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Yonekawa T, Matsuoka T, Isobe N, Motomura K, Wu XM, Tabira T, Iwaki T, Kira J (2012) Extensive loss of connexins in Baló's disease: evidence for an auto-antibody-independent astrocytopathy via impaired astrocyte-oligodendrocyte/myelin interaction. *Acta Neuropathol* 123:887-900
 80. Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J (2013) Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *PLoS One* 8:e72919
 81. Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL (2003) Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J Neurosci* 23:5963-5973
 82. Mills EA, Ogrodnik MA, Plave A, Mao-Draayer Y (2018) Emerging Understanding of the Mechanism of Action for Dimethyl Fumarate in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 9:5
 83. Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:143-150
 84. Nagy JI, Rash JE (2000) Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 32:29-44
 85. Nagy JI, Dudek FE, Rash JE (2004) Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 47:191-215
 86. Nazish S, Shahid R, Zafar A, Alshamrani F, Sulaiman AA, Alabdali M, Aljaafari D, Al Wabari E, Alkhamis FA (2018) Clinical Presentations and Phenotypic Spectrum of Multiple Sclerosis at a University Hospital in Saudi Arabia. *J Clin Neurol* 14:359-365
 87. O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258:299-302
 88. Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Büssow H, Schilling K, Steinhäuser C, Willecke K (2003) Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J Neurosci* 23:4549-4559
 89. Papaneophytou C, Georgiou E, Kleopa KA (2019) The role of oligodendrocyte gap junctions in neuroinflammation. *Channels (Austin)* 13:247-263
 90. Papaneophytou CP, Georgiou E, Karaiskos C, Sargiannidou I, Markoullis K, Freidin MM, Abrams CK, Kleopa KA (2018) Regulatory role of oligodendrocyte gap junctions in inflammatory demyelination. *Glia* 66:2589-2603
 91. Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071-5082
 92. Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, Bai D, Shao Q, Laird DW (2007) Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct

- characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci* 120:3772-3783
93. Penuela S, Gehi R, Laird DW (2013) The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:15-22
 94. Petzold A, Wattjes MP, Costello F, Flores-Rivera J, Fraser CL, Fujihara K, Leavitt J, Marignier R, Paul F, Schippling S, Sindic C, Villoslada P, Weinshenker B, Plant GT (2014) The investigation of acute optic neuritis: a review and proposed protocol. *Nat Rev Neurol* 10:447-458
 95. Pringle NP, Richardson WD (1993) A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* 117:525-533
 96. Prochnow N, Abdulazim A, Kurtenbach S, Wildförster V, Dvorientchikova G, Hanske J, Petrasch-Parwez E, Shestopalov VI, Dermietzel R, Manahan-Vaughan D, Zoidl G (2012) Pannexin1 stabilizes synaptic plasticity and is needed for learning. *PLoS One* 7:e51767
 97. Pyka-Fościk G, Fościk M, Pabijan J, Lis GJ, Litwin JA, Lekka M (2023) Changes in stiffness of the optic nerve and involvement of neurofilament light chains in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1869:166796
 98. Rowitch DH (2004) Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* 5:409-419
 99. Sabol RA, Noxon V, Sartor O, Berger JR, Qureshi Z, Raisch DW, Norris LB, Yarnold PR, Georgantopoulos P, Hrushesky WJ, Bobolts L, Ray P, Lebbly A, Kane RC, Bennett CL (2017) Melanoma complicating treatment with natalizumab for multiple sclerosis: A report from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR). *Cancer Med* 6:1541-1551
 100. Sanchez-Dalmau B, Martinez-Lapiscina EH, Pulido-Valdeolivas I, Zubizarreta I, Llufríu S, Blanco Y, Sola-Valls N, Sepulveda M, Guerrero A, Alba S, Andorra M, Camos A, Sanchez-Vela L, Alfonso V, Saiz A, Villoslada P (2018) Predictors of vision impairment in Multiple Sclerosis. *PLoS One* 13:e0195856
 101. Selewski DT, Shah GV, Segal BM, Rajdev PA, Mukherji SK (2010) Natalizumab (Tysabri). *AJNR Am J Neuroradiol* 31:1588-1590
 102. Shi Y, Feng Y, Kang J, Liu C, Li Z, Li D, Cao W, Qiu J, Guo Z, Bi E, Zang L, Lu C, Zhang JZ, Pei G (2007) Critical regulation of CD4+ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nat Immunol* 8:817-824
 103. Shin T, Ahn M, Kim J, Jung K, Moon C, Kim MD (2021) Visual Dysfunction in Multiple Sclerosis and its Animal Model, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: a Review. *Mol Neurobiol* 58:3484-3493
 104. Silverman W, Locovei S, Dahl G (2008) Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C761-767
 105. Soares RM, Dias AT, De Castro SB, Alves CC, Evangelista MG, Da Silva LC, Farias RE, Castanon MC, Juliano MA, Ferreira AP (2013) Optical neuritis induced by different concentrations of myelin oligodendrocyte glycoprotein presents different profiles of the inflammatory process. *Autoimmunity* 46:480-485
 106. Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83:311-327
 107. Swayne LA, Boyce AKJ (2017) Regulation of Pannexin 1 Surface Expression by Extracellular ATP: Potential Implications for Nervous System Function in Health and Disease. *Front Cell Neurosci* 11:230
 108. Syed YY (2018) Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 32:883-890

109. Ta SO (2018) Recent Advances in the Treatment for Multiple Sclerosis; Current New Drugs Specific for Multiple Sclerosis. *Noro Psikiyatr Ars* 55:S15-S20
110. Take-uchi M, Clarke JD, Wilson SW (2003) Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of *Vax* gene activity. *Development* 130:955-968
111. Teleshova N, Pashenkov M, Huang YM, Söderström M, Kivisäkk P, Kostulas V, Haglund M, Link H (2002) Multiple sclerosis and optic neuritis: CCR5 and CXCR3 expressing T cells are augmented in blood and cerebrospinal fluid. *J Neurol* 249:723-729
112. Tempone MH, Borges-Martins VP, César F, Alexandrino-Mattos DP, de Figueiredo CS, Raony Í, Dos Santos AA, Duarte-Silva AT, Dias MS, Freitas HR, de Araújo EG, Ribeiro-Resende VT, Cossenza M, H PS, R PdC, Ventura ALM, Calaza KC, Silveira MS, Kubrusly RCC, de Melo Reis RA (2024) The Healthy and Diseased Retina Seen through Neuron-Glia Interactions. *Int J Mol Sci* 25
113. Thomann AS, McQuade CA, Pinjušić K, Kolz A, Schmitz R, Kitamura D, Wekerle H, Peters A (2023) A B cell-driven EAE mouse model reveals the impact of B cell-derived cytokines on CNS autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120:e2300733120
114. Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, MacDonald JF, MacVicar BA (2008) Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science* 322:1555-1559
115. Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L, Zalc B (1995) Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* 15:1012-1024
116. Tripathi RB, Clarke LE, Burzomato V, Kessar N, Anderson PN, Attwell D, Richardson WD (2011) Dorsally and ventrally derived oligodendrocytes have similar electrical properties but myelinate preferred tracts. *J Neurosci* 31:6809-6819
117. Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, Tien AC, Kuo CJ, Chan JR, Daneman R, Fancy SP (2016) Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351:379-384
118. van der Star BJ, Vogel DY, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S (2012) In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11:570-588
119. Warf BC, Fok-Seang J, Miller RH (1991) Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J Neurosci* 11:2477-2488
120. Wegener A, Deboux C, Bachelin C, Frah M, Kerninon C, Seilhean D, Weider M, Wegner M, Nait-Oumesmar B (2015) Gain of *Olig2* function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination. *Brain* 138:120-135
121. Wei ZY, Qu HL, Dai YJ, Wang Q, Ling ZM, Su WF, Zhao YY, Shen WX, Chen G (2021) Pannexin 1, a large-pore membrane channel, contributes to hypotonicity-induced ATP release in Schwann cells. *Neural Regen Res* 16:899-904
122. Williams A, Piaton G, Aigrot MS, Belhadi A, Théaudin M, Petermann F, Thomas JL, Zalc B, Lubetzki C (2007) Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 130:2554-2565
123. Xin M, Yue T, Ma Z, Wu FF, Gow A, Lu QR (2005) Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in *Olig1*-null mice. *J Neurosci* 25:1354-1365
124. Zhang H, Wang S, Zhang Z, Hou M, Du C, Zhao Z, Vogel H, Li Z, Yan K, Zhang X, Lu J, Liang Y, Yuan S, Wang D, Zhang H (2023) Cryo-EM structure of human heptameric pannexin 2 channel. *Nat Commun* 14:1118
125. Zhao Y, Yamasaki R, Yamaguchi H, Nagata S, Une H, Cui Y, Masaki K, Nakamuta Y, Iinuma K, Watanabe M, Matsushita T, Isobe N, Kira JI (2020) Oligodendroglial

- connexin 47 regulates neuroinflammation upon autoimmune demyelination in a novel mouse model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:2160-2169
126. Zheng H, Liu Q, Zhou S, Luo H, Zhang W (2024) Role and therapeutic targets of P2X7 receptors in neurodegenerative diseases. *Front Immunol* 15:1345625
127. Zhou Q, Wang S, Anderson DJ (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 25:331-343

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Carola Meier für die Bereitstellung des Themas, ihr offenes Ohr, die vielen guten Ratschläge und die große Geduld.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Nadine Hainz für die freundliche Betreuung, die vielen netten Gespräche und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Ich danke Frau Andrea Rabung, Frau Franziska Müller, Herrn Alexander Grißmer und Frau Belinda König für die Unterstützung an verschiedensten Stellen, genauso möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.

Auch Frau Dr. Anja Beckmann gilt mein Dank für die selbstverständliche Unterstützung nach dem Abschied von Frau Dr. Hainz.

Abschließend möchte Ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Ehemann und besonders bei meinen Großeltern bedanken. Ohne euch und eure Unterstützung wäre mein Lebensweg anders verlaufen. Danke für eure offenen Ohren und das Anfeuern auf den letzten Metern. Euch widme ich die vorliegende Arbeit.