

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

**Undifferenzierte Oli-neu Zellen als *in vitro*-Modell für Multiple Sklerose:
Eine Cuprizon-induzierte Reduktion der Connexin29- und PLP-1-Expression ist
umkehrbar durch den Pannexin-1-Inhibitor Probenecid**

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

2025

Vorgelegt von:
Caroline Kremer
geb. am 06.08.1996 in Gerolstein

Tag der Promotion:	10.10.2025
Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig
1. Berichterstatterin:	Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. C. Meier
2. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. rer. nat. T. Hartmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Abstract.....	3
2 Einleitung	5
2.1 Multiple Sklerose	5
2.2 Modelle der Multiplen Sklerose.....	7
2.2.1 Das Cuprizone-Modell.....	8
2.3 Connexine und Gap Junctions.....	10
2.4 Pannexine, P2-Kanäle und Probenecid	13
2.5 Die Zelllinie Oli-neu	15
2.6 Ziel der Arbeit	17
2.7 Hypothesen	19
3 Material und Methodik	20
3.1 Materialien und Hilfsmittel	20
3.2 Kultivierung der Zelllinie Oli-neu	27
3.2.1 Beschichtung mit Poly-L-Lysin	27
3.2.2 Auftauen und Passagieren der Zellen	27
3.2.3 Aussaat und Behandlung der Zellen.....	28
3.3 RNA-Isolation	29
3.3.1 cDNA-Synthese	30
3.3.2 Reverse Transkriptase - Polymerase - Kettenreaktion und Gelelektrophorese .	31
.....	
3.3.3 Quantitative Real-Time PCR.....	32
3.3.4 Auswertung der qPCR	34
3.4 Immunfluoreszenzfärbung.....	35

3.4.1	Fixieren und Färbung der Zellen	35
3.4.2	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung	36
3.5	Freeze-Fracture Replica Immunolabeling (FRIL)	38
3.5.1	Vitrifizierung und Gefrierbruch	38
3.5.2	Markierung der Replika und Entfernung des Lexans	39
3.5.3	Auswertung der FRIL-Proben	40
3.6	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	48
4.1	Expression von Connexinen und oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteinen in undifferenzierten Oli-neu Zellen	48
4.1.1	Analyse der mRNA-Expression	48
4.1.2	Analyse der Immunfluoreszenzfärbung	50
4.1.3	FRIL-Analyse.....	52
4.1.4	Vergleich von undifferenzierten Oligodendrozyten und Schwann-Zellen im FRIL	54
4.2	Einfluss von Cuprizone bzw. Cuprizone und Probenecid auf Oli-neu Zellen.....	59
4.2.1	Analyse der mRNA-Expression nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN	59
4.2.2	Analyse der Immunfluoreszenzfärbung nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN	60
5	Diskussion	65
5.1	Analyse undifferenzierter Oli-neu Zellen.....	65
5.1.1	Olig2 und CNPase.....	65
5.1.2	Myelin-Proteine	66
5.1.3	Connexine	69
5.2	Connexin29 in undifferenzierten Oli-neu Zellen und Schwann-Zellen im FRIL	71
5.2.1	Rosetten und Präformierende Komplexe in undifferenzierten Oli-neu Zellen und Schwann-Zellen im FRIL.....	73
5.3	Cuprizone und Probenecid in undifferenzierten Oli-neu Zellen	75
5.3.1	Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN induziert keinen signifikanten Effekt auf Ebene der RNA-Analyse.....	76
5.3.2	Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN induziert einen signifikanten Effekt auf Ebene der Proteinanalyse.....	77

5.4	Methodendiskussion.....	81
5.5	Fazit und Ausblick	83
6	Literaturverzeichnis	86
7	Danksagung.....	98
8	Lebenslauf.....	99

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Astrozyt
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	Cryo Preparation Chamber
CPZ	Bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone / Cuprizon
C _t -Wert	Threshold Cycle-Wert
Cx	Connexin
DAPI	Diamidinphenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMT	disease modifying therapy
DNase	Desoxyribonuklease (DNase)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EAE	experimentellen autoimmunem Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FRIL	Freeze Fracture Replica Immunogold Labeling
fwd	forward / vorwärts
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O _d	Aqua destillate
H ₂ O _{dd}	Reinstwasser
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{DEPC}	Deionisiertes, mit Diethylprocarbonat behandeltes Wasser
HBSS	Hanks' Salt Solution

HCl	Salzsäure
IL	Interleukin
IMP	Intramembranpartikel
K ⁺	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LBB	Labeling Blocking Buffer
M	Molarität
M.	Morbus
mA	Milliampere
mbar	Millibar
MBP	Myelin Basic Protein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
MS	Multiple Sklerose
N	Normale
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	Nuklear Faktor Kappa B
nm	Nanometer
NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPC	neuronalen Progenitorzellen
O	Oligodendrozyt
O ₂	Sauerstoff
OPC	Oligodendrozyten – Precursor – Zellen
PBN	Probenecid
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipid Protein

PPMS	primär progredienten MS
Px1	Pannexin 1
qPCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
rev	reverse
RLT-Puffer	RNeasy Lysis Tissue Buffer
RNA	Ribonucleic Acid / Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Revolution per Minute
RRMS	relapsing-remitting MS
RT	Raumtemperatur
RT-Buffer	Reverse Transkriptase Buffer
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RW	Reinstwasser
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Sec.	Sekunden
SEM	Standard Error of Mean (Standardfehler)
SPB	Sörensen Phosphat-Puffer
SPMS	sekundär progredienten MS
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TNF	tumor necrosis factor
TRIS	Tris/Hydroxymethylaminomethan
u.a.	Unter anderem
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VCT	Vacuum Cryo Transfer System
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
x	mal
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vom Connexin zur Gap Junction.....	11
Abb. 2: Vom Pannexin zum Kanal	14
Abb. 3: Oli-Neu Zellen im undifferenzierten Stadium	16
Abb. 4: Exemplarische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung	37
Abb. 5: Nomenklatur der Replika	41
Abb. 6: Zellmembran und Kernmembran von Oli-neu Zellen im FRIL	42
Abb. 7: FRIL-Auswertung mittels Stereoaufnahmen	43
Abb. 8: Bestimmung der NND der Rosetten.....	44
Abb. 9: Bestimmung der NND der präformierenden Komplexe	45
Abb. 10: Bestimmung der NND der Connexone.....	46
Abb. 11: RT-PCR von oligodendrozytären Connexinen und Panx1	48
Abb. 12: RT-PCR der oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteinen	49
Abb. 13: Relative mRNA-Expression der Connexine und oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine	50
Abb. 14: Immunfluoreszenzfärbung von Cx29, MBP und PLP1 unter Kontrollbedingungen .	51
Abb. 15: Immunpositive Fläche von Cx29, MBP und PLP1	52
Abb. 16: Rosetten und präformierende Komplexe im FRIL der Oli-neu Zellen	53
Abb. 17: Verteilung der Rosetten und präformierenden Komplexe in Oli-neu Zellen.....	54
Abb. 18: Rosetten und präformierende Komplexe im FRIL des peripheren Nerven	55
Abb. 19: Vergleich zwischen Oli-neu Zellen und Schwann-Zellen im FRIL.....	56
Abb. 20: Bestimmung der NND der Connexone in Oli-neu Zellen und Schwann-Zellen	57
Abb. 21: NND der Connexone von Oli-Neu Zellen und Schwann-Zellen im Vergleich	58
Abb. 22: Relative mRNA-Expression von Cx29, Cx32 und Cx47 in Oli-neu Zellen nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN	59
Abb. 23: Relative mRNA-Expression von Mbp, Plp1, Olig2 und CNPase nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN	60
Abb. 24: Untersuchungsgruppen der Immunfluoreszenzfärbung	61
Abb. 25: Zellfläche der Oli-neu Zellen nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN.....	62
Abb. 26: Immunpositive Fläche für Cx29, MBP und PLP1 nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Werkzeuge und Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 2: Chemikalien.....	23
Tabelle 3: Kits.....	26
Tabelle 4: Software	26
Tabelle 5: Ansatz Sato-Medium (500ml)	27
Tabelle 6: Pipettierschema der Versuchsgruppen	29
Tabelle 7: PCR-Zyklus	31
Tabelle 8: Primerliste der qPCR	33
Tabelle 9: Zyklus der qPCR	34
Tabelle 10: Primärantikörper der Immunfluoreszenzfärbung	36
Tabelle 11: Sekundärantikörper der Immunfluoreszenzfärbung	36
Tabelle 12: Primärantikörper für FRIL	39
Tabelle 13: Sekundärantikörper für FRIL.....	39

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Multiple Sklerose (MS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche durch Symptome wie progrediente Lähmungszustände, vegetative Störungen oder kognitive und psychomotorische Veränderungen gekennzeichnet ist. Diese sind auf nervale Schädigungen im Rahmen von autoimmunbedingten Inflamationsreaktionen und Demyelinisierungen zurückzuführen. Hieran maßgeblich beteiligt sind die Oligodendrozyten, welche im differenzierten Stadium das Myelin bilden. Aber auch nicht-myelinisierende Oligodendrozyten-Vorläuferzellen werden durch die MS beeinträchtigt. Ein *in vivo*-Modell zur Untersuchung des Pathomechanismus der MS ist das Cuprizone-(CPZ)-Modell, anhand dessen die toxische Komponente der Erkrankung abgebildet werden kann. Durch die Applikation des Kupferchelators Cuprizone konnte ein Oligodendrozytenuntergang und folglich eine Demyelinisierung induziert werden.

Oligodendrozyten können im panglialen Synzytium mit anderen Gliazellen interagieren. Dabei erfolgt ein Informationsaustausch maßgeblich über Gap Junction-Kanäle. Diese bestehen aus Connexinen (Cx), einer Familie von Transmembranproteinen mit zelltypspezifischer Expression der Isoformen. Neben Connexinen zeichnen sich Oligodendrozyten durch die spezifische Expression weiterer Proteine, wie beispielsweise dem Proteolipid-Protein (PLP1) und dem Myelin-Basic Protein (MBP), aus. Oligodendrozyten exprimieren zudem weitere Membranproteine, die Pannexine, welche ebenfalls Membrankanäle ausbilden können. Diese Kanäle können durch den Wirkstoff Probenecid, einem Pannexin-1-Inhibitor, blockiert werden. Hierdurch konnten im Tiermodell präventive Effekte auf eine CPZ-induzierte Demyelinisierung dargestellt werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die oben genannten Proteine quantitativ und qualitativ in immortalisierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Zelllinie Oli-neu im undifferenzierten Zustand darzustellen. Weiterführend bestand die Überlegung, dass die Auswirkungen des CPZ auf Oligodendrozyten durch eine Dysfunktion von Connexinen oder anderen oligodendrozytenspezifischen Proteinen bedingt sein könnten, weshalb dies *in vitro* analysiert werden sollte. Außerdem konnte Pannexin-1 im Rahmen dieser Arbeit in Oli-neu Zellen nachgewiesen werden. Unter der Vorstellung, dass Oli-neu Zellen somit eine Zugangsmöglichkeit für PBN bieten könnten, um den CPZ-bedingten Effekten entgegenzuwirken, erfolgte die Untersuchung dieser Effekte *in vitro*. Hierdurch könnte eine Remyelinisierung durch Oligodendrozyten-Vorläuferzellen begünstigt werden, was so einen möglichen Ansatz zur Therapie der MS darstellen könnte.

Mittels RNA-Analyse konnten oligodendrozytäre Connexine und spezifische Proteine quantitativ und qualitativ in Oli-neu Zellen nachgewiesen werden. Auf Proteinebene erfolgte

der Nachweis mittels einer Immunfluoreszenzfärbung. Da sich unter den Connexinen Cx29 als sehr stark exprimiert erwies, wurden die Oli-neu Zellen hinsichtlich dieses Connexins mit der Gefrierbruchtechnik (FRIL, *Freeze-fracture replica immunogold labeling*, „Gefrierbruch-Replika Immunogoldmarkierung“) im Elektronenmikroskop untersucht. Hierbei konnte eine ultrastrukturelle Ähnlichkeit zu Cx29 im peripheren Nervensystem festgestellt werden, da sich dieses Connexin sowohl in Oli-neu Zellen als auch in Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems in hexamerer Formation, den sogenannten Rosetten, anordnete. Unter der Auffassung, dass hemihexamere Connexin-Anordnungen sich später zu ebensolchen Rosetten formieren könnten, wurden solche prägnanten Formationen als präformierende Komplexe benannt.

Durch die weiterführende CPZ-Applikation zeigte sich in Oli-neu Zellen hinsichtlich der Proteinexpression in der Immunfluoreszenzfärbung für Cx29, MBP und PLP1 ein signifikanter Abfall der immunpositiven Fläche. Durch die Applikation des PBN konnten diese Effekte für Cx29 und PLP1 umgekehrt werden.

Zusammengefasst bleibt zu unterstreichen, dass im Rahmen dieser Arbeit erstmals die ultrastrukturelle Darstellung von Cx29 in Oli-neu Zellen gezeigt werden konnte. Hieraus ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur weiterführenden Untersuchung der Oli-neu Zellen, z. B. hinsichtlich der Connexin-Funktion und der Connexin-Kopplung in Co-Kultivierung mit anderen Zellen. Darüber hinaus erfolgte erstmals der Nachweis von Panx1 in Oli-neu Zellen. Durch die anschließende Applikation des Pannexin-1-Inhibitoren PBN, konnten die CPZ-bedingten Effekte auf die Proteinsynthese von Cx29 und PLP1 umgekehrt werden. Somit stellt der Wirkstoff PBN einen möglichen Ansatz zur Therapie der MS dar, was es weiter zu untersuchen gilt.

1.2 Abstract

Immature Oli-neu cells as an *in vitro* model for multiple sclerosis: cuprizone-induced reduction of Connexin29- and PLP-1-expression can be reversed by the pannexin-1-inhibitor probenecid

Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease characterized by symptoms like progressive paralysis, vegetative disorders or cognitive changes. These symptoms are based on axonal damage in the context of autoimmune-related inflammatory reactions and demyelination. Mature oligodendrocytes are involved in this, since they are responsible for the formation of myelin in the central nervous system. In addition, non-myelinating oligodendrocyte precursor cells are also affected by MS. There are several models for the investigation of the pathomechanism of MS. The cuprizone (CPZ) model can be used to demonstrate the toxic component of MS. The application of the copper chelator cuprizone causes oligodendrocyte death and consequently demyelination.

Oligodendrocytes interact with other glial cells in the panglial syncytium by exchange of information, for example via gap junction channels. These channels consist of connexins (Cx), a family of transmembrane proteins with cell type-specific expression. In addition to this, oligodendrocytes specifically express other proteins, such as the proteolipid protein (PLP1) and the myelin basic protein (MBP). Furthermore, oligodendrocytes express another group of transmembrane proteins, the pannexins, which can form channels connecting the cytoplasm to the extracellular space. These channels can be blocked specifically by Probenecid (PBN). There are hints that PBN could reverse the effects caused by CPZ.

In this work, it was the aim to visualize the mentioned proteins quantitatively and qualitatively in immortalized and immature oligodendrocyte precursor cells of the cell line Oli-neu. Moreover, it was hypothesized that the CPZ-induced effects might be caused by a dysfunction of connexins or other oligodendrocyte-specific proteins. With regard to this, the CPZ effects were analyzed in immature Oli-neu cells. In this study, pannexin-1 was detected in Oli-neu cells for the first time. Thus, the effects of CPZ and a possible counteraction by PBN should be investigated in Oli-neu cells.

Via analysis of mRNA-expression, oligodendrocytic connexins and specific proteins were detected quantitatively and qualitatively in Oli-neu cells. For protein analysis, immunofluorescence staining was used. Cx29 was found to be very prominent. For examination of this connexin at the ultrastructural level, the freeze-fracture technique (FRIL, freeze-fracture replica immunogold labeling) was used. In both Oli-neu cells and Schwann-cells of the peripheral nervous system, Cx29 is frequently observed in hexameric formations, the so-called rosettes. Under the assumption that hemi-hexameric connexin arrangements could later form into these rosettes, they were called „präformierende Komplexe“.

Additionally, a CPZ-application to Oli-neu cells showed a significant decrease in the immunopositive areas of Cx29, MBP and PLP1. The application of PBN reversed these effects for Cx29 and PLP1.

To summarize, it remains to point out that the ultrastructural representation of Cx29 in Oli-neu cells was shown for the first time in this work. This opens many possibilities for further investigation of Oli-neu cells like the function of this connexin and potential coupling partners in co-cultivation with other cells. Furthermore, Panx1 was detected in Oli-neu cells for the first time. By the application of the Panx-1 inhibitor PBN, the CPZ-related effects on the protein synthesis of Cx29 and PLP1 could be reversed. This is why PBN represents a possible approach for the treatment of MS and should be investigated in more detail.

2 Einleitung

2.1 Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch progressive, immunvermittelte, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), welche die häufigste nicht-traumatische neurologische Beeinträchtigung junger Erwachsener darstellt [112]. In der Folge sind schwere Lähmungszustände sowie vegetative Störungen bis hin zu kognitiven und psychischen Veränderungen möglich. Laut der Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft leben weltweit ca. 2,8 Millionen Menschen mit der Erkrankung MS. Damit ist die Erkrankung zwar nicht häufig, jedoch potenziell schwerwiegend [151]. Zu den Risikofaktoren, die in Zusammenhang mit der Entstehung der Erkrankung gebracht werden, gehören vor allem eine Epstein-Barr-Virus-Infektion, das Rauchen, eine übermäßige Sonnenexposition und Übergewicht im Jugendalter [2].

Die Erkrankung lässt sich in die Phase der reversiblen und die Phase der irreversiblen Erkrankung unterteilen [72]. So werden 85% der Fälle der Verlaufsform der schubförmig remittierenden MS (*relapsing-remitting MS*, RRMS) zugeordnet, bei welcher es zu alternierenden Episoden neurologischer Defizite kommt, die sich phasenweise (un)vollständig zurückbilden. Diese Form kann definitionsgemäß in das Stadium der sekundär progredienten MS (*secondary progressive MS*, SPMS) übergehen, wobei sich die neurologischen Einschränkungen auch bei dieser Form zum Teil als schubförmig erweisen, jedoch insgesamt progredient voranschreiten. Dem gegenüber steht die seltenere Form (5-15%) der primär progredienten MS (*primary progressive MS*, PPMS), bei welcher es ohne vorherigen schubförmigen Verlauf von Beginn der Erkrankung an zu einem Progress der neurologischen Einschränkungen kommt [36,80].

Jedoch bestehen weiterhin offene Fragen hinsichtlich der genauen Ursache und des Pathomechanismus der Erkrankung. Diese konnten vor allem aufgrund des heterogenen Ausprägungsmusters bisher nicht allumfassend geklärt werden. Die maßgeblichen Bausteine der Erkrankung aus Inflammation und Neurodegeneration sind zwar bekannt, in welcher genauen zeitlichen Beziehung sie stehen, blieb bisher jedoch offen [55].

Durch die histologische Auswertung zahlreicher Biopsie- und Autopsieproben menschlichen Hirngewebes identifizierten Lucchinetti *et al.* zwei Arten der Läsionen in frühen Stadien der MS: In 70% der Läsionen kam es zunächst zu einer Reduktion der Oligodendrozyten, gefolgt von einem Wiederauftreten von Oligodendrozyten und einer simultanen Remyelinisierung. Bei den anderen 30% der Läsionen kam es zu einem massiven Untergang myelinisierender Zellen, eine Remyelinisierung blieb aus [81]. Die Verteilung dieser beiden Arten der Läsionen ähnelt der Anteilsverteilung der Ausbreitungsmuster der MS. Während die Läsionen, die eine

Remyelinisierung zeigten, typischerweise mit dem Verlauf einer RRMS einhergingen, konnten Läsionen, bei denen eine Remyelinisierung hingegen ausblieb, mit einer PPMS assoziiert werden [81]. Dieses Konzept der heterogenen Läsionen konnte in weiteren Betrachtungen in vier histologische Ausprägungsmuster feiner aufgeschlüsselt werden. So zeigt sich beispielsweise bei Typ I- und II-Läsionen eine ausgeprägte T-lymphozytäre und Makrophagen-assoziierte Entzündungsreaktion mit Anzeichen für eine Remyelinisierung. Typ III-Läsionen zeigen Zeichen von oligodendrozytärer Dystrophie und Apoptose. Auch Typ IV-Läsionen zeigen Oligodendrozytenverluste, wobei jedoch eine Remyelinisierung ausbleibt. Diese vier Ausprägungsmuster lassen sich wiederum immunpathologisch in zwei Hauptgruppen separieren. Beide Hauptgruppen zeigen T-Lymphozyten- und Makrophagen-dominierte Inflammation. Der Unterschied besteht darin, dass eine Hauptgruppe bei beschädigter Blut-Hirn-Schranke einen Erhalt der Oligodendrozytenzahl aufweist und somit Ähnlichkeiten zu einer autoimmunen Enzephalomyelitis widerspiegelt, bei der anderen Gruppe bei intakter Blut-Hirn-Schranke Hinweise für Oligodendrozytendystrophie und -sterben bestehen [82,134]. Diese Unterteilungen der Ausprägungsmuster passen zu der „*outside-in*“- und „*inside-out*“-Hypothese der MS [144,147]. Nach der „*outside-in*“-Hypothese wird davon ausgegangen, dass auf eine frühe autoimmune Inflammation eine Myelindegeneration folgt. Dem gegenüber steht die „*inside-out*“-Hypothese, wobei davon ausgegangen wird, dass nach einer Oligodendrozytenstörung eine Inflammation folgt [147]. Diese Überlegungen gehen wiederum konform mit den Beobachtungen zu den beschriebenen heterogenen MS-Läsionen von Lucchinetti *et al.*, wonach in den Läsionen, welche eine Oligodendrozytenreduktion und einen folgenden Anstieg der Oligodendrozytenzahl mit Remyelinisierung zeigen, der initiale Insult ohne Oligodendrozytenschaden vonstatten gehe. In den Fällen, in denen es jedoch zu einem ausgeprägten oder gar kompletten Oligodendrozytenuntergang kam, seien Oligodendrozyten frühe Angriffspunkte der Erkrankung [81].

In dieser Differenzierung wird deutlich, dass, trotz der Heterogenität der Läsionen und der Pathomechanismen, jeweils den Oligodendrozyten als myelinbildenden Gliazellen des ZNS eine große Rolle zugeschrieben werden kann. Da Oligodendrozyten den Energiebedarf von Neuronen modulieren, kommt es bei Beeinträchtigung dieser Zellen zu einer Dys- oder Demyelinisierung und schließlich zu einer axonalen Schädigung. Dies basiert auf einem Energiedefizit bedingt durch eine geringere Laktatproduktion der Oligodendrozyten, eine reduzierte Adenosintriphosphat-(ATP)-Synthese in oligodendrozytären Mitochondrien und eine Dysfunktion des Na⁺- und K⁺-Austausches. Dies kann wiederum die Bildung des Aktionspotentials beeinflusst und einer axonalen Ca²⁺-Dyshomöostase potenzieren [78].

Dieser Negativspirale der Demyelinisierung steht eine Wiederherstellung des Myelins durch eine Remyelinisierung gegenüber. Eine Remyelinisierung ist typischerweise ebenfalls in MS-Läsionen vertreten, verläuft jedoch lediglich inkomplett [4]. Es wird davon ausgegangen, dass

eine Remyelinisierung durch Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*; OPCs), aber auch durch ausgereifte Oligodendrozyten erfolgen kann. So konnten Duncan *et al.* [38] belegen, dass ausgereifte Oligodendrozyten, welche eine Demyelinisierung überlebten, ihre Fortsätze erweiterten und demyelinisierte Axone wieder myelinisierten. Tepavčević & Lubetzki [147] diskutieren jedoch einen Vorteil von OPCs gegenüber ausgereiften Oligodendrozyten, da diese möglicherweise eine höhere Effektivität der Remyelinisierung aufweisen.

Die Therapie der Multiplen Sklerose basiert derzeit größtenteils auf einer krankheitsmodifizierenden Therapie (*disease modifying therapy*, DMT). Hierbei soll durch die Applikation von rekombinanten Zytokinen oder monoklonalen Antikörpern eine Modulation der inflammatorischen Komponente der MS veranlasst werden und so einem Progress der Erkrankung entgegengewirkt und eine Rückfallrate der Schübe reduziert werden [156]. Das Myelin ist jedoch das am frühesten angegriffene Kompartiment der Erkrankung. Aus diesem Grund könnte die Sicherstellung von genügend Myelin eine vielversprechende therapeutische Strategie darstellen [78], um eine Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion sicherzustellen. Eine Möglichkeit hierzu bestünde in einer Forcierung der Remyelinisierung. Einen solch positiver Effekt auf das axonale Überleben durch eine Remyelinisierung von demyelinisierten Arealen konnte bereits im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) [96] und in MS-Läsionen gezeigt werden [67]. Außerdem könnte sich die Stimulation einer OPC-Rekrutierung in aktiven Phasen der Erkrankung positiv auf die Remyelinisierung auswirken [147]. Im Cuprizon-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass durch Motorstimulation eine Remyelinisierung sowohl durch OPCs als auch durch ausgereifte Oligodendrozyten gesteigert werden kann [4].

2.2 Modelle der Multiplen Sklerose

Es bestehen mehrere Modelle, anhand derer die Pathomechanismen der MS nachgebildet und untersucht werden können.

Eines dieser Modelle ist das Modell der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Durch seine Eigenschaften der Induktion einer primären T-Zell-vermittelten Inflammation und späteren Myelindegeneration durch eine zusätzliche Generierung myelinspezifischer Antikörper durch B-Lymphozyten [46], kann das EAE-Modell als Modell der „*outside-in*“ Hypothese gesehen werden [135,148]. Durch die Anwendung einer Antigeninjektion in Kombination mit dem „*complete Freund's adjuvant*“ [63] ist die gewünschte Immunreaktion durch eine Einzelinjektion induzierbar [46]. Da eine EAE durch unterschiedliche Antigene ausgelöst werden kann, unterscheiden sich auch die klinischen Ausprägungsmuster. So konnte beispielsweise durch Applikation des Peptids der Aminosäuren 139 bis 151 des Proteolipid-Proteins (PLP₁₃₉₋₁₅₁) eine *relapsing-remitting* EAE in

Swiss Jim Lambert–(SJL)-Mäusen [154], bzw. durch ein Peptid der Aminosäuren 35 bis 55 des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG₃₅₋₅₅) eine chronisch progrediente EAE in C57BL/6 Mäusen [98] ausgelöst werden.

2.2.1 Das Cuprizone-Modell

Dem EAE-Modell gegenüber kann das Cuprizone-(CPZ)-Modell als Beispiel für die „*inside-out*“ Hypothese der MS genannt werden. Hier besteht das zentrale Ereignis in der CPZ-induzierten Demyelinisierung. Diese ist auf den Untergang von Oligodendrozyten zurückzuführen [25,26]. Allerdings wird auch eine inflammatorische Wirkung durch die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen aus aktivierten Mikrogliazellen diskutiert [64,118].

Das CPZ-Modell wurde 1966 erstmals von Carlton [25] beschrieben. Biscyclohexanonoxaldehydhydrazon (Cuprizone, CPZ) ist ein Kupferchelator und löst unter anderem im Cortex und im Corpus callosum [40] Demyelinisierung, Astroglie und Mikrogliaaktivierung aus. Da die Demyelinisierung sowohl in der weißen Substanz (z. B. Corpus callosum), als auch in der grauen Substanz (z. B. Cortex) stattfindet, bildet das CPZ-Modell eine passende Grundlage für die Untersuchung der MS, denn auch hier lassen sich Läsionen in der weißen und grauen Substanz nachweisen [47,153]. Weitere Vorteile dieses Modells bestehen in der hohen Reproduzierbarkeit der Demyelinisierung und der Möglichkeit zur selektiven Untersuchung von Faktoren und Molekülen [65]. Wie bei jedem Modell werden jedoch auch einige Aspekte der Erkrankung weniger gut abgebildet. Hierzu gehört beispielsweise die Inflammation von Blutgefäßen oder auch die Präsenz von CD3-positiven T-Zellen, welche sich nicht durch das Modell reproduzieren lassen [65].

Makroskopisch spiegelt sich die Auswirkungen des CPZ in retardiertem Wachstum, Paresen der Hinterläufe und einer erhöhten Mortalität der Tiere wider [158]. Bereits durch eine fünf- bis sechswöchige Gabe von 0,2% CPZ kann im Tierversuch eine akute Demyelinisierung induziert werden. Nach einer Umstellung auf Standardfutter folgte eine spontane Remyelinisierung [25,26], einhergehend mit einer Regression der Symptomatik. Durch eine längerfristige CPZ-Diät (12 Wochen) wurde eine chronische Demyelinisierung hervorgerufen, worauf nach einer Umstellung auf Standardfutter lediglich eine retardierte Remyelinisierung folgte [65,93]. Auffällig ist jedoch, dass die Remyelinisierung bereits parallel zur Behandlung mit Cuprizone einsetzt [93].

Der genaue Wirkmechanismus des CPZ ist derzeit, trotz ausgiebiger Forschung, noch nicht allumfassend verstanden. Das zentrale Ereignis stellt der Oligodendrozytenuntergang dar. Dies wird zum einen durch Apoptose erreicht. Dieser programmierte Zelltod ist unter anderem durch runde, kondensierte und fragmentierte Zellkerne und eine gesteigerte Caspase-3-Aktivität charakterisiert [22,40]. Solche Auffälligkeiten konnten bereits zwei Tage nach Beginn der CPZ-Applikation in Oligodendrozyten des Corpus callosum und des Cortex detektiert

werden [22]. Da jedoch durch Hesse *et al.* [56] gezeigt werden konnte, dass in späteren Phasen keine Caspase-3-Aktivität mehr nachweisbar war, wird davon ausgegangen, dass am Oligodendrozytenuntergang auch Caspase-unabhängige Mechanismen beteiligt sind [160]. Ein solcher Mechanismus ist z. B. die Ferroptose. Durch die oxidative Degeneration von Lipiden in Abhängigkeit von freiem Eisen wird hierbei der Zelltod induziert [34]. Ein Anstieg von Ferroptosemarkern (*Nuclear receptor coactivator 4*, *Transferrinrezeptor 1* und *Cyclooxygenase-2*) war zwei bis vier Tage nach Beginn einer CPZ-Behandlung in Mäusen nachweisbar. Dies ging mit einem Rückgang von Ferritin und einer Freisetzung von bioaktivem Eisen einher, was wiederum eine Ferroptose begünstigen kann [60]. Die Frage, ob die Oligodendrozytendegeneration durch CPZ ebenfalls durch Nekroptose und Pyroptose induziert werden kann, bleibt weiterhin unklar [160]. Aufgrund der Funktion als Kupferchelator ist es zudem naheliegend, dass CPZ in den Kupferhaushalt des Organismus eingreift. Eine Störung des Kupferhaushaltes kann enorme Folgen haben, wie am Beispiel des Morbus Wilson [5] zu sehen ist. Der genaue CPZ-bedingte Einfluss auf den Kupferhaushalt ist jedoch nicht umfassend aufgeklärt. So gibt es gegensätzliche Angaben über einen Abfall des Kupferniveaus auf bis zu 50% des Normwertes [24,26], aber auch einen Anstieg des Kupferniveaus [158] wurde beschrieben. Darüber hinaus wurde dargelegt, dass durch CPZ eine Oxidation von Cu^{2+} zu Cu^{3+} begünstigt wird. Dies könnte ebenfalls relevant für eine Zytotoxizität des CPZ sein [101].

Bezüglich der Genese der oben beschriebenen Formen des Zelltodes bestehen mehrere Theorien, denn die Oligodendrozyten unterliegen sowohl intrinsischen als auch extrinsischen Einflüssen [160]. Ein möglicher intrinsischer Pathomechanismus für den Oligodendrozytenuntergang besteht in der Theorie der mitochondrialen Dysfunktion. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Homöostase der Mitochondrien durch CPZ dahingehend verändert wurde, dass diese anschwellen [23]. Dies konnte durch den Nachweis einer Aktivitätsminderung der Komplexe I, II und III der oligodendrozytären Atmungskette objektiviert werden [118]. So wird davon ausgegangen, dass durch die Auswirkung von CPZ auf die Oligodendrozyten ein Energiedefizit und eine Akkumulation oxidativer Spezies entsteht. Ebenjene könnten einen chemotaktischen Effekt auf Makrophagen haben, welche wiederum inflammatorische Zytokine sezernieren und darüber die Apoptose induzieren [118]. Da Oligodendrozyten jedoch auch aerobe Glykolyse betreiben können, müssen weitere Mechanismen, wie beispielsweise die Interaktion mit Neurotransmittern, berücksichtigt werden. CPZ sorgt für eine Steigerung des Glutamats im Hippocampus und Corpus callosum [71]. Eine Überstimulation der Glutamatrezeptoren führt zu einer Neurotoxizität. Eine solche toxische Reaktion bis hin zur Apoptose durch eine neuronale Reizüberflutung bei Überstimulation wird durch den Begriff der „*excitotoxicity*“ benannt [27].

Auch extrinsische Faktoren, wie die Interaktion von Oligodendrozyten mit anderen Gliazellen, spielen bei der Wirkung des CPZ eine Rolle. So folgen auf einen CPZ-bedingten Oligodendrozytenuntergang eine Hypertrophie und Zellvermehrung der Astrozyten [57]. Zum einen können dadurch vermehrt oxidative Enzyme, wie beispielsweise die Glutamatdehydrogenase, freigesetzt werden [64]. Dies kann zur Toxizität beitragen. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Astrozyten im CPZ-Modell die größte Quelle für die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie dem Tumor-Nekrose-Faktor (*tumor necrosis factor*, TNF), Interleukin (IL) 1 β und IL6 [13] darstellen. Über den Signalweg des Nuklear Faktors Kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF-kB) kann außerdem eine pro-inflammatorische Antwort der Astrozyten generiert werden und die Demyelinisierung im ZNS wird aggraviert [159]. Auch Mikrogliazellen wird hier vermutlich eine mediiierende Rolle zuteil, denn durch die Inhibierung dieser Zellen konnte einer CPZ-bedingte Toxizität abgewendet werden [118]. Der Effekt der Mikrogliazellen wird vermutlich durch pro-inflammatorische Zytokine wie den *colony-stimulating Faktor 1* (CSF1R) hervorgerufen [89].

All diese Einzelerkenntnisse stellen somit nur kleine Puzzleteile in einer großen Kaskade von möglichen Pathomechanismen dar. Doch auch wenn nicht alle Zusammenhänge allumfassend verstanden sind, können die Auswirkungen des CPZ-Modells zu Forschungsgründen im Bereich der MS bereits nutzbar gemacht werden.

2.3 Connexine und Gap Junctions

Im panglialen Synzytium erfolgt ein Großteil der interzellulären Kommunikation über Gap Junction-Kanäle. Diese werden aus Connexinen gebildet. Connexine sind Proteine, die aus vier Transmembrandomänen bestehen. Die N- und C- terminalen Bereich der Proteine sowie die Schleife zwischen den Transmembrandomänen zwei und drei befinden sich im Zytoplasma der jeweiligen Zelle. Die Verbindungsschleifen zwischen der ersten und zweiten bzw. der dritten und vierten Transmembrandomäne befinden sich im Extrazellulärraum. Diese sogenannten extrazellulären *Loops* besitzen jeweils drei Cysteinreste, durch welche die Tertiärstruktur gestützt und ein Ankoppeln von Connexonen ermöglicht wird [21,69,103]. In einer Zellmembran bilden sechs Connexine durch ihre hexamere Anordnung um eine zentrale Pore ein Connexon, auch als Hemikanal bezeichnet. Zur Ausbildung einer Gap Junction binden zwei Connexone aneinander und ein interzellulärer Austausch von Molekülen von einer Größe bis zu 1 kDa wird ohne Kontakt zum Extrazellulärraum ermöglicht.

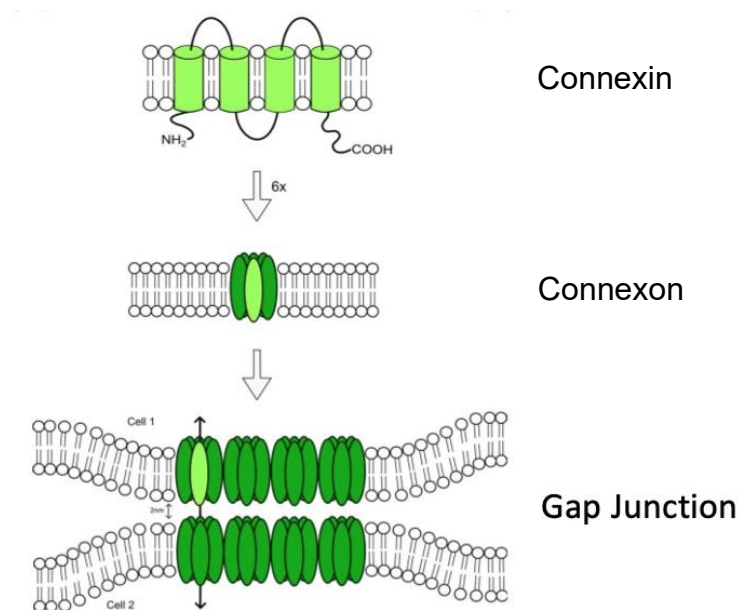


Abb. 1: Vom Connexin zur Gap Junction

Connexine bestehen aus vier Transmembrandomänen. Sechs Connexine können sich zu einem Hemikanal, dem Connexon formieren. Zwei Connexone aus benachbarten Zellen können wiederum einen Gap Junction-Kanal bilden. (Modifiziert nach Beckmann et al. [10]).

Es gibt 20 verschiedene Connexine der Maus und 21 verschiedene Connexine des Menschen. Davon sind 19 Connexine ortholog, was bedeutet, dass sie in beiden Spezies vorkommen [141]. Für die Connexine werden zwei Nomenklaturen verwendet: Zum einen werden sie entsprechend ihrer theoretischen Molekülmasse, zum anderen anhand der Reihenfolge, in der sie entdeckt wurden, klassifiziert. Im Folgenden wird die von der Molekülmasse abgeleitete Nomenklatur verwendet.

Durch die unterschiedlichen Arten von Connexinen sind verschiedene Kombinationsmöglichkeiten denkbar. In der simpelsten Formation ist ein Connexon aus sechs gleichen Connexinen zusammengesetzt, das Connexon ist somit homomer. Besteht ein Connexon jedoch aus unterschiedlichen Connexinen, wird es als heteromer bezeichnet. Auf übergeordneter Ebene ergeben sich so verschiedene Kombinationsmöglichkeiten für die einzelnen Gap Junction-Kanäle. Besteht ein Kanal aus zwei gleichen Connexonen, wird er als homotypischer Kanal bezeichnet. Ist er aus unterschiedlichen Connexonen zusammengesetzt, was bei der Verbindung zwischen zwei unterschiedlichen Zelltypen nicht unüblich ist, wird er als heterotypisch bezeichnet [69].

Durch die Ausbildung von Gap Junctions bilden Gliazellen ein Kommunikationsnetzwerk. So können Astrozyten (A) untereinander durch autologe Gap Junctions verbunden werden (A/A Gap Junction). Im Gegensatz dazu wurden zwischen Oligodendrozyten (O) zunächst keine autologen Gap Junctions gefunden [91,92]. Mittlerweile konnte jedoch sowohl *in vitro* als auch

in vivo Zeichen für autologe Gap Junctions zwischen Oligodendrozyten (O/O Gap Junction) nachgewiesen werden [150]. Außerdem sei genannt, dass das Ausbilden von Gap Junctions zwischen Gliazellen und Neuronen widerlegt werden konnte [123].

Da in unterschiedlichen Zellen auch unterschiedliche Connexine exprimiert werden, besteht vor allem an Verbindungsstellen zwischen diesen die Voraussetzung zur Bildung allogener Gap Junctions [33]. Astrozyten bilden die Isoformen Cx26, Cx30 und Cx43, Oligodendrozyten bilden die Isoformen Cx29, Cx32 und Cx47 [3,33,108,109]. Aus diesem Grund sind diese Astrozyten/Oligodendrozyten Gap Junctions (A/O Gap Junction) (bi-, tri- oder multi-) heterotypisch, denn es koppeln stets unterschiedliche Connexine [126]. Jedoch ergeben nicht alle Connexin-Paarungen durchlässige Kanäle, eine Paarung aus Cx32 und Cx43 erwies sich beispielsweise als undurchlässig [21]. Heterotypische Verbindung aus Cx32:Cx30, Cx32:Cx26, Cx47:Cx43 und Cx47:Cx30 sind jedoch permeabel [83,109,116]. Cx29 der Oligodendrozyten spielt vermutlich eine geringfügigere Rolle bei der Ausbildung permeabler interzellulärer A/O Gap Junctions [110].

Connexine des ZNS sind darüber hinaus auch in Bezug auf ihre subzelluläre Verteilung nicht identisch [107]. Cx47, welches am häufigsten an A/O Gap Junctions beteiligt ist, wird unabhängig von der Größe der Myelinscheide vor allem auf Perikaryen und proximalen Fortsätzen der Oligodendrozyten ausgebildet. Im Gegensatz dazu ist Cx32 bevorzugt auf dem äußeren Blatt großer Myelinflächen auffindbar. Darüber hinaus wird Cx32 eine besondere Aufgabe zuteil: Im Bereich des paranodalen, nicht-kompakten Myelins bildet es homotypische, reflexive Gap Junctions zwischen den einzelnen Myelinschichten und verkürzt so beispielsweise den Weg des Kaliums vom Axon durch das Myelin. Cx29 wird hingegen überwiegend auf kleinen internodalen und juxtaparanodalen Myelinflächen sowie auf der adaxonalen Membran exprimiert [3,66,125].

Ein weiteres Connexin ist das Cx45. Dieses konnte weder in reifen Astrozyten noch in Oligodendrozyten nachgewiesen werden, sondern in neuronalen Subpopulationen [94]. Interessanterweise konnte Cx45 jedoch auch in NG2-positiven O2A-Vorläuferzellen nachgewiesen werden [94]. Diese Zellen können in späteren Stadien sowohl zu Oligodendrozyten als auch zu Astrozyten heranreifen [148]. Allerdings ist zu erwähnen, dass zwischenzeitlich kontroverse Berichte über den Nachweis von Cx45 in Oligodendrozyten und die Co-Expression mit Cx32 bestanden [70]. Die für Cx45 angenommene RNA-Sequenz wies jedoch viele Übereinstimmungen zu der Sequenz von Cx47 auf. Auch eine Antikörperanalysen ergab, dass sowohl Connexine, die eigentlich als Cx45 angenommen worden waren, als auch Cx47 vom selben Antikörper erkannt wurden. Somit stellte dies die Spezifität des Antikörpers für Cx45 in Frage [94] und es wird weiterhin davon ausgegangen, dass Cx45 nicht in ausgereiften Oligodendrozyten vorhanden ist.

Da Gap Junctions maßgeblich an der interzellulären Kommunikation beteiligt sind, wurde bereits begonnen, ihre Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen zu untersuchen [149]. In postmortalen Untersuchungen des Gehirns eines Patienten mit MS konnten Markoullis et. al. bereits einen Rückgang der oligodendrozytären Cx32 und Cx47 zeigen, was sowohl einem intramyelinen als auch einem interoligodendrozytären Rückgang von Gap Junctions entspricht [86]. Hingegen zeigte sich bei interastrozytären Gap Junctions ein Anstieg, was eine Astrogliose repräsentiert [86]. Diese Beobachtungen konnte dieselbe Arbeitsgruppe ebenfalls am EAE-Modell der Maus feststellen. Durch die Induktion der Immunreaktion kam es zu einem Rückgang von Cx47 und Cx32 in der weißen Substanz und in den demyelinisierten Läsionen [85]. Dies wurde somit als möglicher Mechanismus für den Progress der MS gewertet [85]. Auch konnte gezeigt werden, dass ein Gap Junction-Defizit, wie es beispielsweise in Cx32 *Knockout*-Mäusen der Fall ist, zu einer erhöhten Myelinvulnerabilität gegen inflammative Prozesse im EAE-Modell führte [85].

Parenti *et al.* beobachteten bereits den Einfluss von Cuprizone auf Cx47. Zunächst wurde die Expression von Cx47 im Lauf des oligodendrozytären Reifungsprozesses untersucht, woraus sich eine Schlüsselrolle von Cx47 für die Differenzierung von Oligodendrozyten und die Myelinogenese ableiten ließ [117]. Nach Applikation von CPZ wurde parallel zur Demyelinisierung zunächst eine Überexpression von Cx47 in Oligodendrozyten beobachtet. Im Rahmen der Remyelinisierung normalisierte sich die Expression wiederum auf das vorbestehende Niveau [117].

2.4 Pannexine, P2-Kanäle und Probenecid

Ähnlich wie die Connexine sind auch Pannexine (Panx) an der interzellulären Kommunikation beteiligt. Anders als die Connexine bilden Pannexine jedoch Einzelmembrankanäle zwischen Zytosol und Extrazellularraum. Es sind drei Unterformen (Panx1, Panx2, Panx3) der Pannexine bekannt. Der Aufbau der Pannexine ist sehr ähnlich zu dem der Connexine. Sie bestehen ebenfalls aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Verbindungen und einer intrazellulären Verbindung. Unterschiedlich sind die Anteile des Cysteins und des glykosylierten Asparagins [1,7]. Die Expression von Panx1 und Panx2 konnten Domercq *et al.* [37] bereits in Oligodendrozytenkulturen nachweisen. Auch Pannexine oligomerisieren und bilden somit aus sechs (Panx1, Panx3) oder acht (Panx2) Pannexinen ein Pannexon [16]. In aktuellen Arbeiten werden allerdings auch Hinweise auf eine heptamere Formation von Panx1 gegeben [49], womit bestimmte andere Eigenschaften und Aktivierungsmechanismen verbunden sein könnten.

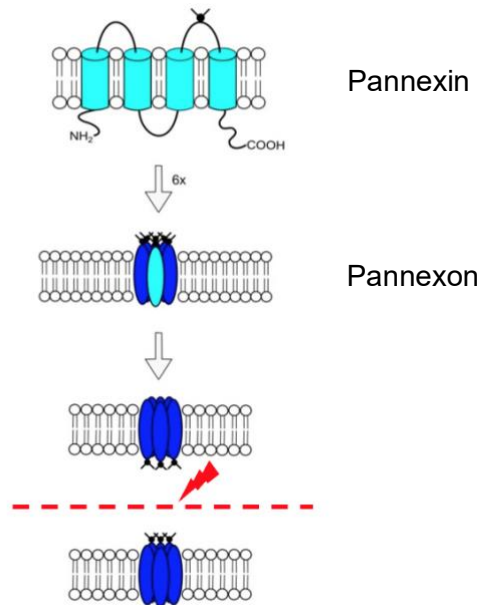


Abb. 2: Vom Pannexin zum Kanal

Pannexine bestehen aus vier Transmembrandomänen, anders als bei den Connexinen befindet sich bei den Pannexinen am zweiten extrazytosolischen Loop eine Glycosylierung am Asparaginrest. Sechs (Panx1, Panx3) oder acht (Panx2) Pannexine können sich zu einem Kanal, dem Pannexon, formieren. Pannexone bilden keine Gap Junctions, sondern fungieren als Einzelmembrankanäle zwischen Zytosol und Extrazellulärraum. (modifiziert nach Beckmann et al. [10])

Pannexone sind Einzelmembrankanäle und bilden nach derzeitiger Auffassung keine Gap Junctions aus [29,102]. Sie verbinden das intrazelluläre Zytoplasma mit dem Extrazellulärraum [143]. So ist durch diese Kanäle ein Adenosintriphosphat- (ATP) und Calcium-Efflux in den Extrazellulärraum möglich [6,7]. Pannexin-1-Kanäle können sowohl durch purinerge P2Y Rezeptoren [76], als auch durch ionotrope P2X7 Rezeptoren [77] aktiviert werden. Durch die Bindung von ATP an die Rezeptoren kommt es zur Aktivierung des Kanals und zu einer dadurch bedingten Permeabilität für ATP, was einem positiven Feedback entspricht. Steigt die ATP-Konzentration in Nähe der Pannexon-Kanäle, verschließen sich diese wieder, was einem negativen Feedback entspricht [30]. Die Arbeitsgruppe um Domercq *et al.* [37] konnte bereits zeigen, dass eine solche ATP-Freisetzung durch Pannexone auch in Oligodendrozytenkulturen möglich ist.

In Anbetracht der Annahme des Zwei-Ursachen-Modells der Neuroinflammation („*The two-hit model of neuroinflammation*“) [42] ist exogenes ATP an der Modulation der Mikrogliaantwort in der neuronalen Inflammationskaskade beteiligt [41]. Demnach kommt es nach einem ersten Ereignis, wie beispielsweise einer Nervenverletzung oder einer autoimmunen Reaktion, zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen. In einem zweiten Schritt wird ATP aus beschädigten Neuronen ins extrazelluläre Milieu freigesetzt. Dieses übermäßig freigewordene ATP aktiviert wiederum purinerge Rezeptoren und moduliert somit die Gliaaktivität und die neuronale Reaktion auf Entzündungsreaktionen [42]. Über P2X7-Kanäle kann durch eine ATP-

gesteuerte Aktivierung somit zum Beispiel wiederum die Freisetzung von ATP und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL6 und TNF-alpha induziert werden. Ein hierbei protektiver Faktor ist, dass P2X7-Rezeptoren nur eine geringe Affinität für exogenes ATP besitzen und so nur durch pathologisch erhöhte ATP-Konzentrationen die Rezeptoren aktiviert werden. Dies unterstützt die These, dass exogenes ATP als „Alarmsignal“ fungiert [42]. Die Freisetzung von ATP führt außerdem über das Panx1 und die purinergen P2-Rezeptoren zu einer Aktivierung des Inflammasoms, was durch eine Aktivierung der pro-Caspase-1 [88] zu einer Freisetzung von weiteren pro-inflammatorischen Stoffen wie IL-18 und IL-1 β führt [119,137].

Der Wirkstoff Probenecid (PBN; 4-Dipropylsulfamoylbezoesäure) ist ein Inhibitor von Pannexin-1-Kanälen [136] und ein direkter Inhibitor des P2X7-Rezeptors [15]. Somit bietet PBN die Möglichkeit, die oben beschriebene Kaskade zu unterbinden. Eine Interaktion von PBN mit Connexin-Kanälen konnte bisher nicht beobachtet werden [136]. Ursprünglich wurde Probenecid aufgrund seiner hemmenden Eigenschaft der Rückresorption von Harnsäure an den Nierentubuli zur Therapie von Gicht und Hyperurikämie eingesetzt [145]. Da die Gicht eine inflammatorische Erkrankung ist, kann die Hemmung von Pannexin-1-Kanälen und P2X7-Rezeptoren durch PBN möglicherweise einen positiven Nebeneffekt der PBN-Behandlung darstellen [136].

Wie bereits erläutert, ist die MS eine Erkrankung mit einer ausgeprägten inflammatorischen Komponente. Dieser Aspekt wird sowohl durch das EAE-Modell, als auch in kleinerem Anteil durch das CPZ-Modell abgebildet. Hainz *et al.* [50,51] konnten bereits in beiden Modellen an Tierversuchen zeigen, dass durch die Applikation des Medikamentes Probenecid der Inflammation und der Demyelinisierung entgegengewirkt werden kann.

2.5 Die Zelllinie Oli-neu

Bei dieser Zelllinie handelte es sich um immortalisierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die nach der Vorlage von Jung *et al.* aus dem Hirngewebe 15-Tage alter NMRI-Mäuseembryonen herangezüchtet wurden [61]. Oli-neu Zellen exprimieren, ausgehend vom c-neu Proto-Onkogen, das t-neu Onkogen. In diesem Gen ist durch eine Punktmutation die dauerhafte Aktivierung der Tyrosinkinase induziert, wodurch die Immortalisierung hervorgerufen wird [61]. Darüber hinaus besitzen sie die phänotypischen und elektrophysiologischen Charakteristika normaler Oligodendrozyten-Vorläuferzellen [61]. Die Differenzierung der Oli-neu Zellen kann durch die Kultivierung mit dibuturyl zyklischem-Adenosinmonophosphat (dbcAMP) induziert werden, jedoch ist die vollständige Entwicklung bis hin zu myelinbildenden Oligodendrozyten nicht möglich [61].

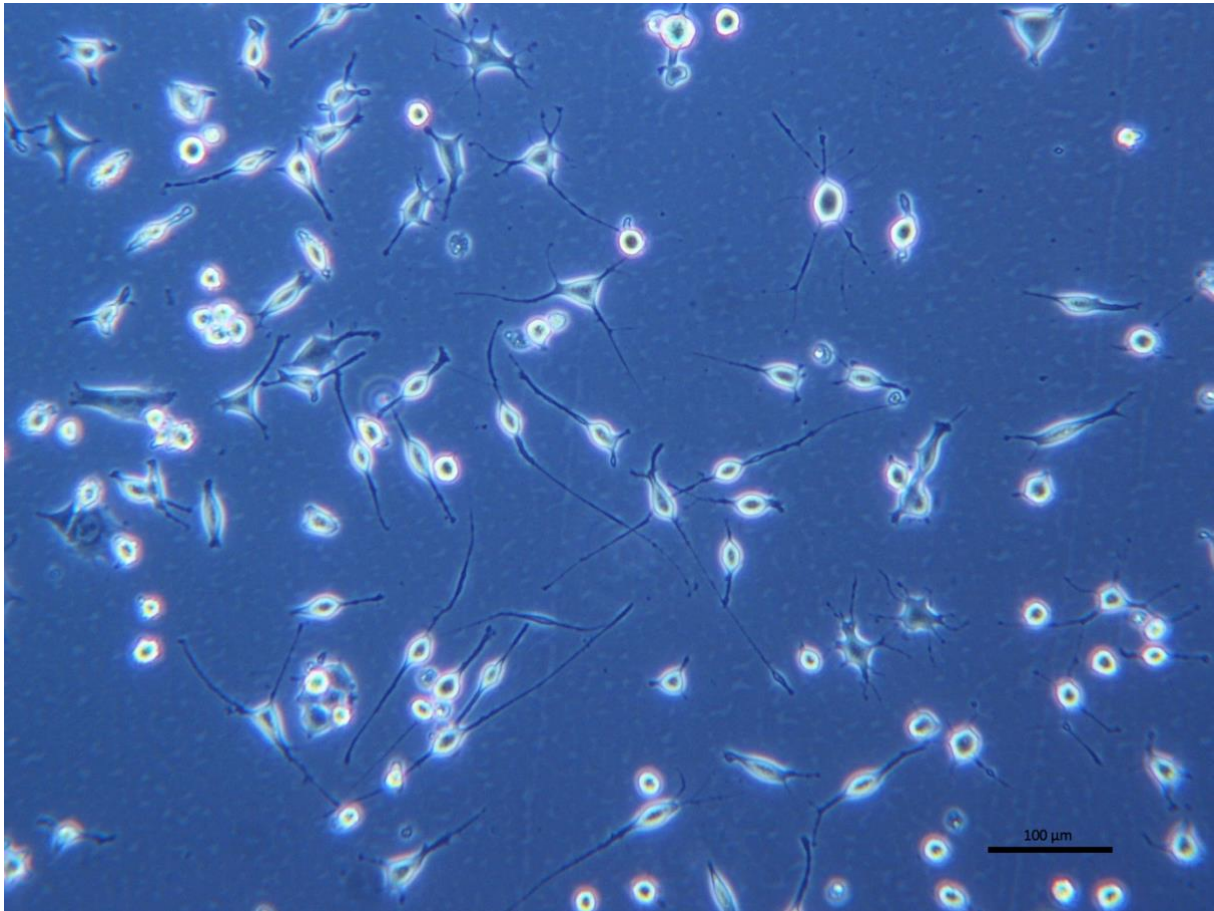


Abb. 3: Oli-Neu Zellen im undifferenzierten Stadium

Mikroskopische Übersicht der Oli-neu Zellen. Für das undifferenzierte Stadium charakteristisch sind die wenigen, überwiegend diametral angeordneten Zellfortsätze. (Maßstab 100m)

Ebenso wie native Oligodendrozyten sind auch Oli-neu Zellen in der Lage, Connexine zu exprimieren. Söhl *et al.* konnte zeigen, dass hauptsächlich Cx29 in undifferenzierten Oli-neu Zellen zu finden war. Die beiden anderen oligodendrozytären Connexine wurden hingegen nicht (Cx47) oder kaum (Cx32) gefunden. Da Cx29 *in vivo* nicht vor dem 7. postnatalen Tag hochreguliert wird, handelt es sich hier um eine erstaunliche Beobachtung, welche in einer Hypothese als Nebeneffekt der Transfektion der t-Neu Tyrosinkinase bewertet wurde [142]. In genauerer Betrachtung der Oli-neu Zellen in Bezug auf Cx29 zeichnete sich ab, dass dieses sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Zellen in der Zellmembran lokalisiert ist. In differenzierten Oli-neu Zellen wurde darüber hinaus belegt, dass durch eine Differenzierung mittels dbcAMP kein Anstieg der Genexpression für Cx47 und Cx32 induziert werden konnte. Wurden im Versuchsansatz hingegen Oli-neu Zellen mit Astrozyten co-kultiviert, war ein signifikanter Anstieg der Cx29- und Cx47-Expression erkennbar [59,142].

Neben den Connexinen konnte in Oli-neu Zellen auch die Expression weiterer oligodendrozytenspezifischer Proteine nachgewiesen werden. So belegten Pereira *et al.* unter anderem den quantitativen Anstieg der mRNA des Proteolipid-Proteins (*Plp1*) und des Myelin-

Basischen Proteins (*myelin basic Protein; Mbp*). Im *Western Blot* konnte jedoch keine Proteinexpression nachgewiesen werden; es wurde weder PLP noch MBP detektiert. Lediglich nach der dbcAMP-induzierten Differenzierung der Oli-neu Zellen konnte MBP detektiert werden [120].

Zusätzlich zu den Connexinen, Pannexinen und oben genannten Proteinen, wurden im Rahmen dieser Untersuchung weitere oligodendrozytenspezifisch exprimierte Proteine analysiert. Dazu gehörten unter anderem der Oligodendrozytenmarker 2',3'-zyklische nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNPase) oder auch der Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2 (Olig2). Bei der CNPase handelt es sich um ein myelin-assoziiertes Enzym, welches als Katalysator der Phosphodiesterhydrolyse von 2',3'-zyklischen Nucleotiden zu 2'-Nucleotiden [114] fungiert. Es erscheint interessant, dass die *CNPase* mRNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen bereits nachgewiesen werden konnte. Hinsichtlich der zeitlichen Abfolge konnte herausgestellt werden, dass die *CNPase* mRNA bereits vor der mRNA des *Mbp* und *Plp1* exprimiert wird [132]. Das basische *Helix-loop-Helix* Protein Olig2 ist ein Transkriptionsfaktor und maßgeblich am Überleben, der Proliferation und der Ausreifung von Oligodendrozyten beteiligt [79]. Es wird in Regionen des Neuroepitheliums, wo die Oligodendrozyten entstehen, aber auch in den Oligodendrozyten selbst exprimiert [158]. Dadurch gilt es als sehr früher Marker zur Identifikation der Oligodendrozyten [158]. Copray *et al.* zeigten, dass durch eine Transfektion von neuronalen Stammzellen mit Olig2 bereits *in vitro* eine vollständige Ausreifung von Oligodendrozyten induziert werden kann [28].

Zusammenfassend lässt sich statuieren, dass Oli-neu Zellen aufgrund ihrer Expandierbarkeit, der Möglichkeit zur Differenzierung und der zahlreichen oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine eine interessante Zelllinie zu Forschungszwecken darstellen. Hinsichtlich der MS-Forschung ist bedeutsam, dass es sich bei diesen Zellen um Oligodendrozyten-Vorläuferzellen handelt, die, wie bereits vorangegangen beschrieben, eine wichtige Rolle im Rahmen der Remyelinisierung in neurodegenerativen Erkrankungen wie der MS übernehmen.

2.6 Ziel der Arbeit

Auch wenn die Erklärung der Pathogenese der Multiplen Sklerose weiterer Untersuchungen bedarf, kann den Oligodendrozyten bereits jetzt eine ausgesprochen große Rolle bei der Entstehung dieser Autoimmunerkrankung zugesprochen werden. Dies ist zum einen durch ihre neuroprotektive Rolle, zum anderen durch ihre Interaktion mit anderen Gliazellen, vor allem den Astrozyten, begründet. Wie bereits beschrieben, sind an der interzellulären Kommunikation maßgeblich Connexine und Pannexine beteiligt.

Markoullis *et al.* konnten bereits in postmortalen Untersuchungen an Gehirnen MS-erkrankter Patienten einen Rückgang oligodendrozytärer Connexine (Cx32 und Cx47) zeigen [86]. Ähnliche Auswirkungen auf Connexine konnten durch die Applikation von Cuprizons ebenfalls dargestellt werden. So zeigten Parenti *et al.*, dass Cx47 durch eine CPZ-induzierte Demyelinisierung vermehrt exprimiert wird. Sie werteten dies als Ausdruck einer Schlüsselrolle des Cx47 für die Myelinproduktion und Remyelinisierung [117].

Im Folgenden wurden Oli-neu Zellen im undifferenzierten Stadium hinsichtlich ihrer Expression oligodendrozytenspezifischer Connexine und anderer oligodendrozytenspezifischer Proteine untersucht. Als *in vitro*-Modell der Multiplen Sklerose wurde das CPZ appliziert und als Modell der nicht-inflammatorischen MS-Komponente verwendet. Ziel war es, die durch CPZ induzierten Einflüsse auf die exprimierten Connexine und Proteine in Oli-neu Zellen aufzudecken.

Durch Hainz *et al.* konnte bereits *in vivo* gezeigt werden, dass durch Probenecid ein protektiver Effekt auf die CPZ-Auswirkung ausgeübt werden kann. Somit wurde in Probenecid ein potenzielles Agens gegen die MS gesehen [51]. Die Untersuchung dieses Effekts auf Oli-neu Zellen wird im Folgenden dargelegt.

2.7 Hypothesen

- 1.) Oli-neu Zellen weisen bereits im undifferenzierten Stadium einige oligodendrozytenspezifisch exprimierte Proteine und Connexine auf. Dabei wird angenommen, dass undifferenzierte Oli-neu Zellen in FRIL-Untersuchungen für Cx29 bereits ähnliche ultrastrukturelle Ausbildungsmuster wie im peripheren Nerven zeigen.
- 2.) Durch Cuprizone wird eine negative Auswirkung auf oligodendrozytenspezifisch exprimierte Proteine und Connexine in undifferenzierten Oli-neu Zellen induziert.
- 3.) Durch Probenecid kann den Effekten des Cuprizone entgegengewirkt werden.

3 Material und Methodik

3.1 Materialien und Hilfsmittel

Tabelle 1: Werkzeuge und Verbrauchsmaterialien

Werkzeuge und Verbrauchsmaterialien	Firma, Land
24-Well-Mikrotiter-Platte Cellstar	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
3D-Schüttler/Taumelschüttler PS M3D	Grant-Bio, Cambridge, UK
96-Well-Mikrotiter-Platte Biolite	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Analysenwaage, M-Power	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Automatic Cellcounter LUNA-II™	Logos Biosystems, Anyang-si, Südkorea
Backofen: HERA-Therm	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
BAF060 (Gefrierbruchanlage)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Biologische Sicherheitswerkbank: Hera Safe KS	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
CO ₂ Inkubator: HERAcell 150 i	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläschen Ø: 20 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Diamantmesser	DiATOME, Hatfield, USA
Filterpapier Whatman	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA
Filterpapier Whatman, Ø: 90 mm	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA
Finder Gold Netzchen mit Orientierungshilfe (Grids) G200F1-G3, Ø: 3,05 mm	Gilder Grids, Grantham, UK
Fluoreszenzmikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Folienschweißgerät: Folio	Severin Elektrogeräte, Sundern, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur PerfectBlue	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Horizontales Minigelsystem für Agarose-Gele	
Glas-Petrischalen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glas-Pipette 5, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Halogenlampe HXP 120	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
iMark™ Microplate Absorbance Reader #1681135	Bio-Rad, München, Deutschland
Kamera Elektronenmikroskop: Olympus	Olympus, Hamburg, Deutschland

MegaView III	
Kamera Fluoreszenzmikroskop:	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Digitalkamera AxioCam MRm	
Kamera Geldokumentation: Vilber Lourmat	Vilber Lourmat Deutschland GmbH,
Fusion SL 35000 WL	Eberhardzell, Deutschland
Kamera Phasenkontrastmikroskop: Digital	Nikon, Minato, Präfektur Tokio, Japan
Sight DS-2M	
Kanüle: 0,4x40 mm	Braun, Melsungen, Deutschland
Keramik-Well-Platte	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Keramikpinzette	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Kohlestab	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Kryo-Konservierungsgefäße, 2 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Kryopräparationseinheit (Cryo Preparation	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Chamber (CPC))	
Kupfer-Trägerplättchen (Double-Sandwich-	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Carrier)	
Laborglas-Flaschen, 0,25 – 1 l	VWR International GmbH, Darmstadt,
	Deutschland
Millipore-Anlage für Bidest-Wasser	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt,
	Deutschland
Mini-Zentrifuge: Sprout®	Biozym, Hessisch Oldenburg, Deutschland
Molecular Imager® Gel Doc™ XR System	Bio-Rad, München, Deutschland
Nano Drop One: Mikrovolumen-UV/VIS-	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe,
Spektralphotometer	Deutschland
Netz-Gerät: PeqLab Peq-POWER 300	VWR International GmbH, Darmstadt,
	Deutschland
Niedrigraum-Tischabzug Secuflow (Scala)	Waldner Laboreinrichtungen, Wangen,
	Deutschland
Objektträger Polysine	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm M Sealing Film	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pasteur-Pipette, Plastik, 3 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
pH-Meter + Sonde	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Phasenkontrastmikroskop: Primo Vert	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Pipetten: 0,5 µl bis 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten: 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe Pipet Boy 2	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Platinstab	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland

Präzisions-Pinzette Dumxoe N7, gekrümmt	Dumont, Montignez, Schweiz
Reagenzglasschüttler: Lab Dancer	IKA, Staufen, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,2 – 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsröhrchen, 15 – 20 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsröhrchen, 50 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Schraubgläschen mit chemikalienresistentem Deckel X100, 27,5x57 mm, hydrolyt. Klasse I	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Schüttler: Heidolph Incubator 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sterilisationsfilter Minisart 0,45µm	Sartorius Stedim biotech, Göttingen, Deutschland
Thermocycler Applied Biosystems™	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
StepOne Plus™	
Thermocycler Life Touch	Biozym, Hessisch Oldenburg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop FEI, Technai G2	Technai (inzwischen Thermo Fisher Scientific), Karlsruhe, Deutschland
Vacuum Cryo Manipulation System (VCM)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Vacuum Cryo Transfer System (VCT-) Shuttle	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg Deutschland
Wärmebank	Medax Nagel KG, Kiel, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wipp-Schüttler: Mini Minirocker MR1	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wischtücher, Kimtech Science	Kimberly-Clark Professional, Dallas, USA
Zellkulturflasche 25 cm ² , Cellstar	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflasche 75 cm ² , Cellstar	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschale, Plastik, Ø: 60 mm	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus Biofuge Primo R	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalien	Firma
β-Mercaptoethanol	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Agarose	Biozym, Hessisch Oldenburg, Deutschland
Bromphenolblau (-Natrium-Salz)	AlfaAesa, Ward Hill, USA
Collagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Complete	Roche, Mannheim, Deutschland
Cuprizon (CPZ)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
DAPI-Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Desosyribonuklease (DNase)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dichlorethan DCE	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1x Medium + 4,5g/L D-Glucose, 580mg/L L-Glutamine)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNA ladder 100 bp, NEB #B7025	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig (Essigsäure)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
EM bed-812 Einbettmedium, (EPON)	Science Services GmbH, München, Deutschland
Ethanol 96%	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100%	Fisher Scientific, part of Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gentamicin	Invitrogen, (jetzt Thermo Fisher Scientific), Karlsruhe, Deutschland
Hanks Balanced Salt Solution, HBSS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Insulin	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Grüssing, Filsum, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Zentrales Chemikalienlager der UdS
L-Thyroxin	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Midori Green	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
MuLV-Reverse Transkriptase + Puffer	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Natriumhydroxid (NaOH)	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Natriumselenit	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
NEB DNA-ladder 100bp	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Normales Pferdeserum, Normal Horse Serum (NHS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Normales Ziegenserum, Normal Goat Serum (NGS)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Oligo(dt)Primer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Perfluoralkoxy (PFA)-Pulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Polycarbonat (Makrolon)	Bayer, Leverkusen Deutschland
Probenecind (PBN)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Progesteron	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Propan-1,2,3-triol, Glycerol, Glycerin	Grüssing, Filsum, Deutschland
Putrescin	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
RNase AWAY	Molecular Bio-Products, inc.; Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland

RNase Inhibitor (40 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
RT(Reverse Transkriptase)-Puffer (10x)	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-Pellets >99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff	Nippon Gases, Madrid, Spanien
Taq-DNA-Polymerase	BioLabs, Heidelberg, Deutschland
Teleost Gelatine	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Thermo Pol. Puffer (10x)	BioLabs, Heidelberg, Deutschland
Transferrin	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland,
Triiodthyronin	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
TRIS-base (Trizmaabase)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
TRIS-HCL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100 reinst	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA 10x	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: Kits

Kits	Firma
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasyPlus Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Takyon qPCR Kit (Rox SYBR)	Eurogentec, Seraing, Belgien

Tabelle 4: Software

Software	Firma
Axio Vision SE64 Rel. 4.8	Carl Zeiss, Jena, Deutschland Immuno
GraphPad Prism 9	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA
Image Lab 6.1 Software für Windows	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA
Mendeley	Elsevier Inc. New York, NY, USA,
Microplate Manager 6 Software (MPM6)	Bio-Rad, laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Microsoft Excel für Mac, 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft PowerPoint für Mac, 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Word für Mac, 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA
Notability für iOS	Ginger Labs, San Francisco, CA, USA
Step One Plus	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
StereoPhotoMakerPro, Version 6.28	Masuji Suto, David Sykes, Werner Bloss 2002-2022
TECHNAI	FEI Company, Hillsboro, OR, USA
Vilber Lourmat Fusion Software	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland

3.2 Kultivierung der Zelllinie Oli-neu

Die Zelllinie Oli-neu wurde dankenswerterweise durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jacqueline Trotter der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Zur Verbesserung der Anhaftung der Oli-neu Zellen wurden alle Kulturgefäße mit Poly-L-Lysin (PLL; Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland) (0,01 % (w/v) in zweifach destilliertem Wasser (H₂O dd)) beschichtet.

Der Boden der Zellkulturflaschen (Fläche 25 cm², Fläche 75 cm²) sowie die Zellkulturschalen (Ø 60 mm) wurden mit der 0,01 % PLL-Lösung benetzt, für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend zweifach mit H₂O dd gewaschen. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Die immunzytochemische Färbung der Oli-neu Zellen wurde auf Deckgläsern (Ø 20 mm) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Deckgläser in EtOH (100 %) gewaschen und jeweils vier Deckgläser ohne Überlappung in einer Zellkulturschale (Ø 60 mm) platziert. Auch diese wurden mit PLL (0,01 % (w/v) in H₂O dd) beschichtet und zuletzt für 30 min unter UV-Licht sterilisiert.

3.2.2 Auftauen und Passagieren der Zellen

Tabelle 5: Ansatz Sato-Medium (500ml)

Medien und Lösungen	Stockkonzentration	Menge	Finale Konzentration
DMEM 1x Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium + 4,5 g/L D-Glucose, 580 mg/L L-Glutamine)		485 ml	
Transferrin	50 mg/ml	100 µl	10 µg/ml
Insulin	1 mg/ml	500 µl	10 µg/ml
Putrescin	10 mM	5 ml	100 µM
Progesteron	2 mM	50 µl	200 nM
Triiodthyronin	500 µM	500 µl	500 nM
Natriumselenit	300 µM	370 µl	220 nM
L-Thyroxin	4 mM	65 µl	520 nM
Gentamicin	50 mg/ml	250 µl	25 µg/ml
Normales Pferde Serum		7,5 ml	1,5 %

Die Zellen waren zuvor bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert worden. Zur Kultivierung wurden sie zunächst im Wasserbad bei 21°C aufgetaut und anschließend in ein Reaktionsgefäße (15 ml) mit verdünntem Serum (10 % Pferdeserum in 1x PBS (170 mM NaCl, 3,35 mM KCl, 4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1,84 mM KH_2PO_4 , pH 7,2)) überführt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 130 x g. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in Sato-Medium suspendiert und in einer kleinen, zuvor mit PLL-beschichteten, Zellkulturflasche bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Hälfte des Sato-Mediums erneuert wurde.

Zum Passagieren wurde das Sato-Medium abgesaugt und die Zellen mit 4 ml vorgewärmtem 1x Trypsin/EDTA (1x TE: (v/v) 10x TE (4 ml Trypsin (1 % (w/v), 40 ml EDTA (0,2 % (w/v), 400 ml Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), 1:10 in PBS verdünnt) für maximal 2 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Es erfolgte ein leichtes Klopfen der Zellkulturschale, um die Zellen vom Boden abzulösen. Anschließend wurde das Trypsin-Zellgemisch in eine vorgekühlte Stopplösung (10 % Pferdeserum in PBS (v/v)) überführt und für 10 min bei 130 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Sato-Medium suspendiert und zur Expansion im Verhältnis 1:3 auf Zellkulturflaschen aufgeteilt.

3.2.3 Aussaat und Behandlung der Zellen

Für die Aussaat der Zellen erfolgte das Trypsinieren, die Zentrifugation und Suspendierung analog zum Vorgehen im Rahmen des Passagierens. Daran schloss sich eine automatische Zellzählung mittels der Zählapparatur *Cellcounter LUNA-II™* (Logos Biosystems, Anyang-si, Südkorea) an. Hierzu wurde die Zellsuspension 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (0,4 % in NaCl (0,9 % (w/v)) verdünnt und 10 μl in die Zählkammer überführt. Die Zählapparatur ermittelte die Zellzahl der lebenden Zellen pro Mikroliter.

In Vorbereitung auf die RNA-Isolation und die Immunfluoreszenzfärbungen wurden stets 200 000 Zellen / Schale ($\varnothing$ 60 mm) in 3 ml Sato-Medium ausgesät und anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Für die Inkubation mit CPZ erfolgte die Herstellung einer 20 mM CPZ-Stocklösung (w/v). Hierzu wurde 0,5567 g CPZ mit 100 ml EtOH (50% w/v in H_2O d) versetzt und bei 37°C auf dem Rührer gelöst (Dauer ca. 1 h). Hier orientierten wir uns an Vorversuchen von Cammer bzw. Bénardais *et al.* [12,23]. Die Lösung wurde bei RT gelagert und binnen 24 h verwendet. Als Kontrolle wurde in diesen Versuchen das Lösungsmittel (Solvent) EtOH (50 % (v/v) in H_2O dd) genutzt.

Für die 25 mM PBN-Stocklösung (w/v) wurden 0,14267 g PBN in einem Gemisch aus 13 ml NaCl (0,9% (w/v) in H_2O d), 1 ml 1 M Tris (Hydroxymethylaminomethan)-Lösung und 1 ml 2 N NaOH (v/v) gelöst. Anschließend wurde die Lösung mittels 2 N HCl auf einen pH-Wert von 7,3

eingestellt und sterilfiltriert. Die Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert und über einen Zeitraum von einem Monat verwendet. Als Kontrolle wurde das Solvent aus 13 ml NaCl (0,9 % (w/v) in H₂O d), 1 ml Tris-Lösung und 1 ml 2 N NaOH (v/v) hergestellt und mit 2 N HCl ebenfalls auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt.

Für die FRIL - Proben erfolgte die Applikation von CPZ und PBN in den Zellkulturflaschen, in einem Zeitfenster von 2 bis 6 Tagen nach dem letzten Passagieren; für die RNA-Isolation und die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen jeweils 48 h nach dem Aussäen behandelt. Die Versuchsgruppen setzten sich wie in Tabelle 6 aufgeführt zusammen.

Tabelle 6: Pipettierschema der Versuchsgruppen

Konditionen	Sato-Medium	CPZ	EtOH (50% v/v in H ₂ O dd)	PBN
Kontrollgruppe	3000 µl			
CPZ (0,5 mM)	2925 µl	75 µl		
Solvent	2925 µl		75 µl	
CPZ (0,5 mM) + PBN (1 mM)	2805 µl	75 µl		120 µl

Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.3 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden Oli-neu Zellen (n=3) zunächst in Zellkulturschalen (Ø 60 mm) kultiviert (vgl. 3.2.2) und behandelt (vgl. 3.2.3) und anschließend mit Hilfe des *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) samt Reaktionssäulen und Reaktionslösungen gemäß der Herstellerangaben behandelt. Erweitert wurde das Kit durch den Homogenisator *QIAshredder* (Qiagen, Hilden, Deutschland) zur Zerkleinerung der Zellen sowie durch das RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Verdau genomischer DNA (gDNA). Alle Versuchsschritte erfolgten auf Eis und die Zentrifuge (Heraeus Fresco 21, Thermo Fisher) wurde auf 4°C heruntergekühlt.

Zunächst wurden die behandelten Zellen mit PBS gewaschen und mit RLT-β-Mercaptoethanol versetzt (10 µl (14,3 M) β-Mercaptoethanol / ml RLT-Puffer (RNeasy Lysis Tissue Buffer, Endkonzentration 143 mM)). Das Zellgemisch wurde auf die *QIAshredder*-Säule gegeben und zentrifugiert. Danach schloss sich der DNA-Verdau mit der Überführung des Durchflusses auf die *gDNA-Eliminator*-Säule mit erneuter Zentrifugation an. Zur Elution wurden jeweils 500 µl EtOH (reinst (v/v)) zum Durchfluss hinzugefügt, gemischt und auf die *RNeasy*-Säule

aufgetragen. Anders als bei den bisherigen Schritten, sammelte sich ab diesem Schritt nach Zentrifugation die RNA in der Membran der *RNeasy*-Säule und der Durchfluss wurde verworfen. Im Weiteren wurde die Membran mit 350 µl RW1-Lösung benetzt und zentrifugiert. Für den DNase-Verdau wurde zunächst DNase mit der gebrauchsfertigen RDD-Lösung versetzt (2,5 µl DNase + 10 µl RDD + 30 µl RNA + 57,5 µl RNase freies Wasser). Im Anschluss wurden 80 µl des Gemisches auf die *RNeasy*-Säule aufgetragen und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde diese Membran erneut mit der RW1-Lösung bedeckt, zentrifugiert und zweifach mit der RPE-Lösung gewaschen. Schließlich wurde die Membran durch eine Zentrifugation bei höchster Geschwindigkeit (21.200 x g) für eine Minute getrocknet. Für die Elution wurde die Membran mit 50 µl RNase freiem Wasser benetzt und für mindestens fünf Minuten auf Eis inkubiert. In einem letzten Schritt wurde die Probe eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert, dabei löste sich die gereinigte RNA aus der Membran und befand sich somit im Durchfluss.

Nach der RNA-Isolation wurde mit dem Microvolumen-Spektralphotometer *NanoDrop One* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) die Qualität (Grad der Verunreinigung mit Proteinen oder organischen Verbindungen) und die Quantität der Probe (Menge (ng) der RNA pro Mikroliter der Probe) bestimmt. Dazu wurde aus den Messergebnissen bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm der Quotient gebildet. Bei einem Zielbereich des Quotienten von ca. 1,8 – 2,1 bestand keine Verunreinigung mit Proteinen. Ebenfalls wurde aus Messungen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 230 nm ein Quotient gebildet. Befanden sich die Werte ebenfalls im genannten Zielbereich, bestand keine Verunreinigung mit organischen Verbindungen.

3.3.1 cDNA-Synthese

Um nach dem Umschreiben der RNA in cDNA vergleichbare Werte zu erhalten, wurden stets 1000 ng der isolierten RNA eingesetzt. Zunächst wurde das entsprechende Volumen der RNA auf ein Gesamtvolumen von 13 µl mit 0,1 % DEPC-H₂O aufgefüllt. Anschließend wurden 2 µl Oligo(dt)Primer und 1 µl dNTP-Mix (beides Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt und für fünf min bei 65°C im Thermozykler (Thermocycler Life Touch, Biozym, Hessisch Oldendorf) inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden anschließend 0,8 µl Nuclease-freies Wasser (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland), 2 µl Reverse Transkriptase (RT) -Puffer (10 x) (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland), 0,2 µl RNase Inhibitor (40 U/µl; Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) und 0,2 µl MuLV-Reverse Transkriptase (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) hinzu pipettiert und die Mischung für weitere 60 min bei 42°C sowie anschließend für 20 min bei 65°C im Thermozykler inkubiert. Das genaue Pipettierschema wurde dem Protokoll „*First Strand cDNA-Synthesis*“ (Standard Protokoll NEB # MEB M0253) entnommen.

3.3.2 Reverse Transkriptase - Polymerase - Kettenreaktion und Gelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse der Genexpression erfolgte zunächst die Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz mit anschließender Auftrennung und Analyse mittels Gelelektrophorese.

Hierzu wurde der zuvor synthetisierten cDNA ein Mastermix aus 18,875 µl 0,1% DEPC-H₂O, 2,5 µl Thermo Pol. Puffer (10 x), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), je 0,5 µl der entsprechenden fwd und rev Primer (vgl. Tabelle 8) und 0,125 µl der Taq-Polymerase (BioLabs, Heidelberg, Deutschland) zugefügt. Es erfolgte eine Inkubation im Thermozykler nach festgelegtem Schema (vgl. Tabelle 7). Dieser Zyklus wurde 40 x wiederholt. Als Kontrollen wurden Großhirn (bestehend aus Mastermix, Primern, Taq-Polymerase und cDNA aus dem Großhirn), H₂O (lediglich Wasser) und *no Template* (bestehend aus Mastermix, Primern und Taq-Polymerase; ohne cDNA) mitgeführt.

Tabelle 7: PCR-Zyklus

	Temperatur in °C	Dauer
Initialdenaturierung	95°C	30 Sek.
Zyklenanzahl: 40		
Denaturierung	95°C	30 Sek.
Anlagerung	56°C	30 Sek.
Verlängerung	68°C	60 Sek.
Abschluss	68°C	300 Sek.
Kühlung zur Lagerung	10°C	

Zur Auftrennung der Amplifikationsprodukte wurde ein 1,5 % Agarosegel verwendet. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml Tris-Acetate-EDTA-Puffer (TAE) (1x TAE: (v/v) 10x TAE (10 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0), 24,2 g Tris-Base (209,24 g/mol), 5,7 ml Eisessig, 500 ml H₂O) 1:10 in H₂O dd) aufgeköcht und mit 5 µl des Farbstoffs *Midori Green* (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) angefärbt. Die Lösung wurde zum Auspolymerisieren blasenfrei in einen Elektrophoreseschlitten (PerfectBlue Horizontales Minigelsystem, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gegossen. Um die Geltaschen zu formen, wurde ein Elektrophoresekamm eingesteckt.

Das ausgehärtete Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt. Diese wurde mit TAE Puffer (1x) aufgefüllt und anschließend die Geltaschen befüllt. Hierzu wurde zunächst jeder Probe 5 µl 6 x DNA-Ladepuffer (0,05 % Bromphenolblau (w/v), 0,05 % Xylencyanol (w/v), 0,2

% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) (w/v) in 5 ml H₂O dd und 5 ml Glycerin gelöst) hinzugesetzt und dann jeweils 25 µl der cDNA-Probe in die Taschen überführt. Es wurden 5 µl des Referenzmarkers (DNA ladder 100 bp, NEB #B7025, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) eingesetzt. Schließlich wurde die Elektrophorese für 75 min bei einer elektrischen Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 500 mA durchgeführt. Im Anschluss wurden zur Auswertung Bilder mit der Kamera *Vilber Lourmat Fusion-SL 3500 WL* und dem *Vilber Lourmat Fusion Programm* (Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland) aufgenommen.

3.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Mittels der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) wurde die Genexpression einiger Gap Junction Proteine und oligodendrozytenspezifisch exprimierter Proteine semi-quantitativ untersucht. Als Referenz wurde die Expression der ribosomalen Untereinheit 18S verwendet. Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurden alle Proben im Rahmen einer Dreifachbestimmung (Triplet) analysiert.

In einem ersten Schritt wurde die zuvor generierte cDNA in einem Verhältnis von 1:3 mit 0,1 % (v/v) DEPC-H₂O verdünnt. Dann wurde für jedes zu untersuchende Protein ein Mastermix aus jeweils 0,6 µl der Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Tabelle 8) mit 6,3 µl 0,1% (v/v) DEPC-H₂O und 10 µl des Reaktions-Mastermixes (Takyon, Eurogentec, Belgien) angesetzt. Anschließend wurden je 2,5 µl der verdünnten cDNA und 17,5 µl des jeweiligen Mastermixes in ein Well einer 96-Well-Mikrotiter-Platte überführt und mit Folie abgedeckt. Nach kurzzeitiger Zentrifugation wurde die Platte in den Thermozykler *StepOne Plus™* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) eingesetzt und das Programm „Regular Cycling – Regular ramping rates“ durchgeführt (Tabelle 9).

Tabelle 8: Primerliste der qPCR

Primer	Spezies	Sequenz 5'-3'	Produkt- größe [bp]	Referenz
18S fwd.	Maus, Human	AAACGGCTACCACATCCAAG	155	Raslan <i>et al.</i> , (2016) [128]
18S rev.	Maus, Human	CCTCCAATGGATCCTCGTTA		
Cx29 fwd	human	TGGAGTCAGCGGTTTCTGTC	72	Ye <i>et al.</i> , (2012) [156]
Cx29 rev.	human	CTCCACCATCTCCCCAAACC		
Cx32 fwd.	Maus	CCTGCAGCTTATCTTGGTTTCC	147	Ye <i>et al.</i> , (2012) [156]
Cx32 rev.	Maus	ATGTGCACCTTGTGTCTCTTTACC		
Cx45 fwd.	Maus	GAGTTCTGGTGAACAGGGCA	125	Ye <i>et al.</i> , (2012) [156]
Cx45 rev.	Maus	ACAATCAGCACAGTGAGCCA		
Cx47 fwd.	Maus	TCCAAGTTCACCTGCAACACG	111	Ye <i>et al.</i> , (2012) [156]
Cx47 rev.	Maus	GGAGATGACCACTATCTGGAAGACC		
MBP fwd.		AACATTGTGACACCTCGAACA	96	Zur Verfügung gestellt durch Abteilung Univ.- Prof. Dr. F. Kirchhoff, UdS
MBP rev.		AGAGCGGCTGTCTCTTCCT		
PLP1 fwd.		CCACACTAGTTTCCCTGCTCACCT	80	Zur Verfügung gestellt durch Abteilung Univ.- Prof. Dr. F. Kirchhoff, UdS

PLP1 rev.		GGTGCCTCGGCCCCATGAGTT		
Olig2 fwd.	Maus	TTACAGACCGAGCCAACACC	129	Ye <i>et al.</i> , (2012) [156]
Olig2 rev.	Maus	TGGCCCCAGGGATGATCTAA		
CNPase fwd.	Maus	GCAGGAGGTGGTGAAGAGAT	145	Ye <i>et al.</i> , (2012) [156]
CNPase rev.	Maus	CAGATGGCTTGTCCAGATCA		
Px1	Maus	AGCCAGAGAGTGGAGTTCAAAGA	104	Hanstein <i>et al.</i> , (2013) [52]
Px1	Maus	CATTAGCAGGACGGATTCAGAA		

Fwd: forward, rev: reverse, bp: Basenpaare

Tabelle 9: Zyklus der qPCR

	Temperatur in °C	Regular Cycling – Regular ramping rates
Takyon Aktivierung	95°C	180 Sek.
Zyklenanzahl: 40		
Denaturierung	95°C	10 Sek.
Anlagerung/Erweiterung	95°C	60 Sek.

3.3.4 Auswertung der qPCR

Zur relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes „*Housekeeping*-Gen“ bezogen (Normalisierung) [121]. Hierzu wurde das Gen der ribosomalen Untereinheit 18S verwendet, da es unabhängig von äußeren Einflüssen in jedem Zelltyp exprimiert wird.

In einem ersten Schritt wurde der C_t -Wert (*threshold cycle*) für alle Gene ermittelt. Dabei handelt es sich um die Anzahl der Zyklen, die benötigt wird, um ein konstantes Fluoreszenzniveau zu erreichen [121]. Die C_t -Werte aller drei Bestimmungen für ein Gen wurden gemittelt und im Anschluss normalisiert. Hierzu wurde der gemittelte C_t -Wert des Referenzgens von dem des Zielgens abgezogen.

$$(\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen})$$

Durch diese Normalisierung wird die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert [121], da Störgrößen gleichermaßen das *Housekeeping*-Gen und das Zielgen betreffen.

Im Anschluss wurde der relative Expressionsunterschied zwischen der experimentell behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle als delta-delta-C_t-Wert berechnet.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Behandlung} - \Delta C_t \text{ Kontrolle}$$

Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (*Ratio*), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, wird durch folgende Formel wiedergegeben [121]:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Programmes *GraphPad Prism 9* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Zur weiteren Untersuchung wurde eine Proteinanalyse mittels Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Oli-neu Zellen (n=2) auf PLL-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturschalen (jeweils 4 Deckgläser in einer Schale (Ø 60 mm)) ausgesät (siehe 3.2.3) und in 3 ml Sato-Medium inkubiert. Nach 48 h erfolgte die Applikation von CPZ und PBN zum Kulturmedium und nach weiterer 24-stündiger Inkubation erfolgte die Fixierung der Zellen.

3.4.1 Fixieren und Färbung der Zellen

Nach dem Waschen mit PBS folgte die Fixierung, indem die Zellen mit gekühltem 100%igem EtOH überschichtet wurden und für 20 min bei -20°C inkubierten. Danach wurden die Deckgläser getrocknet und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Vor der Färbung wurden die Zellen durch 3-faches Eintauchen der Deckgläser in PBS von Verunreinigungen befreit. Danach wurden die Deckgläser für 1 h in einer Blockierlösung A (10 % Ziegenserum (*normal goat serum*; NGS) (v/v) und 0,1 % TritonX-100 (v/v) in PBS) inkubiert, was der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen diente. Anschließend wurden die Primärantikörperlösungen in entsprechenden Verdünnungen (Tabelle 10) mit der Blockierlösung A angesetzt. Die Proben wurden mit jeweils 50 µl des entsprechenden Ansatzes benetzt und für 2 h bei RT inkubiert.

Tabelle 10: Primärantikörper der Immunfluoreszenzfärbung

Primärantikörper	Spezies	Firma	Artikelnummer	Verdünnung
Cx29	Kaninchen	Invitrogen	34-4200	1:100
MBP	Kaninchen	Abcam	ab40390	1:1000
PLP1	Kaninchen	Bioss	bs-11093R	1:100

Später wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und für 30 min in einer zweiten Blockierlösung B (0,2 % BSA (w/v) in PBS) abermals blockiert. Daran schloss sich die einstündige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (Tabelle 11), verdünnt in Blockierlösung B, an.

Tabelle 11: Sekundärantikörper der Immunfluoreszenzfärbung

Sekundärantikörper	Spezies	Firma	Artikelnummer	Verdünnung
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen	A11034 + A11008	1:3000

Schließlich wurden die Deckgläser mit PBS und H₂O_d gespült und zuletzt mit 5 µl DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) auf Objektträgern eingedeckt.

3.4.2 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Bildaufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop *Observer Z.1* (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer Digitalkamera (*AxioCam MRm*, Carl Zeiss) und dem Softwareprogramm *AxioVision* (Rel.4.8, Carl Zeiss) angefertigt. Mittels der entsprechenden Lichtfilter für grünes Licht, 38 HE (Wellenlänge 470 nm), blaues Licht, 49 HE (DAPI-Signal, Wellenlänge 365 nm) sowie einer Halogenlampe (HXP 120 C, Carl Zeiss) wurden die einzelnen Fluoreszenzkanäle aufgenommen. Für Farbillustrationen wurden Schwarz-Weiß-Bilder mit Fehlfarben hinterlegt.

Für alle Versuchsgruppen (Kontrollgruppe, CPZ-Gruppe, CPZ + PBN-Gruppe) und jeweils alle Konditionen (Cx29, MBP, PLP1) wurden sechs Aufnahmen bei einer 40-fachen Vergrößerung in Öl (Objektiv: Plan-APO 40x/1,3 Oil, Carl Zeiss) angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen wurden für die 9 Entitäten jeweils 30 repräsentative Zellen ausgewertet. Zur Auswertung wurden die Aufnahmen in der Durchlichtansicht und im grünen Kanal verwendet.

In einem ersten Schritt wurde die Zellfläche der einzelnen Zellen durch händisches Umfahren im Durchlicht-Bild mit dem Programm *ImageJ* (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA) [133] ermittelt (Abb. 4C). Im zweiten Schritt wurde die immunpositive Fläche der jeweiligen Zellen gemessen. Hierzu wurden zunächst alle Immunfluoreszenzbilder des grünen Fluoreszenzkanals in 8-bit-Bilder (Schwarz-Weiß) umgewandelt. Anhand der Kontrollgruppenaufnahmen wurde ein Schwellenwert festgelegt, ab welchem das Fluoreszenzsignal als positiv gewertet wurde. Dieser Schwellenwert wurde für alle anderen Versuchsgruppe beibehalten (Schwellenwert 1. Versuchsreihe: 40 von 250; 2. Versuchsreihe 34 von 250). Durch erneutes Umfahren und Abmessen der Zellanteile im Fluoreszenzbild, deren Intensität über dem Schwellenwert lag, konnte die immunpositive Fläche einer jeden Zelle erfasst werden (Abb. 4D). Abschließend wurden die beiden Werte für die signalpositive Fläche und die Fläche der gesamten Zelle ins Verhältnis gesetzt und so der prozentuale Anteil der immunpositiven Fläche einer jeden Zelle berechnet. Dieses Verfahren erfolgte für alle ausgewerteten Zellen mit dem Programm *Microsoft Excel* 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Statistisch wurden die Ergebnisse mit dem Programm *GraphPad Prism* 9 ausgewertet.

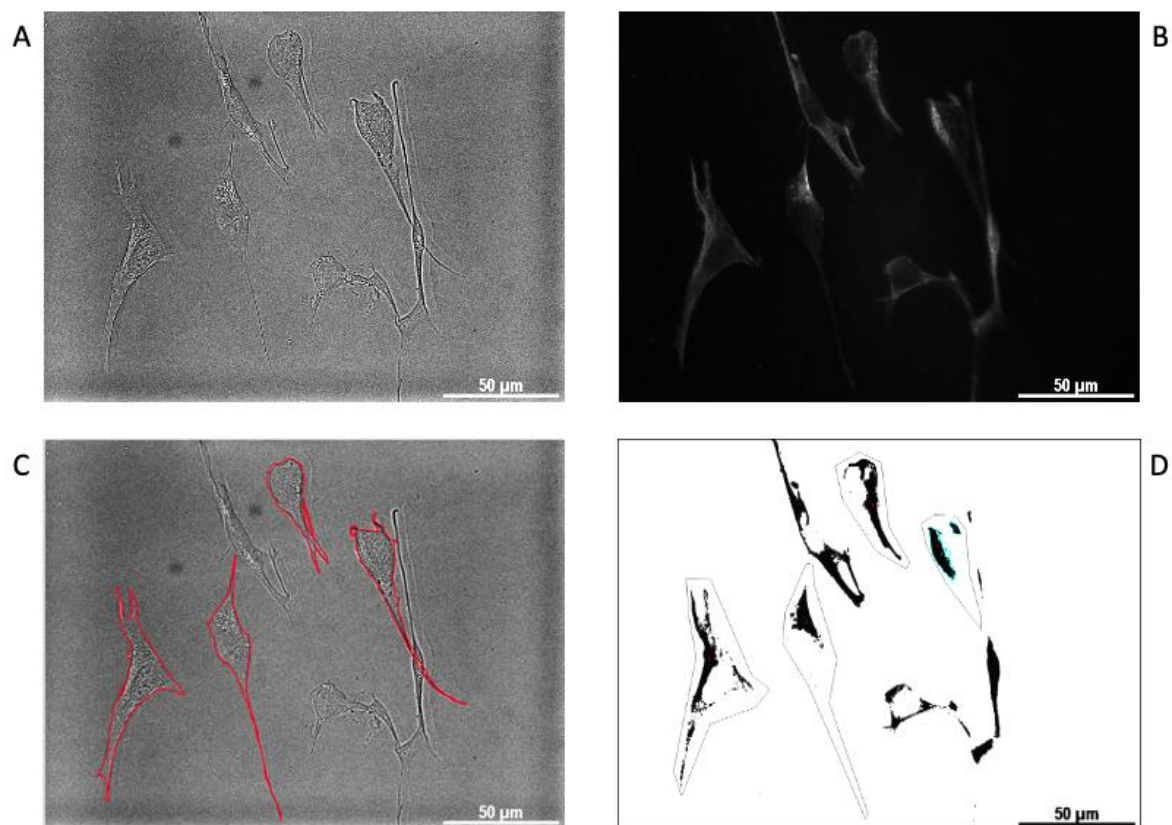


Abb. 4: Exemplarische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Oli-neu Zellen sind exemplarisch in der Kontrollgruppe und mit einer Immunfluoreszenzfärbung für Cx29 in der Durchlichtansicht (A) und im Immunfluoreszenzlicht (B) dargestellt. Zur Auswertung wurde im ersten Schritt die Fläche einer Zelle händisch unter der Zuhilfenahme des Programms *ImageJ* umfahren und gemessen (C). Im zweiten Schritt wurde die immunpositive Fläche, also die Zellanteile, bei welchen das Fluoreszenzsignal oberhalb des festgelegten Schwellenwertes lag, ermittelt (D). (Maßstab 50 µm)

3.5 Freeze-Fracture Replica Immunolabeling (FRIL)

Im Rahmen der FRIL-Technik (*Freeze-Fracture Replica Immunolabeling*, Gefrierbruch-Replika Immunogoldmarkierung) ist es das Ziel, durch das Vitrifizieren und anschließende Aufbrechen von Zellen bestimmte Intramembranproteine (IMPs), ultrastrukturell zu analysieren und parallel durch eine Immunogoldmarkierung mit spezifischen Antikörpern darzustellen [123]. Diese Technik wurden in Anlehnung an die Protokolle von Severs *et al.* [135], Rash *et al.* [123, 124] und Fujimoto [43] durchgeführt, wonach es vier essenzielle Schritte für die Herstellung der Replika gibt: Die Vitrifizierung der Proben, das Brechen, das Aufbringen eines Platin-Kohle-Films und das Reinigen der Replika [43,123,135]. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

3.5.1 Vitrifizierung und Gefrierbruch

Um die Integrität der Zellkontakte bei der Herstellung der FRIL-Proben zu erhalten, wurden die Oli-neu Zellen als Pellet eingefroren. Hierzu wurden die Oli-neu Zellen wie bereits beschrieben in Zellkulturschalen kultiviert, behandelt und anschließend mit PFA-Lösung (2 % (w/v) in 0,15 M Sörensens-Phosphat-Puffer (SPB; für 1l: 3,6g NaH_2PO_4 , 21,36g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, ad 1 L H_2O dd, pH 7,4)) für 5 min bei RT fixiert. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Zellen mit einem Schaber vorsichtig abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 130 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit einer Glycerin-Lösung (30 % (v/v) in 0,15 M SPB) behandelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Zell-Glycerin-Gemisch wurde tropfenweise zwischen zwei Kupfer-Trägerplättchen, dem *Double-Sandwich-Carrier* (Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland), aufgetragen. Zur Vitrifizierung wurden die Proben mit Hilfe der Kryopräparationseinheit (*Cryo Preparation Chamber*, CPC, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und Injektoraufsatz in ein -167°C kaltes Propan-Ethan-Gemisch eingeschossen (*Plunge-Freezing*). Unmittelbar im Anschluss wurden die Proben in flüssigen Stickstoff transferiert und bei -196°C gelagert.

Für den Gefrierbruch wurden die Proben mit Hilfe eines Leica EM VCT-*Shuttles* (*Vacuum Cryo Transfer System*, Leica Microsystems) und einer Leica EM VCM-*Station* (*Vacuum Cryo Manipulation System*, Leica Microsystems) im vitrifizierten Zustand in die Gefrierbruchanlage (BAF060, Leica Microsystems) überführt. Alle Gerätschaften waren zuvor mit flüssigem Stickstoff auf -164°C gekühlt worden. In der Gefrierbruchanlage konnten die Proben im Hochvakuum von etwa 2×10^{-7} bis 8×10^{-8} mbar gebrochen werden, indem die Oberseite des *Double-Sandwich-Carriers* mit einer Mikrotomklinge abgeschlagen wurde.

Im direkten Anschluss an das Brechen wurde in der Gefrierbruchanlage durch das Aufbringen eines Platin-Kohle-Films (*Coating*) ein Negativabdruck der Bruchfläche, die Replika, generiert. Dazu wurden nacheinander eine dünne Kohleschicht (<1 nm Schichtdicke,

Bedampfungswinkel 90 °), ein Platin-Kohle-Film (1,5 nm, Bedampfungswinkel 60 °) und eine zweite Kohleschicht (20 nm, Bedampfungswinkel 90 °) aufgetragen. Durch das Bedampfen in verschiedenen Winkeln haftet der Platin-Kohle-Film seitlich an Replikavorsprüngen (Abb. 5), wodurch die Plastizität der Replika hervorgehoben wird.

In einem letzten Schritt wurde innerhalb der Stickstoff-Atmosphäre der VCM die mit Polycarbonat-Kunststoff (Lexan) behandelten Finder-Netzchen (Gold-Grids) die Kupfer-Trägerplättchen aufgetragen. Diese Finder-Netzchen/Kupfer-Trägerplättchen-Sandwiches wurden zunächst bei -20°C über Nacht gelagert, wodurch das DCE langsam verdampft, sich das darin gelöste Lexan zu einer dünnen Schicht verfestigt und so die hauchdünne Replika stabilisiert.

3.5.2 Markierung der Replika und Entfernung des Lexans

Vor der eigentlichen Markierung (*Immunolabeling*) wurde zunächst der SDS-Verdau durchgeführt, wodurch überschüssiges Zellmaterial von der Replika entfernt wurde [43]. Dazu wurden die Finder-Netzchen samt Replika in PBS von den Kupferträgern abgelöst und über Nacht bei 48°C und bei 300 rpm in 2 ml SDS-Verdauungslösung (2,5 % SDS (w/v) in 10 mM TRIS-HCl, pH 8,9) inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben für 90 min bei 37°C in 100 µl Kollagenase D (2 % (w/v) in 0,15 M SPB) behandelt. Nach zwei fünfminütigen Waschschritten in SPB wurden die Proben für 90 min in LBB (*Labeling Blocking Buffer*; 10 % Ziegenserum, 1,5 % Teleost Gelatine, in 0,15 M SPB) blockiert. Danach wurden die Proben mit dem Primärantikörper für Cx29 (Tabelle 12) (in LBB) 16 h bei RT inkubiert. Am dritten Tag erfolgte nach mehrmaligem Waschen in LBB die Inkubation mit dem passenden goldgekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 13), ebenfalls bei RT für 22 h. Die Markierung endete nach mehreren Waschschritten in LBB, SPB und H₂O dd. Nach dem Trocknen wurde ein Karbonüberzug, ein weiterer 20 nm dicker Kohlefilm, in der BAF060 aufgetragen, um die Markierung zu stabilisieren und eventuelle Risse der Replika zu fixieren [124].

Tabelle 12: Primärantikörper für FRIL

Primärantikörper	Spezies	Firma	Artikelnummer	Verdünnung
Cx29	Kaninchen	Invitrogen	34-4200	1:50

Tabelle 13: Sekundärantikörper für FRIL

Sekundärantikörper	Spezies	Firma	Artikelnummer	Verdünnung
12 nm Gold	Kaninchen	JIR	111-205-144	1:20
6 nm Gold	Kaninchen	JIR	111-195-144	1:20

Final wurde das Lexan wieder von der Replika entfernt (*DeLex*), da dieses elektronendicht ist und somit die Auswertung im Elektronenmikroskop behindern würde. Für diesen Schritt wurden die Finder-Netzchen 10 mal in DCE getaucht und mit Filterpapier trocken getupft. Diese Schritte wiederholten sich dreimal. Danach wurden die Finder-Netzchen abermals über Nacht in DCE bei 64°C aufbewahrt und am nächsten Tag in DCE für 10 min auf 80°C erhitzt. Anschließend wurden sie dreimal in köchelndes DCE getaucht, mit Filterpapier trocken getupft und wiederum 10 mal in normaltemperiertes (RT) DCE getaucht. Nach einer 10-minütigen Trocknungszeit waren die Proben zur Auswertung bereit.

3.5.3 Auswertung der FRIL-Proben

Die Auswertung erfolgte für zwei Grids, die aus zwei unabhängigen Oli-neu Zellkulturen (n=2) generiert wurden. Hierzu wurden die fertigen Proben in ein Transmissions-Elektronenmikroskop *FEI Tecnai G²* (Tecnai, inzwischen Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) eingeführt. Die replizierten Zellmembranen wurden auf Immunogoldmarkierungen untersucht.

Wie schon aus früheren FRIL-Studien bekannt ist, weisen Oligodendrozyten partikelreiche Membranen auf. Diese erscheinen heterogen und variieren in Größe und Form [91](Abb. 6 A). Das charakteristische Erscheinungsbild einer Zellmembran ergibt sich daraus, dass die durch den Gefrierbruch induzierte Membranbruchfläche vorzugsweise zwischen den langen Kohlenwasserstoffketten der Doppellipidschicht der Zellmembran entsteht. Wenn sich Gap Junction-Kanäle in diesen gebrochenen Anteilen der Lipiddoppelmembran befinden und diese zufällig an der Grenzfläche zwischen zwei Connexonen getrennt werden, ist die charakteristische Connexondarstellung zu sehen. Die dem Zytoplasma zugewandte Seite der Lipiddoppelmembran wird als P-Seite bezeichnet. Die gegenüberliegende Seite, welche dem Extrazellulärraum, bzw. der benachbarten Zelle zugewendet ist, wird als E-Seite bezeichnet. Wird nun durch den Gefrierbruch eine E-Seite entfernt, bleibt die P-Seite mit dem Connexon zurück. Auf der P-Seite erscheinen die Connexone als Intramembranpartikel (IMPs, *particles*, Partikel). Wird jedoch die P-Seite abgetrennt, so bleibt die E-Seite zurück, die Connexone befinden sich allerdings auch jetzt in der P-Seite. So erscheinen die Lücken, die die Connexone auf der E-Seite zurückgelassen haben, als sogenannte Gruben (*pits*) (Abb. 5).

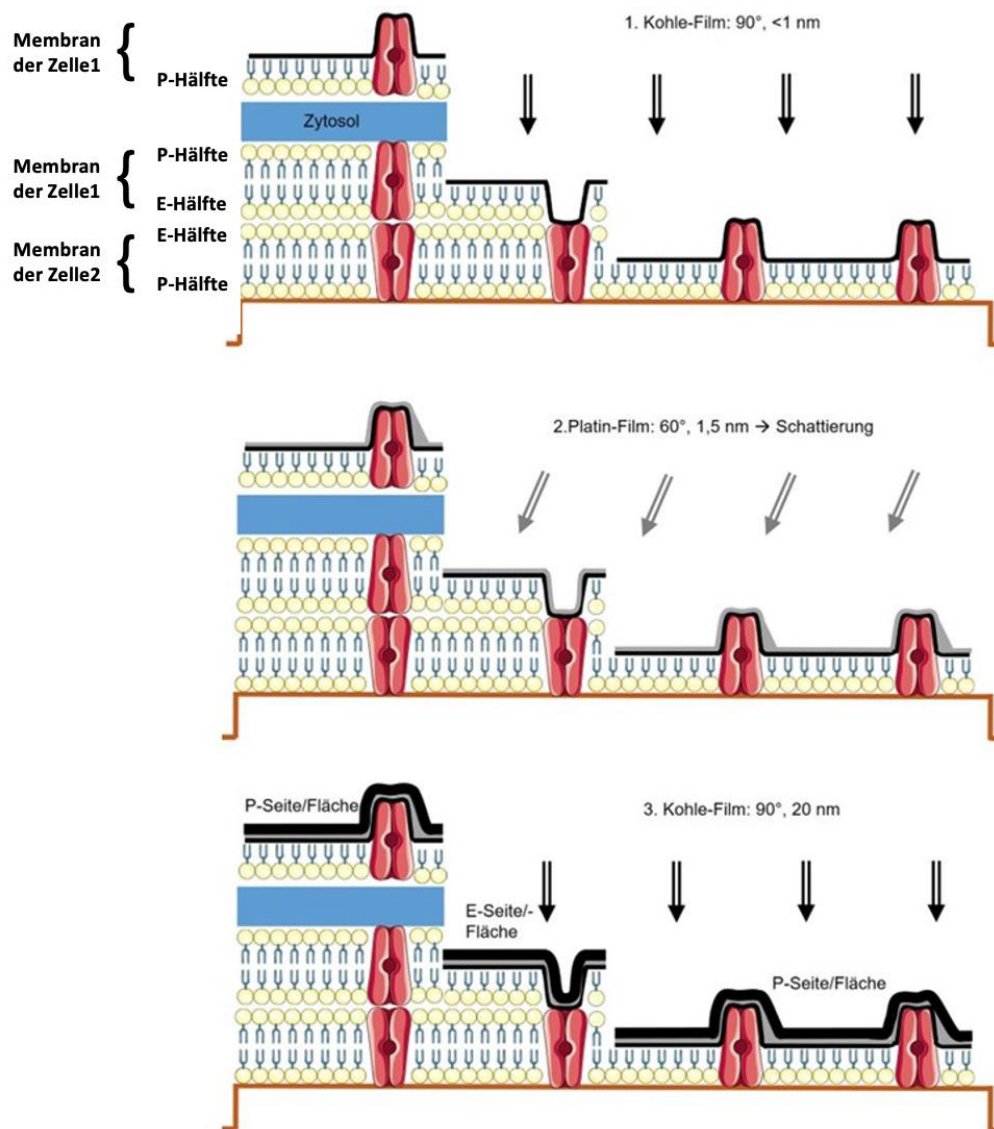


Abb. 5: Nomenklatur der Replika

Im Rahmen der Gefrierbruchmethode werden Lipiddoppelmembranen in die P-Seite (dem Zytosol zugewendet) und die E-Seite (dem Zytosol abgewendet) unterteilt. Durch das Aufbringen des Platin-Kohle-Films in unterschiedlichen Bedampfungswinkeln wird der Replika eine Plastizität verliehen. Hierdurch erscheinen die Lücken, aus denen die Connexone entfernt wurden, als pits auf der E-Seite. Auf der P-Seite verbleiben die Connexone und werden als particles sichtbar. (Modifiziert nach Recktenwald [131])

Die beschriebenen Membranflächen mit *pits* und *particles* galt es von Eis, welches schollig, buckelig und aufgewühlt erscheint, sowie von anderen Zellbestandteilen, wie einer Kernmembran, zu unterscheiden (Abb. 6 B).

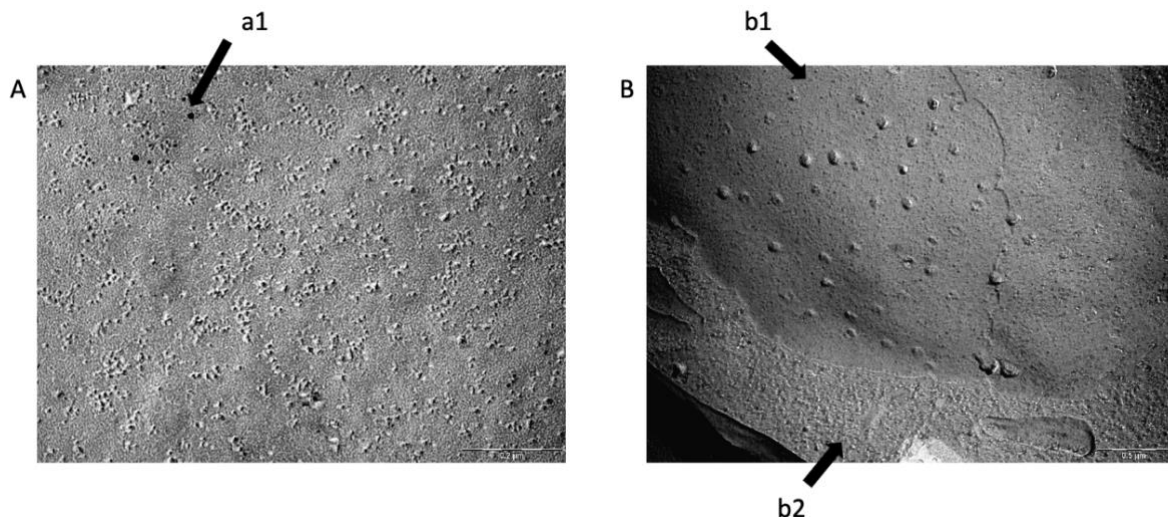


Abb. 6: Zellmembran und Kernmembran von Oli-neu Zellen im FRIL

(A) Eine Zellmembran zeigt sich im Gefrierbruch als partikelreiche Fläche. Idealerweise finden sich auf dieser Fläche Immunogoldmarkierungen (a1). (B) Kernmembranen hingegen zeigen eine gleichmäßige Fläche mit Kernporen (b1). Das Zytosol (b2) wirkt hingegen unruhig und granuliert.

Bei der Analyse der Goldmarkierungen war es relevant darauf zu achten, dass es sich um spezifische Markierungen handelt. Eine spezifische Markierung ist definiert, als in *singlets*, also in einzelnen Partikeln auftretende Markierung, welche sich in einer Umgebung von 20-30 nm um identifizierte P-Seiten IMPs oder E-Seiten *pits* befindet und auf der Gewebeseite der Replika angelagert ist [44,124]. Da das letzte Kriterium nur in einer dreidimensionalen Betrachtung der Replika beurteilbar ist, wurden in der höchsten Vergrößerungsstufe stets Bilder in einem um 8° zueinander versetzten Winkel aufgenommen [44]. Bei der Betrachtung beider Bilder, den so genannten Stereobildern, kann somit eine Dreidimensionalität erzeugt werden. Zusätzlich kann bewertet werden, auf welcher Seite der Membran die Markierung aufgelagert ist.

Von den Oli-neu Proben wurden partikelreiche Membranareale, die mit Goldmarkierungen versehen waren, als Serienaufnahmen (Vergrößerungen: 1.050-fach, 9.900-fach, 20.500-fach, 43.000-fach, 87.000-fach, Winkelbilder im Abstand von 8° bei höchster Vergrößerung) aufgenommen. Die Stereobilder wurden generiert, indem zwei Winkelbilder mittels des Programms *StereoPhotoMakerPro* (Masuji Suto, David Sykes, Werner Bloss 2002-2022) in unterschiedlicher Farbqualität übereinandergelegt wurden und mit einer Farbbrille (Rot/Cyan) angeschaut wurden (Abb. 7 C). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die rosettenförmigen Komplexe (violett) und die präformierenden Komplexe (gelb) mit dem Programm *Notability* für IOs (Ginger Labs, Inc., San Francisco, CA, USA) farblich markiert (Abb. 7 D)

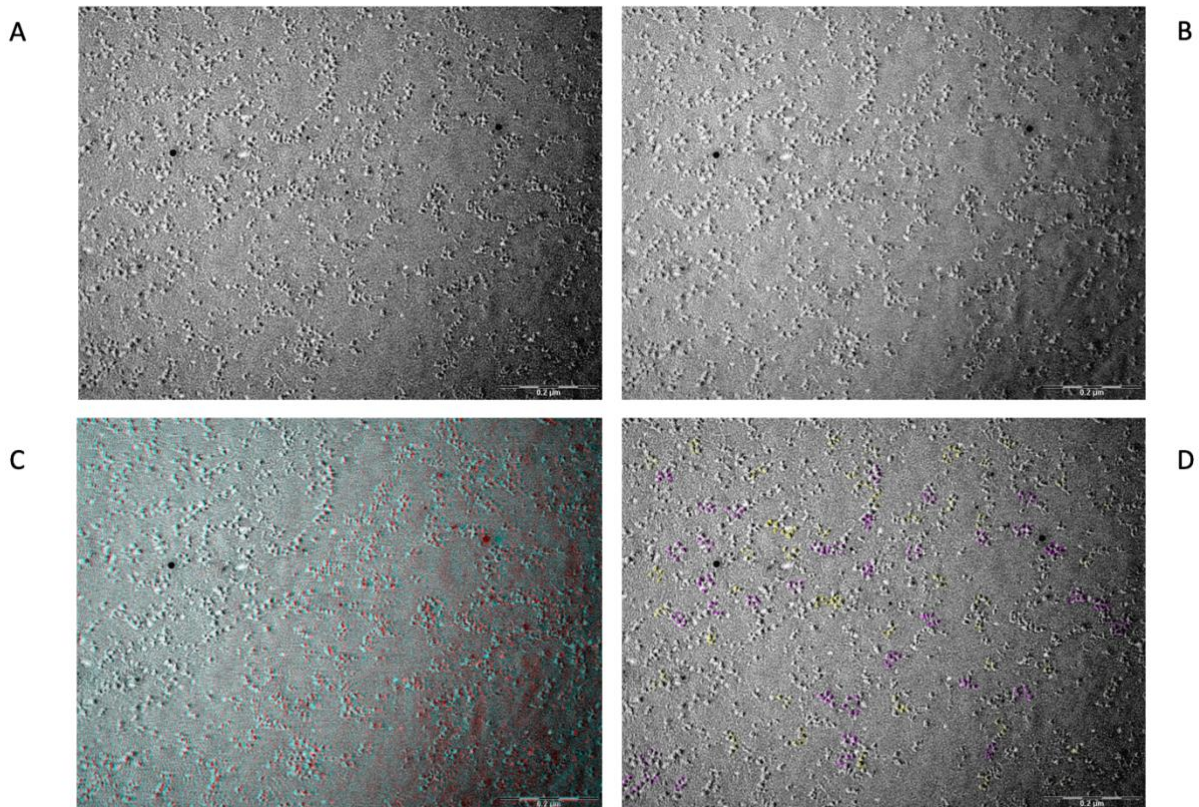


Abb. 7: FRIL-Auswertung mittels Stereoaufnahmen

(A, B) Winkelaufnahmen im Abstand von 8° der identischen Zellmembranstelle einer Oli-neu Zelle im FRIL. (C) Übereinanderlagerung aus Bild A und B zu einem Stereobild. Bei Betrachtung mit einer blau-roten Stereobrille erscheint der Bildeindruck dreidimensional. Diese Ansicht wurde verwendet, um Rosetten und präformierende Komplexe zu detektieren und markieren (D) (violett – Rosette, gelb – präformierender Komplex). (Maßstab $0,2\ \mu\text{m}$)

Zur Überprüfung der Spezifität der Immunogoldmarkierungen der FRIL-Proben, wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (so genannte „*Signal-to-noise-ratio*“, SNR) bestimmt. Dabei wird die Anzahl von unspezifischen Immunogoldmarkierungen (*noise*, Rauschen) mit den spezifischen Immunogoldmarkierungen (*signal*, Signal) ins Verhältnis gesetzt, um so die Markierungsqualität zu bestimmen [124]. Hierzu wurde zunächst auf Aufnahmen (26.500-fache Vergrößerung) von Zellbestandteilen, die nicht den Kriterien einer Zellmembran entsprachen, die Goldmarkierungen ausgezählt und zu einem Quotienten aus Anzahl der Markierungen pro μm^2 verrechnet. Selbiges geschah für die Immunogoldmarkierungen auf den Zellmembranen. Zuletzt wurden der Quotient aus Gold / μm^2 anderer Zellanteile und Gold / μm^2 Zellmembran bestimmt.

Zur quantitativen Auswertung der FRIL-Proben wurde zum einen die Anzahl und relative Häufigkeit der Rosetten, der präformierenden Komplexe und der einzelnen Connexone einer Rosette pro Membranfläche (μm^2) berechnet und zum anderen die Distanz zum nächsten Nachbarn (so genannte „*nearest neighbor distance*“, NND, [11,31,84]) bestimmt. Als Rosette

wurde dabei eine Formation aus sechs, annäherungsweise hexagonal angeordneten Partikeln (Abb. 7 D, violett markiert) gewertet. Mittels des Programmes *ImageJ* wurde in der Mitte einer solchen Formation ein Messpunkt gesetzt (Abb. 8), die Rosetten gezählt und die NND berechnet.

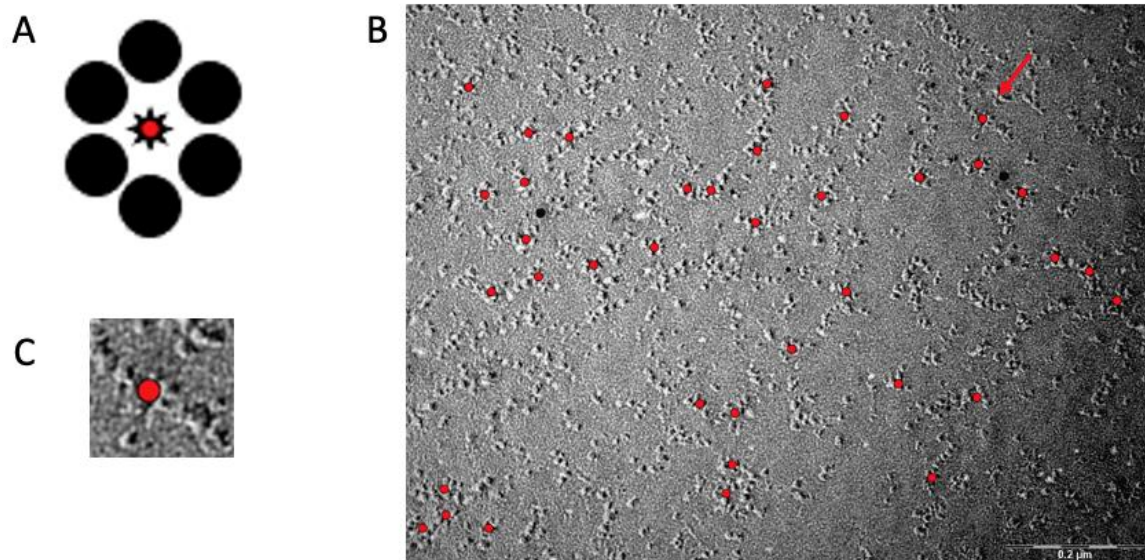


Abb. 8: Bestimmung der NND der Rosetten

(A) Schematische Darstellung einer Rosette, bestehend aus sechs, annäherungsweise hexagonal angeordneten Partikeln. Zur Bestimmung der NND zwischen den einzelnen Rosetten wurde die Mitte einer solchen Figur mit einem roten Punkt versehen. Exemplarisch ist in (B) die Markierung der Rosetten für einen Membranausschnitt gezeigt. (C) zeigt als Ausschnitt aus (B) (mit rotem Pfeil markiert) eine Vergrößerung einer Rosette aus sechs Partikeln. Mithilfe des Programms *ImageJ* wurde zwischen allen Punkten die NND berechnet. (Maßstab in (B) 0,2 µm)

Da bei der Auswertung der Rosetten immer wieder besondere Partikelformationen aus weniger als sechs Partikel auffällig waren, wurden halbkreisförmige Anordnungen aus vier Partikeln als präformierende Komplexe gewertet (Abb. 7 D, gelb markiert). Zur Auswertung wurde ein Messpunkt in die Mitte zwischen den vier Partikeln gesetzt (Abb. 9), die präformierenden Komplexe gezählt und die entsprechende NND mit dem Programm *ImageJ* berechnet.

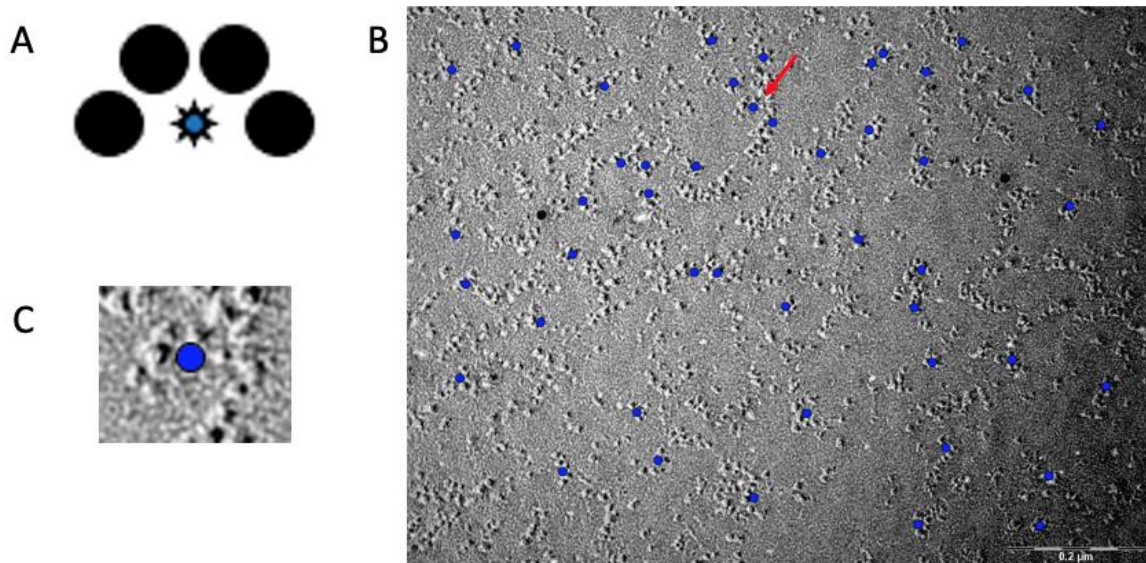


Abb. 9: Bestimmung der NND der präformierenden Komplexe

(A) Schematische Darstellung eines präformierenden Komplexes, bestehend aus vier annäherungsweise halbkreisförmig / hemihexagonal angeordneten Partikeln. Zur Bestimmung der NND zwischen den einzelnen präformierenden Komplexen wurde die Mitte einer solchen Figur mit einem blauen Punkt versehen. Exemplarisch ist in (B) die Markierung eines präformierenden Komplexes für einen Membranausschnitt gezeigt. (C) zeigt als Ausschnitt aus (B) (mit rotem Pfeil markiert) eine Vergrößerung eines präformierenden Komplexes bestehend aus vier Partikeln. Mithilfe des Programms ImageJ wurde zwischen allen Punkten die NND berechnet. (Maßstab in (B) 0,2 μm)

Unter der Annahme, dass sich eine Rosette und die präformierenden Komplexe aus Partikeln zusammensetzen, die den Connexonen entsprechen, wurde in einem nächsten Schritt die NND für jeden einzelnen Partikel einer Rosette bestimmt. Dazu wurden die Partikel, wie in Abb. 10 gezeigt, mit *ImageJ* markiert, gezählt und die NND ermittelt.

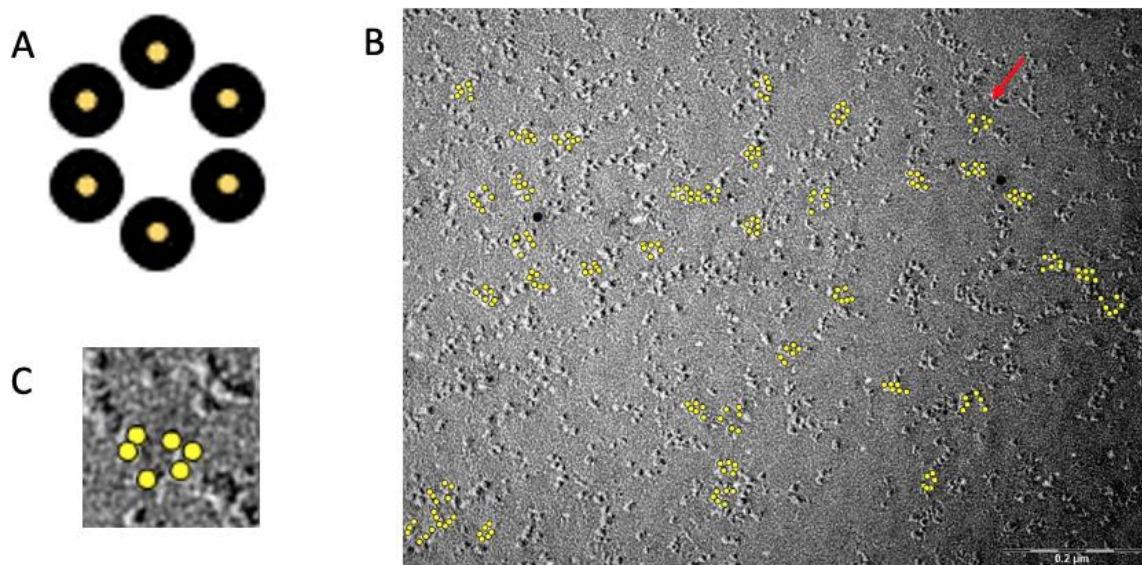


Abb. 10: Bestimmung der NND der Connexone

(A) Schematische Darstellung einer Rosette, bestehend aus sechs, annäherungsweise hexagonal angeordneten Partikeln, vermutlich den Connexonen. Zur Bestimmung der NND zwischen den einzelnen Connexonen wurde jedes Connexon mit einem gelben Punkt versehen. Exemplarisch ist in (B) die Markierung der Connexone für einen Membranausschnitt gezeigt. (C) zeigt als Ausschnitt aus (B) (mit rotem Pfeil markiert) eine Vergrößerung einer Rosette aus sechs Connexonen. Mithilfe des Programms ImageJ wurde zwischen allen Punkten die NND berechnet. (Maßstab in (B) 0,2 μm)

Die Ergebnisse wurden in *Microsoft Excel* zusammengetragen und mit dem Programm *Graph Pad Prism 9* statistisch ausgewertet.

3.6 Statistische Auswertung

Zunächst erfolgte die Überprüfung aller Daten auf Normalverteilung mittels *Shapiro-Wilk-Test*.

Für die qPCR wurde im Falle einer Normalverteilung nach der Durchführung einer *Ordinary one-way ANOVA* als Globaltest ein *Tukey's Multiple Comparison Test* als *Post-hoc-Test* durchgeführt. Wenn sich keine Normalverteilung ergab, erfolgte hier nach einem *Kruskal-Wallis-Test* ein *Dunn's Multiple Comparison Test* als *Post-hoc-Test*.

In der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich keine Normalverteilung der Daten und so wurde hier nach einem *Kruskal-Wallis-Test* als Globaltest ein *Dunn's Multiple Comparison Test* als *Post-hoc-Test* durchgeführt.

Für die FRIL-Auswertung wurde im Falle einer Normalverteilung ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde ein *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt.

Diese Auswertung wurde unter Zuhilfenahme des Programms *GraphPadPrism 9* durchgeführt.

Das Signifikanzniveau betrug stets $p < 0,05$.

Hinweise zur graphischen Darstellung:

$p > 0,05$ – nicht signifikant; aus Gründen der Übersichtlichkeit in den Abbildungen nicht angegeben

$p \leq 0,05$ - * oder signifikant

$p \leq 0,01$ - ** oder sehr signifikant

$p \leq 0,001$ - *** oder hoch signifikant

4 Ergebnisse

4.1 Expression von Connexinen und oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteinen in undifferenzierten Oli-neu Zellen

Oligodendrozyten werden durch die Expression zelltypspezifischer Connexine und Proteine, insbesondere der Myelinproteine, charakterisiert. Ob diese auch in undifferenzierten Oli-neu Zellen exprimiert werden, galt es vor weiterführenden Untersuchungen zu untersuchen.

4.1.1 Analyse der mRNA-Expression

4.1.1.1 Qualitativer mRNA-Nachweis mittels RT-PCR

Um zu analysieren, ob undifferenzierte Oli-neu Zellen oligodendrozytenspezifische Connexine bzw. myelinassoziierte Proteine exprimieren, wurde die Expression der entsprechenden mRNAs über Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) überprüft. Hierbei gelang der qualitative Nachweis für Cx29, Cx32, Cx47 und Panx1 mRNAs (Abb. 11) sowie für die mRNAs der oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine *Plp1*, *CNPase*, *Mbp* und *Olig2* (Abb. 12). Die Positivkontrolle der Großhirn-cDNA zeigte für alle Primer ein Amplifikationsprodukt, während die Negativkontrollen (noT und H₂O) keines zeigten.

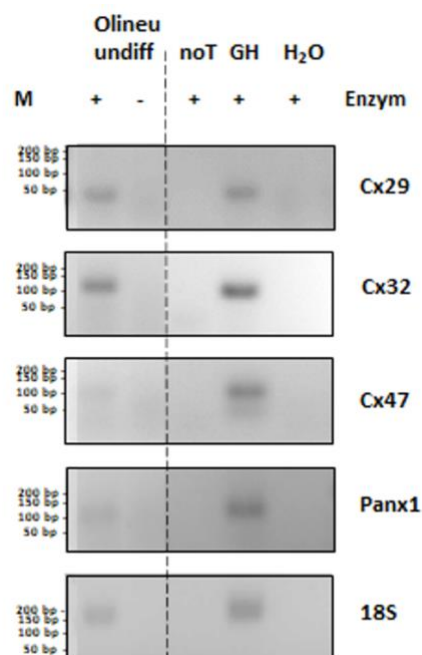


Abb. 11: RT-PCR von oligodendrozytären Connexinen und Panx1

Dargestellt sind die Gele der RT-PCR der Oli-neu Zellen. Es erfolgte der qualitative Nachweis für Cx29, Cx32, Cx47 und Panx1. Als Kontrolluntersuchungen sind no Template (noT), Großhirn (GH) und eine Wasserkontrolle (H₂O) aufgeführt. Als Housekeeping-Gen fungiert 18S.

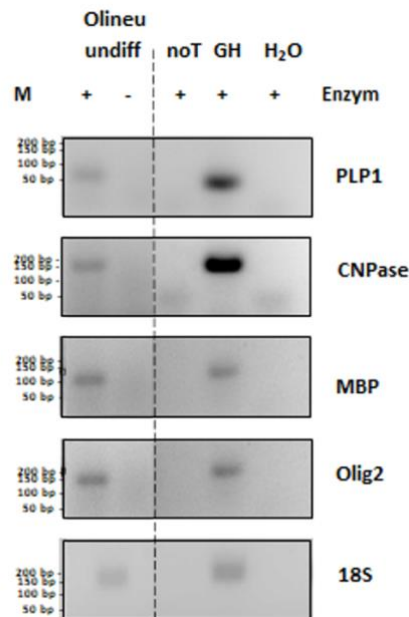


Abb. 12: RT-PCR der oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteinen

Dargestellt sind die Gele der RT-PCR der Oli-neu Zellen. Es erfolgte der qualitative Nachweis für Ppl1, CNPase, Mbp und Olig2. Als Kontrolluntersuchungen sind no Template (noT), Großhirn (GH) und eine Wasserkontrolle (H₂O) aufgeführt. Als Housekeeping-Gen fungiert 18S.

4.1.1.2 mRNA-Quantifizierung mittels qPCR

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurden *real time* PCR Analysen (qPCR) an der cDNA undifferenzierter Oligodendrozyten durchgeführt. Unter den vier Connexinen Cx29, Cx32, Cx45 und Cx47 zeigte sich für Cx29 in undifferenzierten Oligodendrozyten mit im Mittel $5,464 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 1,856$ SEM) die größte relative mRNA-Expression. Dem gegenüber war die relative mRNA-Expression der restlichen Connexine mit Werten von $0,002 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0,001$ SEM) für Cx32, $0,354 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0,242$ SEM) für Cx45 und $0,001 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0,001$ SEM) für Cx47 signifikant geringer ($p \leq 0,05$) (Abb. 13A). Zur statistischen Analyse wurde die parametrische *Ordinary one-way ANOVA* und ein *Tukey's Multiple Comparison Test* als *Post-hoc-Test* durchgeführt

Für die oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine *Mbp*, *Plp1*, *Olig2* und *CNPase* wurde mit einem Mittelwert von $4,619 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0,673$ SEM) für *Mbp* die größte relative mRNA-Expression ermittelt. Die restlichen mRNAs zeigten mit Werten von $0,99 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0,427$ SEM) (*Plp1*), $0,948 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0,294$ SEM) (*Olig2*) und $0,895 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 0,45$ SEM) (*CNPase*) signifikant geringere ($p \leq 0,01$) relative mRNA-Expressionen (Abb. 13B). Zur statistischen Analyse wurde die parametrische *Ordinary one-way ANOVA* und ein *Tukey's Multiple Comparison Test* als *Post-hoc-Test* durchgeführt

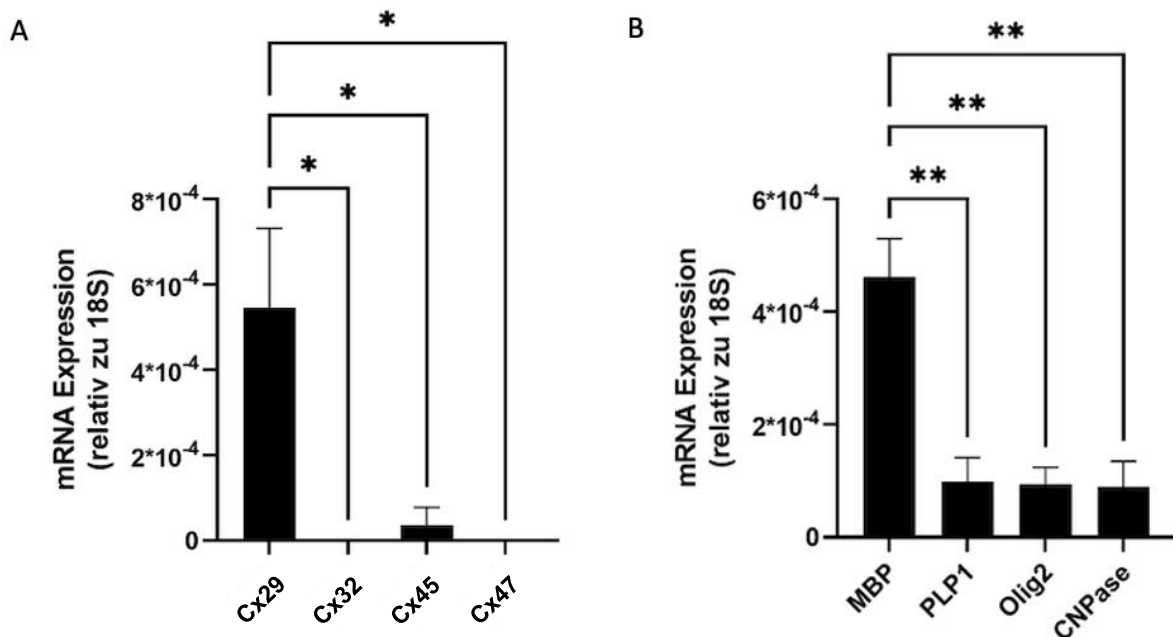


Abb. 13: Relative mRNA-Expression der Connexine und oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine

Grafische Darstellung der Mittelwerte samt Standardfehler (SEM) der mRNA-Expression relativ zu 18S für die Connexine Cx29, Cx32, Cx45 und Cx47 (A) sowie für die oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine Mbp, Plp1, Olig2 und CNPase (B). Die mRNA-Expression von Cx29 ist signifikant größer als die Expression der restlichen Connexine. Unter den oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteinen zeigt Mbp eine signifikant größere mRNA-Expression als die übrigen Proteine.

4.1.2 Analyse der Immunfluoreszenzfärbung

4.1.2.1 Optische Analyse der Immunfluoreszenzfärbung von Cx29, MBP und PLP1

Ob die exprimierten mRNAs auch translatiert werden, wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Zunächst wurden die drei Faktoren mit der höchsten mRNA-Expression auf Proteinebene analysiert, i.e. Cx29, MBP und PLP1. Für alle drei Proteine zeigt sich ein Immunsignal, das besonders in der Nähe des Zellkerns intensiv ist (Abb. 14B-D). Darüber hinaus kann für Cx29 eine besondere Fluoreszenzanreicherung in Nähe der Zellmembran nachgewiesen werden (Abb. 14B). In der Negativkontrolle (Abb. 14A) ist dies nicht ersichtlich.

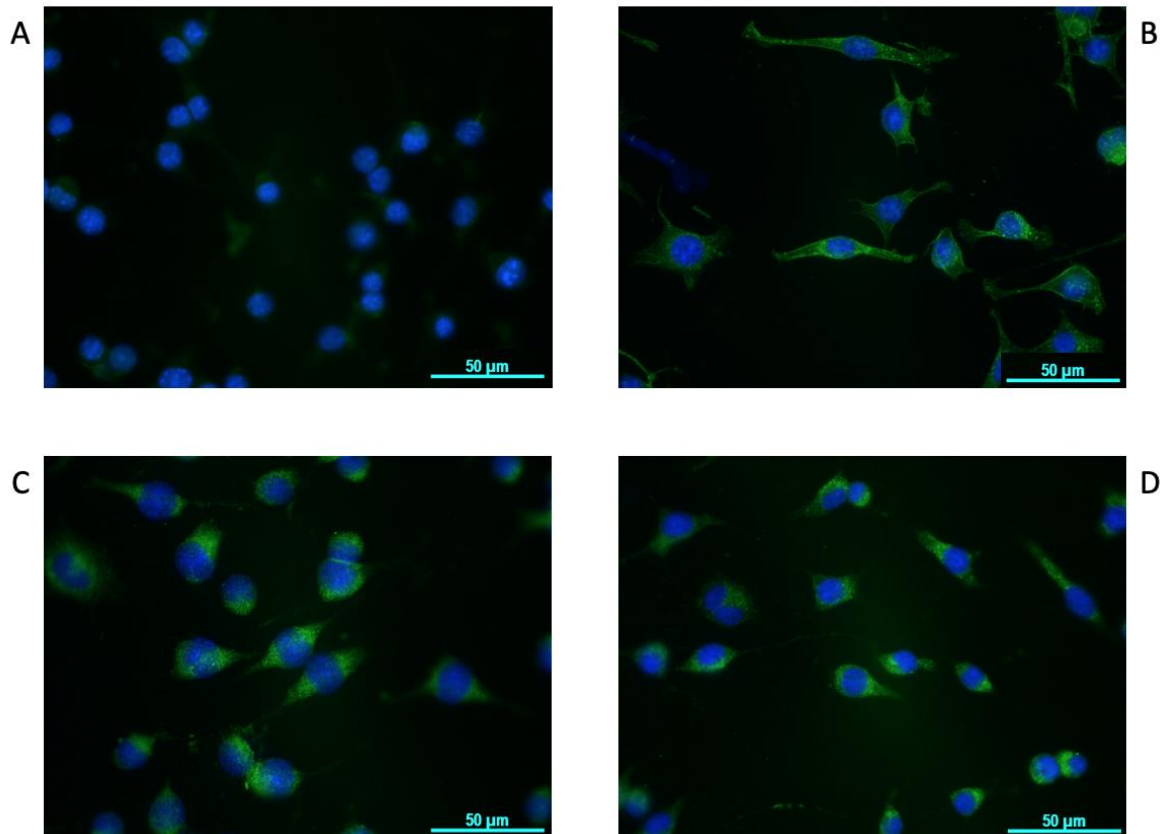


Abb. 14: Immunfluoreszenzfärbung von Cx29, MBP und PLP1 unter Kontrollbedingungen

Immunfluoreszenzfärbungen für Cx29 (B), MBP (C) und PLP1 (D) samt Negativkontrolle (A) in undifferenzierten Oli-neu Zellen (grün). Kerne (blau) wurden mit DAPI dargestellt. Die Oli-neu Zellen sind in Kontrollmedium herangewachsen. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigt sich für alle Proteine ein stärkeres Fluoreszenzsignal in den perinukleären Arealen. Teils ist das Signal auch in der Zellmembran zu lokalisieren (Cx29). (Maßstab 50 µm)

4.1.2.2 Statistische Analyse der Immunfluoreszenzfärbung von Cx29, MBP und PLP1

Unter Zuhilfenahme des Programmes *ImageJ* erfolgte die quantitative Auswertung des Immunfluoreszenzsignals der Oli-neu Zellen. Hierzu wurde zunächst die absolute Zellfläche durch händisches Umfahren der Zellen im Durchlicht-Bild errechnet (Abb. 4C). Diese konnte später mit der Fläche der Zellanteile, deren Signalintensität oberhalb des ermittelten Schwellenwerts war (Abb. 4D), ins Verhältnis gesetzt werden. Zur statistischen Auswertung wurde bei fehlender Normalverteilung der nicht-parametrische *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt. Als *Post-hoc-Test* erfolgte der *Dunn's Multiple Comparison Test*.

In der Auswertung zeigt sich für die Immunfluoreszenzfärbung für Cx29 mit einem Mittelwert von 40,44% immunpositiver Fläche / Zellfläche ($\pm 2,537$ SEM) der größte Anteil. Die oligodendrozytenspezifisch exprimierten Myelinproteine MBP und PLP1 zeigten mit 33,89 % immunpositiver Fläche / Zellfläche ($\pm 2,665$ SEM) (MBP) und 37,92 % immunpositiver Fläche / Zellfläche ($\pm 3,086$ SEM) (PLP1) einen etwas kleineren Anteil. Diese Unterschiede erwiesen sich in der statistischen Auswertung nicht als signifikant (Abb. 15).

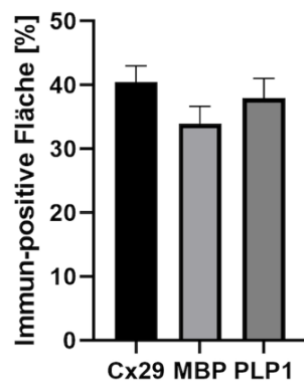


Abb. 15: Immunpositive Fläche von Cx29, MBP und PLP1

Darstellung der Mittelwerte samt SEM der immunpositiven Fläche [%] der undifferenzierten Oli-neu Zellen für Cx29, MBP und PLP1.

4.1.3 FRIL-Analyse

Die Expression des Cx29 Gap Junction-Proteins in undifferenzierten Oli-neu Zellen steht in Einklang mit der Expression von Cx29 in der frühen Gliazellentwicklung des peripheren Nervensystems (PNS). Da Cx29 in myelinisierenden Zellen sogenannte Rosetten bildet, stellte sich die Frage, welche Formation Cx29 in der Zellmembran undifferenzierter Oli-neu Zellen einnimmt. Dieser Frage wurde ultrastrukturell über die FRIL-Technik nachgegangen.

4.1.3.1 Oli-neu Zellen zeigen partikelreiche Zellmembranen im FRIL

Bei Betrachtung der Cx29-immunmarkierten FRIL-Proben zeigte sich in mehreren Replikabereichen partikelreiche Zellmembranen, die mit kolloidalem Gold versehen waren (Abb. 7 A). Dieses wurde als spezifische Immunmarkierung gewertet, sobald die Goldpartikel (6 nm bzw. 12 nm) als einzelne Partikel im Abstand von 20-30 nm um identifizierte IMPs auf der P-Seite oder *pits* auf der E-Seite vorlagen und auf der Gewebeseite der Replika angelagert waren [44,124]. Aufgrund der zahlreichen Partikel auf den Membranen der ausgewerteten Proben kann davon ausgegangen werden, dass die Aufsicht auf eine P-Seite, also die dem Zytoplasma zugewandte Membranhälfte, abgebildet ist.

Über Connexine ist bekannt, dass sie sich zu Connexonen zusammenlagern und sich so nach dem Gefrierbruch auf der P-Seite einer Zellmembran in Form von Partikeln darstellen lassen. Auf der E-Seite zeigen sich diese Connexone als *pits* (vgl. 3.5.3). Generell ist für die Gefrierbruchdarstellung von Connexinen die Formation von Gap Junction-Plaques charakteristisch, i.e. einer Fläche periodisch angeordneter und eng (ca. 10 nm) beieinander liegender Connexone. Für Cx29 ist hingegen die Anordnung in Gap Junctions unüblich; insbesondere in adaxonalen Gliazellmembranen ist die Formation sogenannter Rosetten typisch. Bei genauerer Untersuchung der Oli-neu Membranen im Stereobild war auffällig, dass

die Zellmembran undifferenzierter Oli-neu Zellen rosettenförmige Komplexe (Abb. 16 C und D) aufwies. Neben diesen, aus sechs Partikeln bestehenden Ringkomplexen, waren zusätzlich häufig halbkreisförmige Formationen aus vier Partikeln zu erkennen (Abb. 16 E und F). Unter der Überlegung, dass sich diese Formationen später zu rosettenförmigen Komplexen umformieren könnten, wurden sie als präformierende Komplexe benannt.

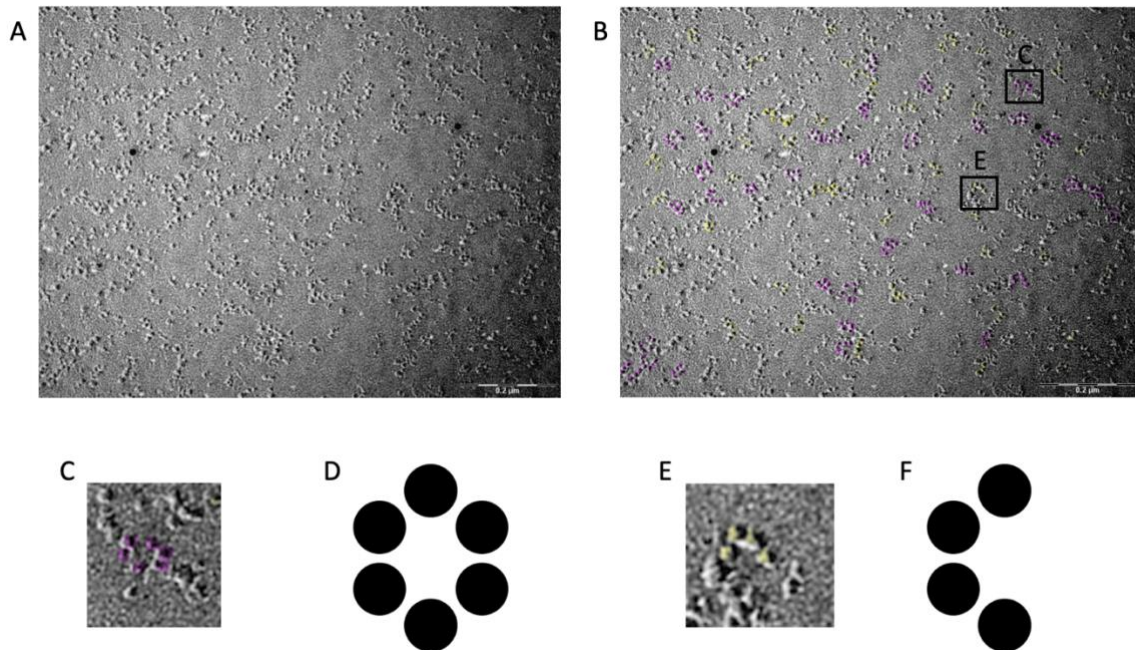


Abb. 16: Rosetten und präformierende Komplexe im FRIL der Oli-neu Zellen

Oli-neu Zellen zeigen im FRIL partikelreiche Membranen (A), auf welchen sich Rosetten (schematische Darstellung in (D)) und präformierende Komplexe (schematische Darstellung in (F)) abgrenzen lassen. (B) Farbliche Darstellung der Rosetten (violett) und präformierender Komplexe (gelb). Genauer zeigen sich beide Formationen in den Vergrößerungsausschnitten ((C) Rosetten; (E) präformierende Komplexe). (Maßstab in (A) und (B) 0,2 μm)

4.1.3.2 Signal-to-noise-Ratio (SNR)

Die SNR spiegelt das Verhältnis von unspezifischen Immunogoldmarkierungen (*noise*, Rauschen) mit den spezifischen Immunogoldmarkierungen (*signal*, Signal) wider und ermöglicht so einen Rückschluss auf die Spezifität der Markierungen.

Für die beiden Versuchsreihen (n=2) ließ sich eine SNR im Verhältnis von 215,7:1 und 206,3:1 berechnen.

4.1.3.3 Rosetten und präformierende Komplexe zeigen ein vergleichbares Verteilungsmuster

Die Anzahl der Rosetten und der präformierenden Komplexe wurden pro μm^2 Zellmembran bestimmt. Die Anzahl der Rosetten lag bei durchschnittlich 33 ($\pm 3,9$ SEM) pro μm^2 ; die der

präformierenden Komplexe bei 38 ($\pm 3,1$ SEM) pro μm^2 (Abb. 17A). Zur statistischen Auswertung wurde der parametrische ungepaarte T-Test durchgeführt. Hieraus ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Die NND wurde ermittelt, um eine Aussage darüber zu treffen, wie eng die Rosetten und die präformierenden Komplexe auf der Zellmembran nebeneinander liegen. Es zeigte sich für die Rosetten im Median ein Abstand von 85,5 nm [1. Quartil 70,1 nm; 3. Quartil 116,5 nm] und für die präformierenden Komplexe ein Abstand von 85,2 nm [1. Quartil 74,2 nm; 3. Quartil 109,1 nm] (Abb. 17A). Zur statistischen Auswertung wurde der nicht-parametrische *Mann-Whitney U-Test* durchgeführt. Hiernach ergab sich kein signifikanter Unterschied.

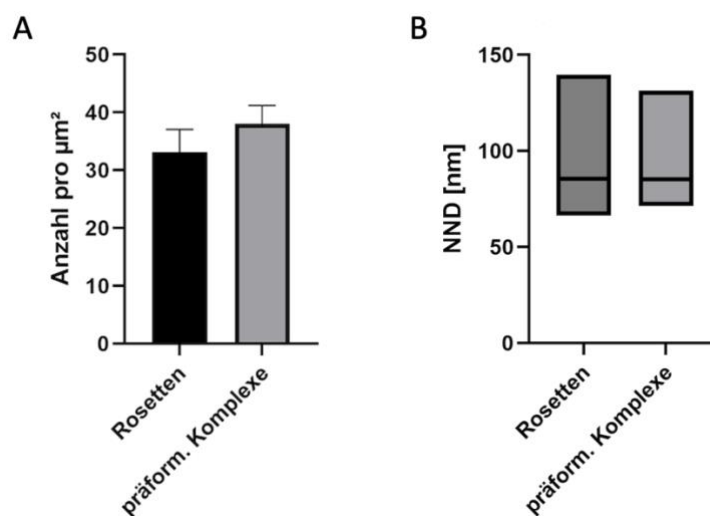


Abb. 17: Verteilung der Rosetten und präformierenden Komplexe in Oli-neu Zellen

(A) Mittelwert samt SEM der Anzahl der Rosetten und präformierenden Komplexe pro μm^2 Zellmembran. (B) NND der Rosetten und präformierenden Komplexe mit Median [unteres Quartil; oberes Quartil] dargestellt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

4.1.4 Vergleich von undifferenzierten Oligodendrozyten und Schwann-Zellen im FRIL

4.1.4.1 Rosetten lassen sich ebenfalls in peripheren Nerven nachweisen

Um die in Oli-neu Zellen beobachteten Partikelformationen wissenschaftlich einordnen zu können, wurden Gefrierbruchproben von Gliazellen *in vivo* verglichen. Die Abb. 18 zeigt einen Gefrierbruch von Proben aus dem Ischiasnerven einer Maus aus einer Arbeit von Rash *et al.* [127]. Abgebildet sind die partikelreichen P-Seiten der inneren, adaxonalen Myelinlamelle (*membrane P-face* 1; MP1; blau unterlegte Fläche) in niedriger (A) bzw. hoher (B) Vergrößerung. Die Cx29-Immunogoldmarkierung mittels kolloidalem Gold in 6 nm bzw. 18 nm Größe ist in (B) sichtbar; assoziierte Partikel wurden blau (B1) unterlegt. Diese kreisförmigen Partikelformationen wurden durch Rash *et al.* [127] als Rosetten beschrieben und konnten

ausschließlich auf den adaxonalen MP1 Membranen nachgewiesen werden. Kopplungspartner der Rosetten bzw. des Cx29 waren in den Replikas nicht erkennbar.

Im Rahmen der Auswertung wurde diese Abbildung von Rash *et al.* [127] auf die Ähnlichkeit zu den Rosetten in Oli-neu Zellen im FRIL untersucht. Rosetten (violett) und präformierenden Komplexen (gelb), welche den zuvor beschriebenen Kriterien entsprachen (vgl. 3.5.3) wurden markiert (A2, B2).

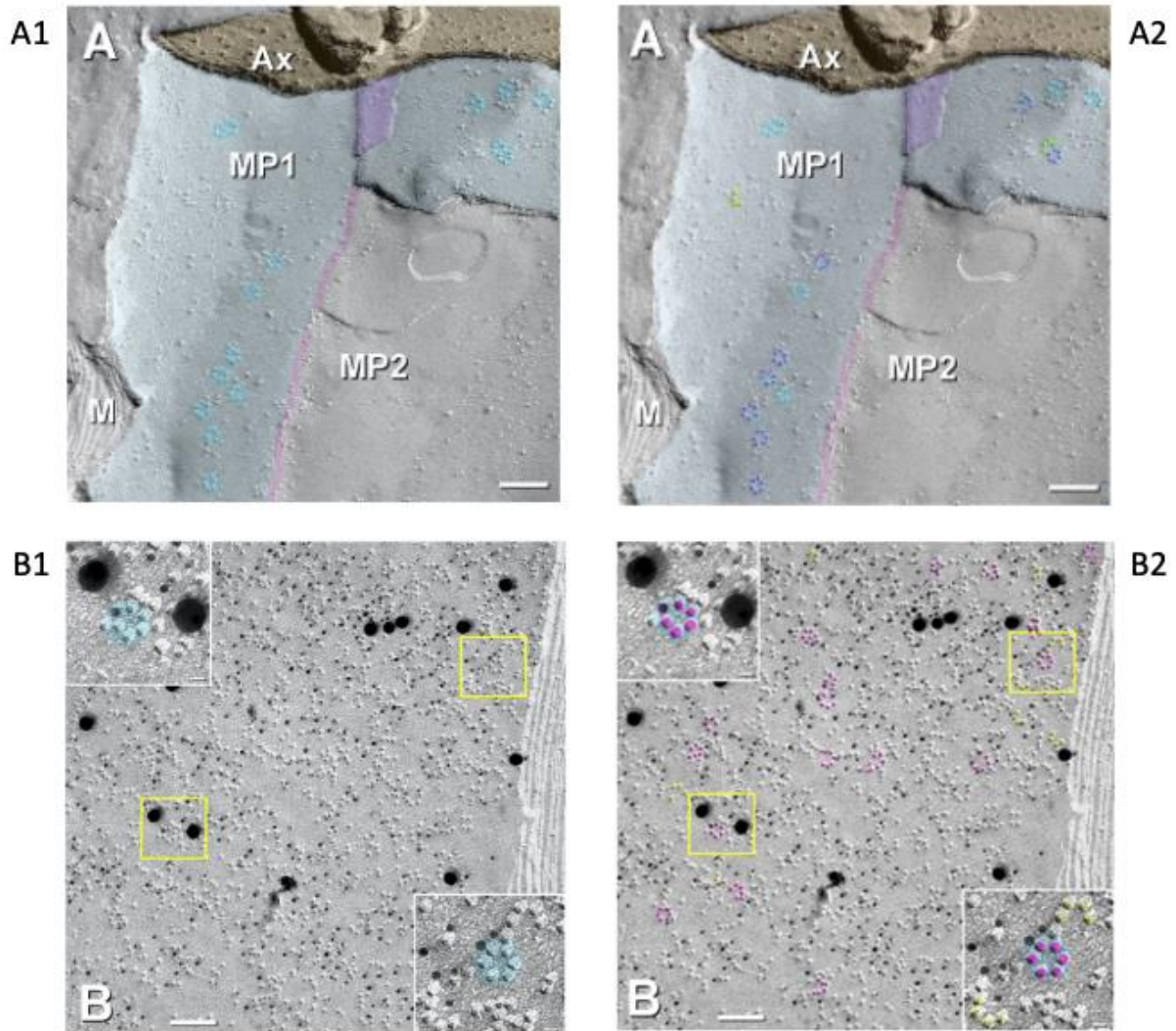


Abb. 18: Rosetten und präformierende Komplexe im FRIL des peripheren Nerven

(A1) Replika einer adaxonalen Myelinlamelle (membrane P-face 1 (MP1) ; blau unterlegte Fläche) eines peripheren Nerven mit blau markierten Rosetten. Zweite Myelinlage (MP2) ohne Nachweis von Rosetten. (A2) Modifizierte Abbildung durch die Markierung von Rosetten (violett) und präformierende Komplexen (gelb) zur Auswertung. (rosa unterlegte Fläche, Tight Junction; lila unterlegte Fläche, axonale E-Seite; orange unterlegte Fläche Axoplasma (Ax); (M) kompaktes Myelin) (B1) Cx29-immunogoldmarkierte P-Seite (Goldpartikel 5 und 20 nm) eines peripheren Nerven. In beiden Ecken exemplarisch vergrößerte Ausschnitte der Membran (gelbe Kästen) mit blau markierten Rosetten. (B2) Modifizierte Abbildung durch die Markierung aller Rosetten (violett) und präformierenden Komplexen (gelb) der Replika zur Auswertung. (Maßstab 0,1 μ m) (Abbildungen modifiziert nach Rash *et al.*, [127], Lizenznummer 6007551374892)

4.1.4.2 Die FRIL-Darstellungen der partikelreichen Membranen aus Oli-neu Zellen und peripheren Nerven ähneln sich

Bei der direkten Nebeneinanderstellung der P-Seite der Oli-neu Zellmembran und der P-Seite der innersten Myelinlamelle des Ischiasnerven der Maus wird ersichtlich, dass die Membranen sich optisch ähneln (Abb. 19 A und B). Beide Membranen sind sehr partikelreich und mit Immunogoldmarkierungen für Cx29 versehen, wobei die Markierungseffizienz für die Myelinabschnitte höher erscheint. Im Vergleich der Vergrößerungsaufnahmen der Rosetten der Oli-neu Zellen (Abb. 19 a1) und des Myelins des Ischiasnerven (Abb. 19 b1) wirken die Abbildungen der Rosetten des Ischiasnerven überwiegend annäherungsweise hexagonal bis rund. Die Rosetten der Oli-neu Zellen formieren sich ähnlich, jedoch wirken sie nicht ideal hexagonal. Da die Arbeitsgruppe von Rash *et al.* [127] jedoch ebenfalls nicht ideal hexagonal geformte Anordnungen in die Auswertung miteinbezogen hat, werden ebenjene Anordnungen auch in die vorliegende Auswertung aufgenommen. Darüber hinaus ließen sich auf der Myelinmembran ebenso Formationen aus vier Connexonen erkennen. Diese ähneln durch ihre halbkreisförmige Anordnung den sogenannten präformierenden Komplexen, die zuvor auf der Oli-neu Zellmembran beschrieben wurden (Abb. 16). Neben diesen Formationen waren auf beiden Membranen alleinstehende Partikel zu verzeichnen.

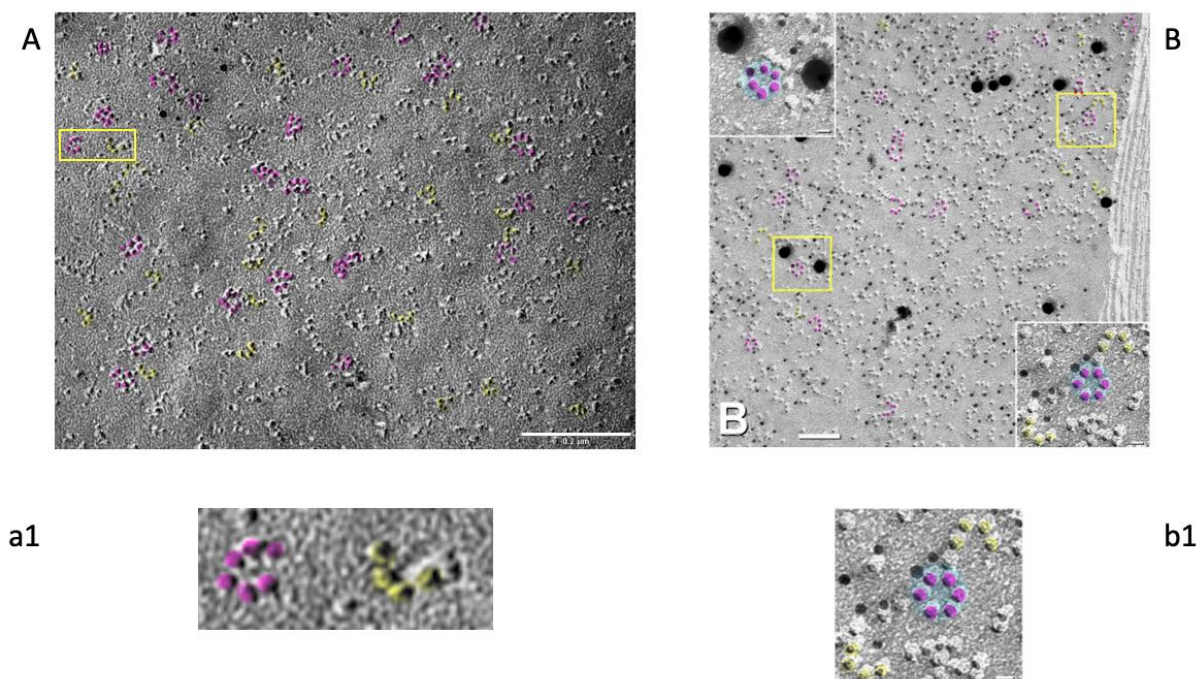


Abb. 19: Vergleich zwischen Oli-neu Zellen und Schwann-Zellen im FRIL

(A) Cx29-immunogoldmarkierte P-Seite einer Oli-neu Zelle (Goldpartikel 6 und 12 nm). Einige Partikel sind zu Rosetten (violett) und präformierenden Komplexen (gelb) formiert. (a1) Vergrößerungsansicht einer Rosette und eines präformierenden Komplexes aus (A) (gelber Kasten). (B) Cx29-immunogoldmarkierte P-Seite des inneren Myelins eines Ischiasnerven der Maus (modifiziert nach Rash *et al.*, [127], Lizenznummer 6007551374892) mit einer hohen Labeling-Effizienz und Spezifität. Einige Partikel sind zu Rosetten (blau unterlegt durch Rash *et al.*; violette Markierung

modifiziert) und präformierenden Komplexen (gelbe Markierung modifiziert) formiert. In beiden Ecken exemplarisch vergrößerte Ausschnitte der Membran (gelbe Kästen) mit blau markierten Rosetten (Goldpartikel 5 und 20 nm). (b1) Vergrößerungsansicht einer Rosette und zwei präformierender Komplexe (oberer gelber Kasten aus (B), blau unterlegt durch Rash et al.; violette und gelbe Markierung modifiziert). Optisch wirken beide Membranen ähnlich. (Maßstab (A) 0,2 µm, (B) 0,1 µm)

4.1.4.3 Connexone der Oli-neu Zellen zeigen eine signifikant kleinere **Nearest-Neighbor-Distance** als die Connexone des Ischiasnerven

Da die Rosetten der beiden Vergleichsgruppen optisch ähnlich erschienen, wurde zur quantitativen Auswertung der Bilder des Ischiasnerven der Maus die NND der einzelnen Connexone herangezogen, äquivalent zur Auswertung der Connexone der Oli-neu Zellen (vgl. Abb. 20).

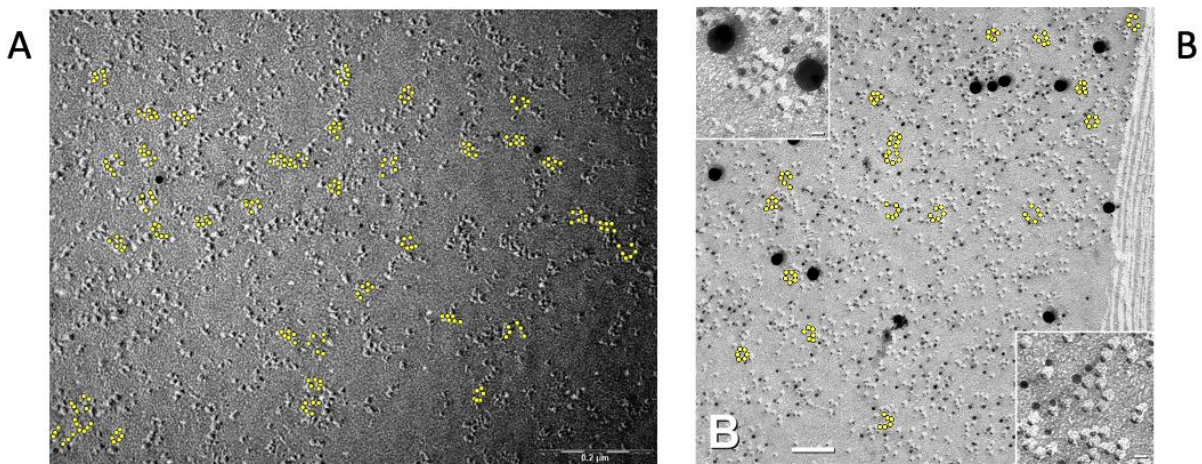


Abb. 20: Bestimmung der NND der Connexone in Oli-neu Zellen und Schwann-Zellen

(A) Cx29-immunogoldmarkierte P-Seite einer Oli-neu Zelle (Goldpartikel 6 und 12 nm). Die gelben Markierungen entsprechen den einzelnen Partikeln einer Rosette. (B) Cx29-immunogoldmarkierte P-Seite des inneren Myelins eines Ischiasnerven der Maus. (Gelbe Markierung der einzelnen Partikel der Rosetten modifiziert nach Rash et al., [127], Lizenznummer 6007551374892) (Maßstab (A) 0,2 µm, (B) 0,1 µm)

Statistisch zeigte die Auswertung der NND, dass die Connexone einer Rosette der Oli-neu Zellen mit im Median 9,742 nm [1. Quartil 8,5 nm; 3. Quartil 10,37 nm] einen signifikant kleineren Abstand aufweisen als die Connexone einer Rosette der Myelinabschnitte aus dem Ischiasnerven. Dort beläuft sich der Abstand im Median auf 11,42 nm [1. Quartil 10,52 nm; 3. Quartil 12,55 nm]. Zur statistischen Auswertung wurde der nicht-parametrische *Mann-Whitney U-Test* durchgeführt.

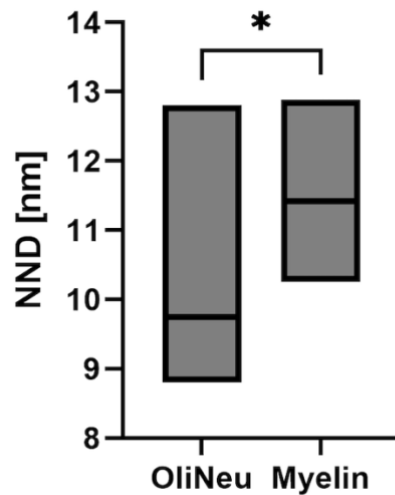


Abb. 21: NND der Connexone von Oli-Neu Zellen und Schwann-Zellen im Vergleich

Für die Connexone wurde die NND als Median [unteres Quartil; oberes Quartil] dargestellt. Der mittlere Abstand zwischen den Connexonen einer Rosette stellt sich im Myelin des PNS signifikant größer dar.

Zusammenfassend zeigen die Analysen, dass undifferenzierte Oli-neu Zellen oligodendrozytenspezifische Proteine exprimieren, darunter auch Myelin-Proteine und verschiedene Gap Junction-Proteine. Besonders Cx29 kommt dabei eine wichtige Rolle zu, da es sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene besonders hohe Expressionen zeigt. Vor allem durch die FRIL-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Oli-neu Zellen Cx29 in Form von Transmembranpartikeln ausbilden, die ultrastrukturell als Rosetten bzw. präformierende Komplexe dominieren. Nicht zuletzt hierdurch erhält die Zellmembran Ähnlichkeit zu adaxonalen Myelinmembranen, wie beispielsweise des Ischiasnerven [127].

4.2 Einfluss von Cuprizon bzw. Cuprizon und Probenecid auf Oli-neu Zellen

Wie bereits in Tiermodellen gezeigt werden konnte, bewirkt die CPZ-Applikation den Zelltod von Oligodendrozyten und eine Demyelinisierung [90]. Ähnliche Effekte konnten *in vitro* bereits für reife Oligodendrozyten dargestellt werden [12]. Aber auch für Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden *in vitro* durch die Applikation von CPZ negative Auswirkungen, im Sinne eines Rückgangs der Differenzierungsrate, dargestellt [12]. Darüber hinaus konnten *in vivo* Hinweise für einen antagonisierenden Effekt durch die Applikation des Wirkstoffs Probenecid bereits durch Hainz *et al.* [51] dargestellt werden. Ob sich solche Effekte durch CPZ auch in Oli-neu Zellen abbilden lassen und ob diese Auswirkungen durch PBN umgekehrt werden können, wurde im Folgenden untersucht.

4.2.1 Analyse der mRNA-Expression nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN

4.2.1.1 Die Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN induzieren keine signifikante Veränderung der Connexin-Expression in undifferenzierten Oli-neu Zellen

Die Abbildung zeigt die relative mRNA-Expression von Cx29, Cx32 und Cx47 in undifferenzierten Oli-neu Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit CPZ und CPZ+PBN. Durch die Applikation von CPZ bzw. von CPZ+PBN wurde kein signifikanter Expressionsunterschied für die jeweilige mRNA induziert ($p > 0,05$). Zur statistischen Analyse wurde die parametrische *Ordinary one-way ANOVA* und ein *Tukey's multiple comparison Test* als *Post-hoc-Test* durchgeführt.

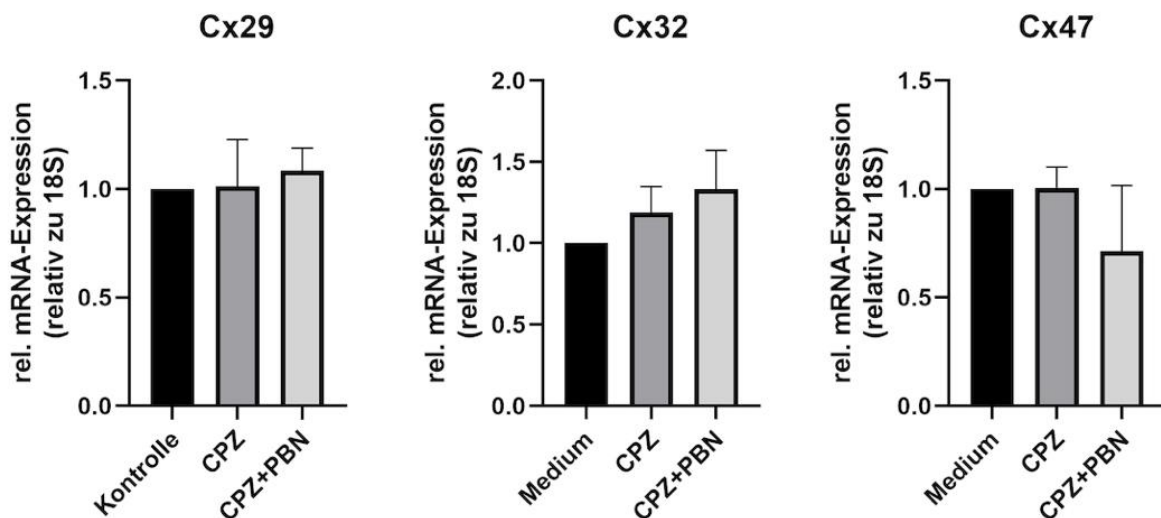


Abb. 22: Relative mRNA-Expression von Cx29, Cx32 und Cx47 in Oli-neu Zellen nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN

Die mRNA-Expression von Cx29, Cx32 und Cx47 wurde in undifferenzierten Oli-neu Zellen nach Inkubation im Kontrollmedium, mit CPZ und CPZ+PBN mittels qPCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte samt Standardfehler (SEM), relativ zu den auf 1.0 gesetzten Werten der Kontrollgruppe. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression.

4.2.1.2 Die Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN induziert keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression der oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine

Die Abbildung zeigt die relative mRNA-Expression von *Mbp*, *Plp1*, *Olig2* und *CNPase* in undifferenzierten Oli-neu Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit CPZ bzw. mit CPZ+PBN. In allen Gruppen ließ sich nach Inkubation kein signifikanter Expressionsunterschied für die jeweilige mRNA beobachten ($p > 0,05$). Zur statistischen Analyse wurde die parametrische *Ordinary one-way ANOVA* und ein *Tukey's multiple comparison Test* als *Post-hoc-Test* durchgeführt. Bei fehlender Normalverteilung für PLP1 wurde für diese Versuchsgruppe der nicht-parametrische *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt. Als *Post-hoc-Test* erfolgte der *Dunn's multiple comparison Test*.

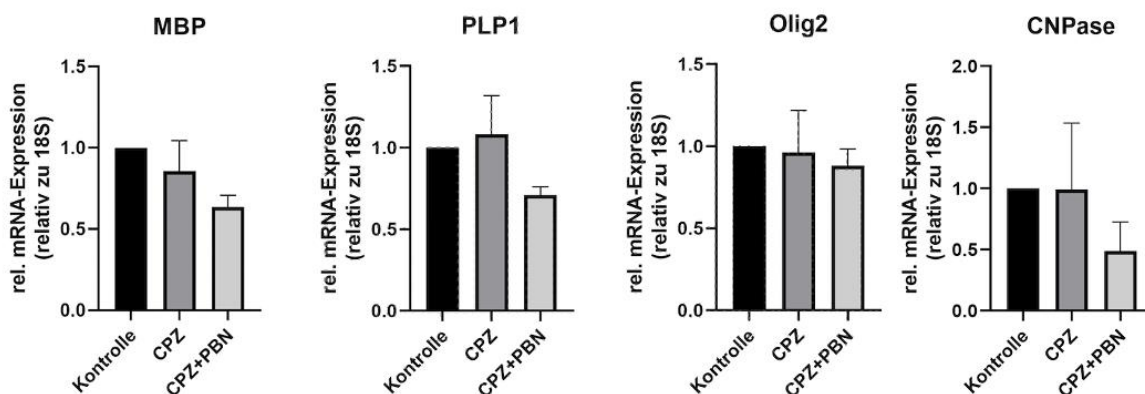


Abb. 23: Relative mRNA-Expression von *Mbp*, *Plp1*, *Olig2* und *CNPase* nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN

Die mRNA-Expression von *Mbp*, *Plp1*, *Olig2* und *CNPase* wurde in undifferenzierten Oli-neu Zellen nach Inkubation im Kontrollmedium, mit CPZ und CPZ+PBN mittels qPCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte samt Standardfehler (SEM), relativ zu den auf 1.0 gesetzten Werten der Kontrollgruppe. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression.

4.2.2 Analyse der Immunfluoreszenzfärbung nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN

Nach dem Nachweis des Cx29 und der oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine MBP und PLP1 in der Kontrollgruppe mittels Immunfluoreszenzfärbung in Oli-neu Zellen (vgl. 4.1.2), wird im nächsten Schritt die Auswirkung der Applikation von CPZ bzw. CPZ+PBN dargestellt.

4.2.2.1 Die Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN verändert die Signalintensität der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbungen von Cx29 und den Myelin-Proteinen MBP und PLP1 zeigen optisch qualitative Veränderungen nach CPZ bzw. CPZ+PBN-Applikation (Abb. 24). Cx29 zeigt sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Behandlungsgruppe mit CPZ+PBN eine starke Signalintensität. Für die mit CPZ behandelte Gruppe wirkt das Signal blasser. Für MBP wirkt das Immunfluoreszenzsignal in der Kontrollgruppe sehr hell, in den weiteren Versuchsgruppen wirkt es abgeschwächt. Für die PLP1-Färbung zeigt das Signal, wie für die Cx29-Färbung, in der Kontrollgruppe und in der CPZ+PBN-Gruppe eine starke Intensität, durch die Applikation von CPZ hingegen ist die Signalintensität abgeschwächt.

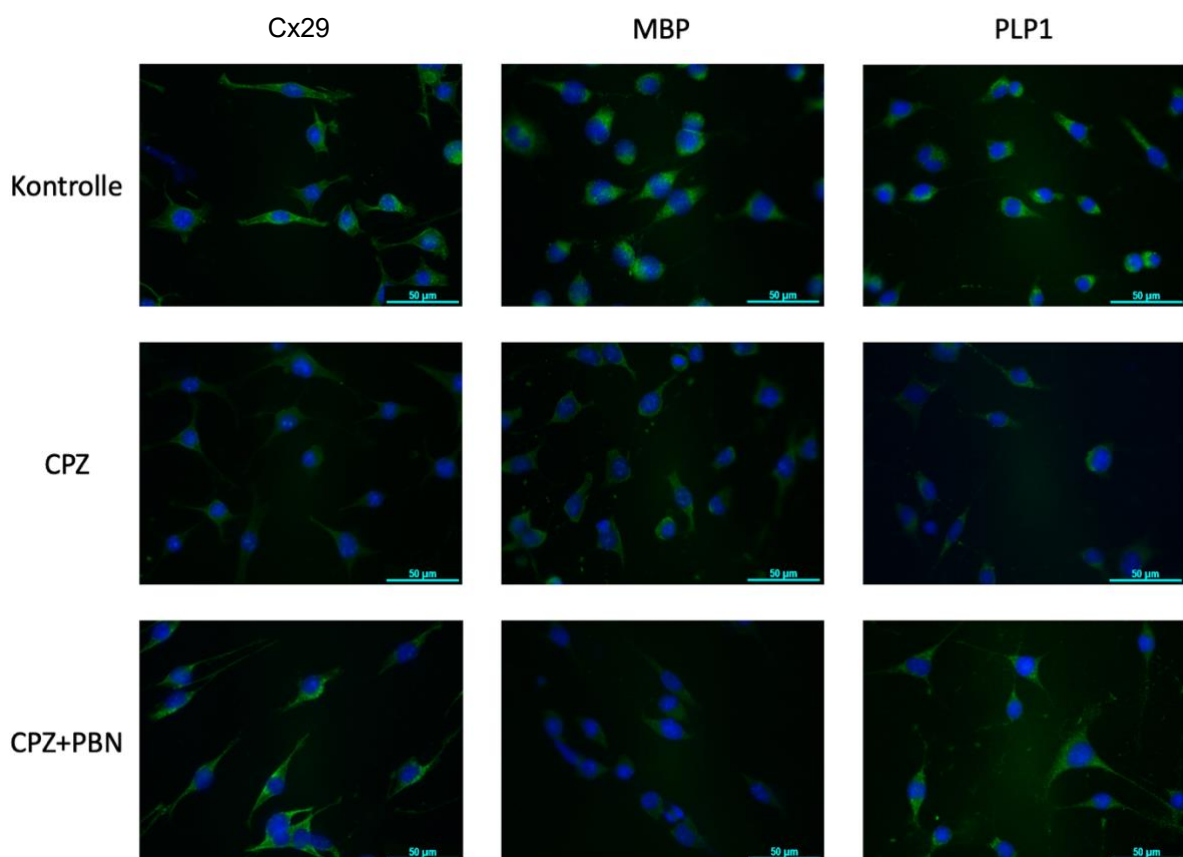


Abb. 24: Untersuchungsgruppen der Immunfluoreszenzfärbung

Abgebildet sind die im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung untersuchten Gruppen der Oli-neu Zellen (ausgenommen die Negativkontrolle). Die obere Zeile zeigt die Oli-neu Zellen unter Kontrollbedingungen. Die mittlere Zeile zeigt die Zellen, die mit CPZ inkubiert wurden. Die untere Zeile zeigt die Zellen, die mit CPZ+PBN inkubiert wurden. Für die drei Gruppen wurden das Immunfluoreszenzsignal (jeweils grün) für Cx29 (linke Spalte), MBP (mittlere Spalte) und PLP1 (rechte Spalte) untersucht. Die Kontrollgruppen zeigen für alle untersuchten Proteine eine hohe Signalintensität. Durch die Applikation von CPZ scheint das Signal abgeschwächt zu werden. Durch die zusätzliche Applikation von PBN wird die Fluoreszenzintensität für Cx29 und PLP1 stärker, für MBP bleibt sie gering. Die Zellkerne sind über DAPI blau markiert. (Maßstab 50 µm)

4.2.2.2 Die Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN induziert eine signifikante Verringerung der Zellfläche der Oli-neu Zellen

Bei der Gegenüberstellung der Zellfläche der Oli-neu Zellen (Auswertung im Durchlichtbild, vgl. Abb. 4 C) wurde ersichtlich, dass die Zellen der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von $468,2 \mu\text{m}^2$ / Zelle ($\pm 20,48$ SEM) die größte Fläche aufweisen. Im Vergleich dazu konnte nach CPZ-Applikation ein signifikanter Abfall ($p < 0,01$) der Zellgröße auf im Mittel $367 \mu\text{m}^2$ / Zelle ($\pm 20,72$ SEM) beobachtet werden. Auch die Versuchsgruppe mit CPZ+PBN zeigte in diesem Vergleich einen signifikanten Abfall ($p < 0,5$) der Zellgröße verglichen mit den Kontrollen (Mittelwert $392,1 \mu\text{m}^2$ / Zelle $\pm 23,32$ SEM). Zwischen der CPZ-Gruppe und der CPZ+PBN-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Zur statistischen Auswertung wurde bei fehlender Normalverteilung der nicht-parametrische *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt. Als *Post-hoc-Test* erfolgte der *Dunn's multiple comparison Test*.

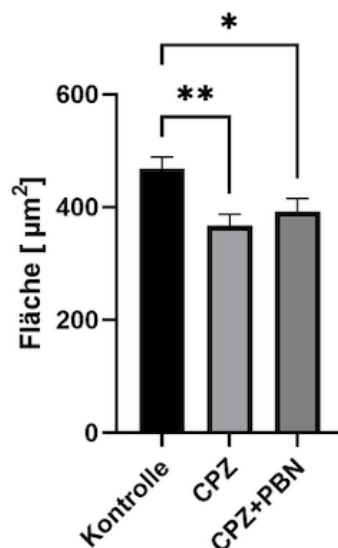


Abb. 25: Zellfläche der Oli-neu Zellen nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN

Darstellung der Mittelwerte samt SEM der Zellfläche [μm^2] der undifferenzierten Oli-neu Zellen. Verglichen wird die Kontrollgruppe mit der CPZ- bzw. CPZ+PBN-Applikation. Im Verhältnis zur Kontrollgruppe zeigt sich eine signifikante Abnahme der Zellgröße durch die Applikation von CPZ. Auch durch die Applikation von CPZ+PBN zeigt sich im Verhältnis zur Kontrollgruppe ein signifikanter Abfall der Zellgröße. Zwischen der CPZ- und der CPZ+PBN-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

4.2.2.3 Die Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN hat signifikante Effekte auf die Größe der immunpositiven Fläche

Die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung für die CPZ- bzw. CPZ+PBN-Gruppe erfolgte äquivalent zur Auswertung der Kontrollgruppe (vgl. 4.1.2.2). Die statistische Auswertung wurde im Folgenden bei fehlender Normalverteilung mit dem nicht-parametrischen *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt. Als *Post-hoc-Test* erfolgte der *Dunn's multiple comparison Test*.

In der Auswertung für Cx29 zeigte sich für die Kontrollgruppe ein Mittelwert von 40,44 % immunpositiver Fläche der Zellfläche ($\pm 2,537$ SEM). Durch die Applikation von CPZ konnte im Verhältnis zur Kontrollgruppe ein signifikanter ($p < 0,01$) Abfall der immunpositiven Fläche auf 27,95 der Zellfläche ($\pm 3,208$ SEM) erzielt werden. Durch die Applikation von PBN konnte dem Effekt des CPZ entgegengewirkt werden. Mit einem Mittelwert von 44,43 % immunpositiver Fläche der Zellfläche ($\pm 3,334$ SEM) in der CPZ+PBN-Gruppe zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,01$) Anstieg im Verhältnis zur CPZ-Gruppe. In Relation zur Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Die Immunfluoreszenzsignale der Myelinproteine MBP und PLP1 zeigten ebenfalls CPZ-induzierte Veränderungen. In der statistischen Betrachtung für MBP zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,01$) Abfall zwischen der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 33,98 % immunpositiver Fläche der Zellfläche ($\pm 2,665$ SEM) und der CPZ-Gruppe mit einem Mittelwert von 24,97 % immunpositiver Fläche der Zellfläche ($\pm 3,592$ SEM). Die Applikation von CPZ+PBN resultierte in einem signifikanten Abfall ($p < 0,01$) der immunpositiven Fläche auf einen Mittelwert von 20,44 % immunpositiver Fläche der Zellfläche ($\pm 2,797$ SEM) verglichen mit der Kontrollgruppe. Im Vergleich der CPZ- und CPZ+PBN-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Auch für PLP1 ließ sich statistisch ein signifikanter ($p < 0,0001$) Abfall zwischen der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 37,92 % immunpositiver Fläche der Zellfläche ($\pm 3,086$ SEM) und der CPZ-Gruppe mit einem Mittelwert von 18,08 % immunpositiver Fläche der Zellfläche ($\pm 2,839$ SEM) darstellen. Im Vergleich mit den anderen Gruppen konnte durch die Applikation von CPZ+PBN dem Effekt des CPZ entgegengewirkt werden. Mit einem Mittelwert von 33,36 % immunpositiver Fläche der Zellfläche ($\pm 3,320$ SEM) zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg im Verhältnis zur CPZ-Gruppe. In Relation zur Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

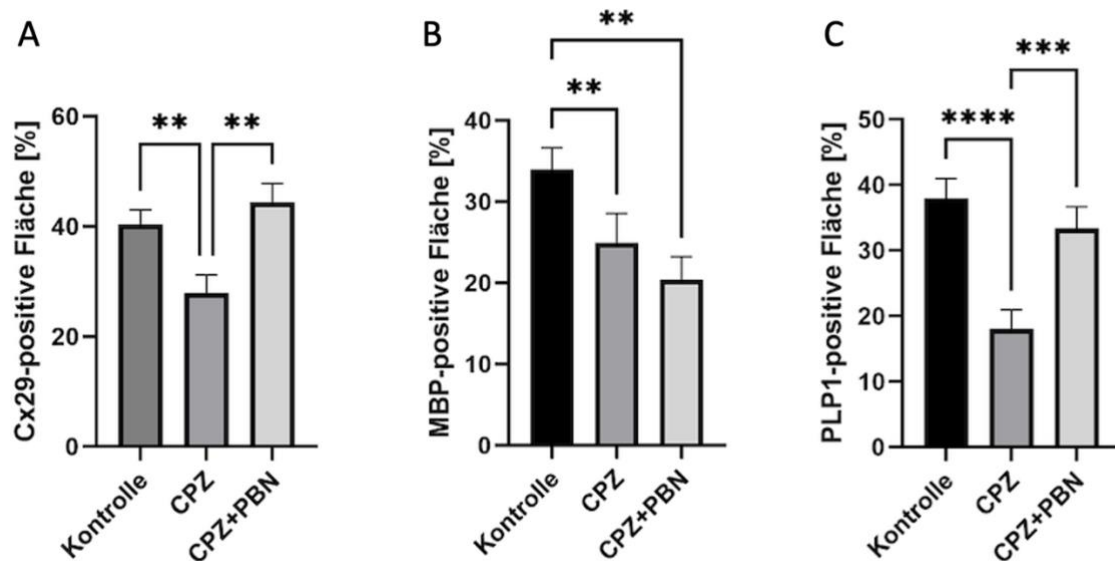


Abb. 26: Immunpositive Fläche für Cx29, MBP und PLP1 nach Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN

Darstellung der Mittelwerte samt SEM (A) der Cx29-immunpositiven Fläche [%], (B) der MBP-immunpositiven Fläche [%] und (C) der PLP1-immunpositiven Fläche [%] der undifferenzierten Oli-neu Zellen. Verglichen wird jeweils die Kontrollgruppe mit der CPZ- bzw. CPZ+PBN-Inkubation. In der statistischen Auswertung wies sich für alle Gruppen (A, B, C) im Verhältnis zur Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme des Signals durch die Applikation von CPZ auf. Im Vergleich mit der CPZ-Gruppe zeigte die Applikation von CPZ+PBN für Cx29 und PLP1 (A, C) einen signifikanten Signalanstieg. Für MBP bestand kein signifikanter Effekt (B). Zwischen Kontrollgruppe und der CPZ+PBN-Gruppe bestand für Cx29 und PLP1 (A, C) kein Effekt, für MBP (B) war die immunpositive Fläche signifikant verkleinert.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass auf Ebene der RNA-Analyse kein signifikanter Einfluss durch die Applikation von CPZ bzw. CPZ+PBN abgebildet werden konnte.

Anders stellt es sich auf der Ebene der Proteinanalyse dar. Durch die Applikation von CPZ konnte für alle drei analysierten Proteinen (Cx29, MBP, PLP1) ein signifikanter Abfall der immunpositiven Fläche induziert werden. Diesem Effekt konnte durch die Applikation von CPZ+PBN für Cx29 und PLP1 entgegengewirkt werden, denn es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der immunpositiven Fläche im Vergleich zur CPZ-Gruppe. Im Verhältnis von Kontrollgruppe zur CPZ+PBN-Gruppe zeigte sich für beide Proteine keine signifikanten Unterschiede. Anders war es für MBP. Obwohl sich ein signifikanter Abfall der immunpositiven Fläche durch die Applikation von CPZ abbilden ließ, blieb ein Anstieg auf das Normalniveau der Kontrollgruppe durch die Applikation von CPZ+PBN aus. Die immunpositive Fläche war signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung einer CPZ-Applikation auf oligodendrozytenspezifische Proteine, wie z. B. Connexine und Myelinproteine, in Oli-neu Zellen zu analysieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob durch die zusätzliche Applikation des Wirkstoffs PBN Gegenwirkungen zu den CPZ-induzierten Auswirkungen dargestellt werden können. Hieraus sollten Rückschlüsse auf einen möglichen Therapieansatz der Erkrankung der Multiplen Sklerose gezogen werden.

Oli-neu Zellen entsprechen immortalisierten, undifferenzierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und gelten als leicht zu expandieren. Sie verbleiben bis in hohe Passagen mit stabilem Antigenprofil [61] und stellen somit eine solide Grundlage für weiterführende Untersuchungen dar. Untersucht wurden die Zellen auf Ebene der RNA (RT-PCR, qPCR), der Proteinexpression (Immunfluoreszenzfärbung) und schlussendlich morphologisch auf subzellulärer Ebene (FRIL). Oligodendrozyten nehmen im Rahmen der MS einen besonderen Stellenwert ein. Als Teil des Pathomechanismus der Erkrankung besteht die Vorstellung, dass nach einer Oligodendrozytenstörung eine sekundäre Inflamationsreaktion folgt [147]. Es kommt nicht nur zu einem Untergang reifer Oligodendrozyten, sondern vor allem in chronischen MS-Läsionen zu einem Verlust von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen [146]. Eine solche Oligodendrozytenstörung kann im toxischen CPZ-Modell abgebildet werden. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen einer CPZ-Applikation auf undifferenzierte Oli-neu Zellen untersucht. Da Hainz *et al.* [51] bereits zeigen konnten, dass PBN einer CPZ-induzierten Demyelinisierung *in vivo* entgegengewirkte, soll PBN auch *in vitro* eingesetzt werden, um mögliche Gegeneffekt zum CPZ aufzuzeigen.

5.1 Analyse undifferenzierter Oli-neu Zellen

5.1.1 Olig2 und CNPase

In der Entwicklung der Oligodendrozyten können verschiedene Reifungsstadien anhand der spezifischen Expression bestimmter Marker unterschieden werden (siehe Einleitung).

Während der Transkriptionsfaktor Olig-2 in frühen Entwicklungsstadien exprimiert wird [158], wird das Enzym CNPase erst ab dem Stadium der Prä-Oligodendrozyten, welche bereits beginnen, Myelinausläufer zu formieren, exprimiert [20,68]. Dies wird auch in der Aufstellung von Scherer *et al.* deutlich, welche die zeitliche Abfolge der Expression von oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteinen in nicht-immortalisierten Zellen visualisiert [132].

Da es sich bei Oli-neu Zellen um immortalisierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen handelt, durchwandern sie somit keine weiteren Reifungsprozesse mehr, sondern repräsentieren einen

gewissen *status quo* des oligodendrozytären Reifungsprozesses. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA für die beiden genannten Proteine bereits in undifferenzierten Oli-neu Zellen exprimiert wird. Durch die Auswertung mittels q-PCR wird deutlich, dass die mRNA-Expression dieser Proteine quantitativ keinen signifikanten Unterschied aufweist. Die Tatsache, dass die mRNA beider Proteine in Oli-neu Zellen gleichzeitig vorliegt, bestätigt, dass es sich bei Oli-neu Zellen um unausgereifte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen handelt, welche sich in einem fortgeschrittenen Stadium des Reifungsprozesses befinden. Um das Stadium weiter eingrenzen und klassifizieren zu können, wäre eine Untersuchung hinsichtlich im Reifungsprozess früher exprimierter Marker, wie beispielsweise dem Wachstumsfaktor PDGFR-alpha, welcher im Stadium der OPC und der Prä-Oligodendrozyten in Oligodendrozyten nachweisbar ist [68], sehr interessant.

5.1.2 Myelin-Proteine

Es ist bekannt, dass auch in undifferenzierten Oligodendrozyten, welche noch kein Myelin formieren können, bereits Myelin-Proteine wie das MBP [129] und PLP1 [48] exprimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *Mbp* mittels RNA-Analyse in signifikantem Maße in Oli-neu Zellen detektiert werden. Unter den analysierten Proteinen (*Mbp*, *Plp1*, *CNPase*, *Olig2*) zeigte das *Mbp* eine signifikant ($p < 0,01$) höhere mRNA-Expression als die anderen. Diese Anteilsverteilung erscheint unter der Betrachtung, dass im ZNS das MBP mit 30% einen großen Anteil der oligodendrozytären Myelinproteine ausmacht wenig erstaunlich [9]. Da undifferenzierte Oli-neu Zellen jedoch kein Myelin ausbilden, stellte sich die Frage, ob der mRNA-Nachweis für *Mbp* in Oli-neu Zellen lediglich ein Ausdruck der Genexpression ist, oder ob in diesen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen bereits frühzeitig die Translation stattfindet, was somit auf eine myelinunabhängige Funktion des MBP hinweisen könnte.

Um dies zu analysieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei konnte auch das MBP-Protein in den Oli-neu Zellen detektiert werden. Hieraus lässt sich folgern, dass das MBP auch an myelinunabhängigen Funktionen beteiligt sein könnte. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass das MBP mit einer hohen Anzahl an Molekülen interagiert [45], was auf eine vielfältige Funktionalität hinweist. Wie bereits zuvor angedeutet, ist das MBP beispielsweise essenziell für die Formierung des Myelins im ZNS [17]. Darüber hinaus trägt es zur Kompaktierung der einzelnen Myelinlagen durch die Mitbeteiligung an der Adhäsion der zytosolischen Oberflächen der Myelinlagen bei [115,130]. Neben den myelinbezogenen Funktionen, wird von einer Beteiligung an der Organisation des Zytoskeletts und der Signaltransduktion ausgegangen. Im Zytoskelett kann das MBP an verschiedene Aktinmoleküle anschließen [8,35]. Durch die Interaktion von membrangebundenem MBP mit Aktin könnte dies so an die zytosolische Oberfläche der Oligodendrozyten, aber auch an

Myelin-Plasma-Membranen gebunden werden [45]. Auch wird zwischen Mikrotubuli, als weiteren Bestandteilen des Zytoskeletts, und MBP eine Assoziation vermutet, denn in unausgereiften Oligodendrozytenpopulationen konnten sie als kolokalisiert dargestellt werden [154]. Darüber hinaus bindet MBP an die SH3-Domäne [53]. Diese Sequenz vermittelt spezifische Proteininteraktionen in der Signaltransduktion [53]. Somit wird dem MBP eine modulierende Funktion im Rahmen dessen beigemessen.

Auffällig war, dass im Rahmen dieser Arbeit das Immunfluoreszenzsignal für MBP vor allem in Nähe des Zellkerns lokalisiert war. Zu diesen Beobachtungen passt, dass auch durch Wilson *et al.* in unausgereiften Oligodendrozyten gezeigt werden konnte, dass das Immunfluoreszenzsignal für MBP im Zellkörper, insbesondere in der Nähe des Zellkerns, am größten war [154]. In anderen Untersuchungen konnte das MBP jedoch auch an vielen unterschiedlichen subzellulären Orten in Oligodendrozyten lokalisiert werden [54]. Rassul *et al.* erstellten ein *in vitro*-Mobilitätsprofil für MBP. Dabei war ersichtlich, dass MBP in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nur wenig zielgerichtete Bewegung zeigt. Im weiterführenden Reifungsprozess wird die Bewegung nach außen hin zielgerichteter [129]. Dies wurde als Hinweis für zunehmende Interaktionen des MBP mit anderen Molekülen des Zytoskeletts gesehen und für die Beteiligung an der Ausbildung der Myelinscheiden gewertet [129]. Somit bleibt es an dieser Stelle interessant zu überprüfen, ob sich durch die Ausreifung der Oli-neu Zellen eine Veränderung im Verteilungsprofil des MBP-Proteins nachweisen lässt und auch hieraus auf eine mögliche Interaktion mit anderen Zellbestandteilen geschlossen werden kann.

Zusammengefasst erscheint es aus den genannten Gründen wahrscheinlich, dass das MBP zur physiologischen Entwicklung und zur Funktion von Oligodendrozyten in unterschiedlichen Reifungsstadien beiträgt [45]. Hierdurch könnte der signifikante mRNA-Nachweis des *Mbp* in Oli-neu Zellen, ebenso wie der Nachweis der frühen und hohen Proteinexpression erklärt werden.

Ein weiteres wichtiges Myelinprotein ist das PLP1. Es ist bekannt, dass das Protein PLP1 nicht nur in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ausgebildet wird [48], sondern auch in anderen nicht-neuronalen Zellen [138] sowie in Neuronen [104]. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass PLP1 auch in myelinunabhängige Funktionen, wie beispielsweise den Ionenaustausch, die Zellmigration und den programmierten Zelltod, involviert ist [45]. So wurde z. B. in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen durch die Interaktion von PLP1 mit einem Integrin die Regulation der Migration von diesen Zellen beeinträchtigt [48]. Auch scheint durch PLP1 das Oligodendrozytenüberleben moduliert zu werden. So resultierte aus einer PLP1-Mutation eine Beschränkung der Myelinformation, aber auch eine Reduktion des Oligodendrozytenüberlebens. Die Ursache hierfür wurde in einer fehlerhaften

Membraninteraktion vermutet [18]. Andererseits führte auch eine Überexpression von PLP1 zu einem Oligodendrozytenuntergang. Ein Grund hierfür wurde in der Beeinträchtigung des pH-Wertes durch PLP1 vermutet [139]. Einen anderen Grund könnte eine mitochondriale Dysfunktion darstellen [58]. Zusammengefasst leiten uns diese Informationen zu der Annahme, dass auch PLP1 eine hohe Relevanz im Rahmen der Homöostase der Oligodendrozyten zukommt.

In den dargelegten Untersuchungen konnte in der RNA-Analyse nicht nur die mRNA-Expression des *Plp1* dargelegt werden, sondern im Rahmen der Fluoreszenzuntersuchung auch die Translation des Proteins in Oli-neu Zellen bewiesen werden. Das Fluoreszenzsignal für PLP1 war in der Nähe des Zellkernes am stärksten, was sich ähnlich zum MBP-Nachweis darstellt. Dass der Proteinnachweis in undifferenzierten Oli-neu Zellen möglich war, untermauert die oben genannten Annahmen, dass dieses Protein neben der Aufgabe eines Myelinproteins weitere Funktionen erfüllt.

Unter den analysierten Proteinen zeigte das *Mbp* eine signifikant ($p < 0,01$) höhere mRNA-Expression als die anderen untersuchten Proteine (*Plp1*, *CNPase*, *Olig2*). Dies erscheint nicht erstaunlich, denn im ZNS stellt das MBP mit 30% einen großen Anteil der oligodendrozytären Myelinproteine dar [9]. Beim quantitativen Vergleich der Proteinexpression von MBP und PLP1 in der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Proteinen, es wird eine immunpositive Fläche von ca. 35 - 40% erreicht. Dieses Ergebnis scheint besonders auffallend, da bisher mittels *Western Blot* noch kein Proteinnachweis für MBP und PLP1 in undifferenzierten Oli-neu Zellen gelang [120]. Durch Pereira *et al.* [120] gelang dieser Nachweis lediglich nach der Differenzierung der Oli-neu Zellen. Daraus wurde geschlossen, dass Oli-neu Zellen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sind und aus diesem Grund noch kein Myelin und keine Myelinproteine synthetisieren. Dies konnte durch die vorliegenden Ergebnisse widerlegt werden und scheint somit die bisherigen Annahmen, dass Myelinproteine auch Aufgaben erfüllen, welche sich nicht auf das Myelin beziehen, zu stützen. Besonders unerwartet erscheint jedoch, dass sich die anfänglichen Unterschiede für *Mbp* und *Plp1* in der mRNA-Expression nicht auf die MBP- und PLP1-Proteinsynthese übertragen lassen und beide Proteine in gleicher Stärke vorhanden sind. Somit bleibt der Grund, wieso die Translationseffektivität für PLP1 größer ist als für MBP weiterhin offen. Es gilt dies im Rahmen weiteren Versuchen zu untersuchen. Ebenfalls erscheint eine Untersuchung hinsichtlich der mRNA- und Proteinexpression in differenzierten Oli-neu Zellen sehr interessant, um somit weitere Vergleiche zu der Arbeit von Pereira *et al.* herstellen zu können.

5.1.3 Connexine

Für die drei Connexine Cx29, Cx32 und Cx47 ist die Expression in myelinisierenden Oligodendrozyten bereits beschrieben [3,109]. Über nicht-myelinisierende Oli-neu Zellen ist bekannt, dass diese bereits Cx29 bilden können [142]. Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich in der RNA-Analyse die oligodendrozytären Connexine Cx29, Cx32 und Cx47 bereits im undifferenzierten Stadium der Oli-neu Zellen mittels RT-PCR qualitativ nachweisen.

Söhl *et al.* beschrieben bereits die mRNA-Expression für Cx29 in Mäusehirnen mittels *Northern Blot*. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Cx29-mRNA ab dem siebten postnatalen Tag nachweisbar ist. Die Expression war am 14. postnatalen Tag am höchsten und nahm mit zunehmendem Alter wiederum ab [140]. Auch in Oli-neu Zellen erbrachten Söhl *et al.* bereits den Nachweis für die Cx29-mRNA mittels *Northern Blot* [142]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Cx29 qualitativ mittels RT-PCR und anschließend quantitativ mittels qPCR aufgezeigt. Entsprechend Söhls Überlegung aus der Oli-neu Studie wird davon ausgegangen, dass der besonders frühe Nachweis von Cx29 *in vitro*, im Vergleich zum Cx29-Nachweis *in vivo*, als Nebeneffekt der Transfektion mit dem T-Neu-Onkogen zu verstehen sein könnte [142]. Durch diese Genveränderung wird die Aktivierung der Tyrosin-Kinase maßgeblich modifiziert, wodurch die onkogenen Eigenschaften der Zelllinie erklärbar sind. Gegen diese These spricht jedoch, dass in Neuralleistenzellen des PNS Cx29 bereits an Tag E16+1 nachweisbar war, Cx32 jedoch erst ab Tag P4+1 [73].

Wie für Cx29, belegten Söhl *et al.* auch die mRNA-Expression für Cx47 und Cx32 zeitlich mittels *Northern Blot* in Mäusehirnen. Auch hier war die Ausprägung ab dem siebten postnatalen Tag ersichtlich. Am 14. postnatalen Tag war sie am größten und nahm mit zunehmendem Alter ebenfalls wieder ab [140]. Im Gegensatz dazu beschrieben Söhl *et al.* im *Northern Blot* keinen Nachweis von Cx47 in Oli-neu Zellen, sondern lediglich einen geringfügigen Nachweis von Cx32 [142]. Dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch beide Connexine im gleichen Rahmen nachweisbar waren, könnte durch die angewandte Methodik erklärt werden, denn eine qPCR-Untersuchung wird generell als sensitiver beschrieben als ein *Northern Blot* [32]. Parenti *et al.* mutmaßten, dass Cx32 und Cx47 eine funktionelle Kompensation eingehen könnten [117]. Dies passt zu Untersuchungen an Cx32/Cx47-Doppel-*Knockout*-Mäusen, die Myelinverlust und oligodendrozytäre Apoptose aufwiesen. Die daraus resultierenden ZNS-Abnormalitäten endeten im Verlauf letal [99]. Bei Mäusen, denen jeweils nur eines dieser Connexine fehlte, entwickelten sich diese Pathologien nicht [99,113]. Somit könnte der quantitativ vergleichbare Nachweis für Cx32 und Cx47 als unterstützender Hinweis für die kompensierende Funktion dieser beiden Connexine gewertet werden.

Wie bereits erwähnt, zeigten die oligodendrozytären Connexine Cx29, Cx47 und Cx32 in Mäusehirnen im *Northern Blot* eine zeitlich vergleichbare mRNA-Expression. Durch Söhl *et al.*

wurde diese Tatsache als möglicher Hinweis auf einen gemeinsamen, jedoch unbekannten, Regulationsmechanismus gewertet [140]. Diese These ist durch die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht zu stützen, denn hier zeigte Cx29 eine signifikant höhere mRNA-Expression im Vergleich zu den übrigen Connexinen. Ähnliche Ergebnisse zu denen der vorliegenden Arbeit, wurden bereits durch Li *et al.* präsentiert. Diese stellten dar, dass Cx29 in Neuralleistenzellen exprimiert ist [73], während Cx32-Expression erst mit dem Beginn der Myelinisierung nachweisbar ist. Da es sich in der beschriebenen Arbeit um eine Darstellung mittels Immunfluoreszenzfärbung und somit um einen Proteinnachweis handelt, ist der Vergleich dieser Versuche mit den vorliegenden Ergebnissen nur als unterstützender Hinweis zu werten. Zum genaueren Vergleich bedarf es einer zeitlichen Aufschlüsselung der mRNA-Expression der Connexine der Neuralleistenzellen.

Ein weiteres Connexin ist das Cx45. Dieses konnte bisher nicht in reifen Oligodendrozyten nachgewiesen werden, sondern ausschließlich in neuronalen Zellen [94]. Allerdings war der Nachweis dieses Connexins in NG2-positiven O2A-Vorläuferzellen möglich, dem gemeinsamen Vorläuferzellstadium von Oligodendrozyten und Neuronen [94,148]. In den vorliegenden Untersuchungen war Cx45 in Oli-neu Zellen mittels qPCR nachweisbar. Dies erscheint stimmig zu den genannten Ergebnissen von Maxeiner *et al.* [94], da es sich bei Oli-neu Zellen um Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im undifferenzierten Stadium handelt. Verglichen mit den anderen nachgewiesenen Connexinen zeigt Cx45 eine signifikant geringere mRNA-Expression als Cx29. Im Vergleich zu Cx32 und Cx47 zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Aus der zeitlichen Aufstellung der mRNA-Expression dieser Connexine im Mäusehirn durch Söhl *et al.* wird deutlich, dass Cx45 v.a. zwischen dem 14. und 18. Tag *post coitum* besonders stark exprimiert ist. Zu diesem Zeitpunkt sind hingegen Cx29, Cx47 und Cx32 mittels *Northern Blot* nicht nachweisbar. Ab dem 14. postnatalen Tag kehrten sich die Expressionen um: Während Cx45 dann kaum mehr nachweisbar war, ließ sich für die übrigen genannten Connexine ein Expressionspeak verzeichnen. Der Expressionsverlauf war synchron für die C29, Cx32 und Cx47 [140]. Da die Primärkultur der Oli-neu Zellen aus 15 Tage alten NMRI-Mäusen generiert wird [61], scheint der signifikante Unterschied der mRNA-Expression von Cx29 und Cx45 passend zu den Ergebnissen von Söhl *et al.* In Anlehnung an die Ergebnisse von Maxeiner *et al.* [94] könnte somit davon ausgegangen werden, dass die Expression von Cx45 im Reifungsstadium der Oli-neu Zellen bereits rückläufig ist. Um dies zu verifizieren, wäre eine Untersuchung dieses Connexins in differenzierten Oli-neu Zellen interessant.

Die Proteinexpression der Connexine wurde bereits *in vivo* untersucht. So beschrieben Parenti *et al.*, dass der Proteinnachweis für Cx47 früher und stärker möglich war als für Cx29 und Cx32 [117]. Durch Nagy *et al.* erfolgte ebenfalls der Nachweis für Cx32 und Cx47 mittels

Immunfluoreszenz [111]. Auffällig war, dass das Fluoreszenzsignal für Cx32 und Cx47 im adulten Mäusehirn wesentlich prägnanter ausfiel als das für Cx29.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigt sich jedoch für die RNA-Analyse aus Oli-neu Zellen, dass die mRNA-Expression für Cx29 signifikant größer war als der Nachweis für die anderen beiden Connexine. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde bei der vorliegenden Untersuchung im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung der Fokus auf dieses Connexin gelegt. Passend zum signifikanten Nachweis im Rahmen der mRNA-Expression, war ein Fluoreszenzsignal für Cx29 in undifferenzierten Oli-neu Zellen auffällig. Dieses war besonders in Nähe des Zellkernes und entlang der Zellmembran ersichtlich. Auch Nagy *et al.* zeigten mittels Immunfluoreszenzfärbung *in vivo* bereits den Nachweis von Cx29 in Oligodendrozyten. Diese beschrieben, dass das Fluoreszenzsignal in jungen Mäusen zwischen dem 14. und 20. Lebensstag stark, in erwachsenen Mäusen jedoch geringer war [111]. Wird nun einbezogen, dass Oli-neu Zellen initial aus 15 Tagen alten NMRI-Mäusen generiert wurden, scheint der vorliegende Proteinnachweis für Cx29 stimmig zu den beschriebenen Ergebnissen von Nagy *et al.* [111].

Hinsichtlich des Cx29 ist zu erwähnen, dass die genaue Funktion des Connexins noch nicht abschließend geklärt werden konnte. So zeigen Cx29-defiziente Mäuse beispielsweise keine Abnormalitäten des Myelins und keine Auffälligkeiten der Nervenfunktion [39]. Altevogt *et al.* vermuteten, dass Cx29 *in vivo* möglicherweise die Eigenschaften anderer Connexine oder Kanäle moduliert [3]. Dies könnte auch erklären, wieso dieses Connexin bereits in einem solch frühen Reifungsstadium, wie es bei undifferenzierten Oli-neu Zellen der Fall ist, besonders stark exprimiert wird. Alternativ wird ein möglicher Kopplungspartner außerhalb der Connexin-Familie diskutiert. Hier kommen möglicherweise Kaliumkanäle in Betracht [127].

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der RNA- und Proteinanalyse von Parenti *et al.* [117] und Nagy *et al.* [111] erscheint eine weitere Proteinanalyse für Cx47 und Cx32 in Oli-neu Zellen von großem Interesse.

5.2 Connexin29 in undifferenzierten Oli-neu Zellen und Schwann-Zellen im FRIL

Wie bereits beschreiben, konnte durch die Immunfluoreszenzfärbung die Proteinexpression für Cx29 in undifferenzierten Oli-neu Zellen dargestellt werden. Besonders herauszustellen ist, dass das Fluoreszenzsignal vor allem in Nähe des Zellkernes und entlang der Zellmembran darstellbar war. Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob dieses Connexin auch ultrastrukturell mittels der FRIL-Technik in der Zellmembran der Oli-neu Zellen darstellbar ist. Der Fokus auf Cx29 begründete sich mit der besonders hohen mRNA-Expressionen verglichen mit den anderen Connexinen in Oli-neu Zellen.

Im Rahmen der FRIL-Untersuchungen war die Cx29-Markierung auf partikelreichen Membranarealen nachweisbar. Die ermittelte SNR im Bereich zwischen 100:1 und 500:1 weist auf eine hohe Spezifität der Immunmarkierungen hin [124]. Dabei zeigte sich die Morphologie der immunmarkierten Membranproteine ausschließlich als Partikel; *pits* mit Markierungen für Cx29 waren nicht ersichtlich. Bekanntermaßen wurden immunogoldmarkierte *pits* nur in Membranen mit gekoppelten Strukturen, wie z. B. Gap Junctions, beobachtet [124]. Für Cx29 wurden bisher keine Hinweise für die Ausbildung homotypischen Gap Junctions [3] oder heterotypischer Gap Junctions mit anderen Connexinen gefunden [75,127]. Lediglich die Kopplung mit axonalen Kaliumkanälen wird diskutiert [127]. Da dementsprechend in den vorliegenden Versuchen keine Möglichkeit zur Kopplung von Cx29 besteht, erscheint der fehlende Nachweis immunogoldmarkierter *pits* schlüssig.

Bei Betrachtung der Membranareale war auffällig, dass sich einige Partikel an immunogoldmarkierten Membranarealen in hexameren Formationen, den sogenannten Rosetten, zusammenlagerten. Ein solches Phänomen wurde bereits im Myelin peripherer Nerven für Cx29 nachgewiesen [74,127]. Erste Hinweise auf diese rosettenförmigen Partikelformationen in Schwann-Zellen lagen bereits in den 1970er Jahren vor, allerdings ohne die Immunmarkierung, d. h. ohne die Identifikation von Cx29 [105]. Es wurde davon ausgegangen, dass die Positionen der Partikel durch andere Bestandteile der Zellmembran bestimmt werden. Außerdem beschrieb die Arbeitsgruppe um Miller *et al.* andere, kleinere Formationen zusammengesetzter Partikel. Es erschien ihnen, als würden einzelne Partikel einer Rosette fehlen [105]. Solche Formationen waren auch in den vorliegenden Untersuchungen ersichtlich. Unter der Vorstellung, dass diese Komplexe in weiteren Differenzierungsstadien zu Rosetten werden könnten, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit als präformierende Komplexe bezeichnet. Neben der optischen Ähnlichkeit zwischen Rosetten und präformierenden Komplexen zeigte sich in den Untersuchungen auch unter Hinzunahme des objektiveren Kriteriums der NND, dem Maß für die Distanz zwischen den einzelnen Partikeln, kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Formationen, was die genannte These unterstreichen könnte. Die untersuchten Membranareale zeigten auch hinsichtlich der Verteilung von Rosetten und sogenannten präformierenden Komplexen keinen signifikanten Unterschied. Besonders herauszustellen ist jedoch, dass in den vorliegenden Untersuchungen in der Zellkultur keine neuronalen Einflüsse auf die Oligodendrozyten einwirken, wie es beispielsweise in den adaxonalen Myelinlamellen der Schwann-Zellen der Fall ist. Somit ist davon auszugehen, dass die Formierung der Rosetten zumindest in Oligodendrozyten keinen neuronalen Einflüssen unterliegt.

Allerdings bleibt zu erwähnen, dass auf den markierten partikelreichen Arealen der Oligodendrozytenmembranen auch Partikel ersichtlich waren, welche weder einer Rosette noch einem präformierenden Komplex zuzuordnen waren. Auch Nagy *et al.* beschrieben

bereits, dass Partikel mit Immunogoldmarkierung für Cx29 in Oligodendrozyten des Hippocampus aus normalen und Cx32-*Knockout*-Mäusen häufig in lockeren Ansammlungen auftraten, welche sie als diffus und mäandrierend beschrieben [111]. An dieser Stelle bedarf es weiterer Untersuchungen, um zu eruieren, ob diese Partikel sich in differenzierten Oligodendrozyten ebenfalls zu Rosetten zusammenlagern oder ob weiterhin partikelreiche Membranareale bestehen bleiben, welche keine spezifische Ordnung der Partikel aufweisen. Darüber hinaus wäre es ebenfalls interessant zu untersuchen, welche Funktion diese Rosetten übernehmen. Für Oligodendrozyten wird ein Einfluss im Rahmen der räumlichen Kalium-Pufferung im ZNS vermutet. Hierbei wird davon ausgegangen, dass Kalium, welches bei neuronaler Aktivität frei wird, vom glialen Synzytium aufgenommen und umverteilt wird [100,122]. Im klassischen Modell sind hierfür ausschließlich Astrozyten verantwortlich, da sie eine hohe Permeabilität für Kalium besitzen [100]. Aber auch die Myelinisierung scheint in die Kalium-Pufferung einbezogen zu sein. Ein möglicher Kaliumaustausch wäre dabei über reflexive Gap Junctions innerhalb der einzelnen Myelinlagen, aber auch über A/O Gap Junctions zwischen Myelin und Astrozytenfortsätzen oder zwischen Oligodendrozytenzellkörpern und Astrozytenfortsätzen möglich [100]. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten zur Ausbildung heterotypischer Gap Junctions. Allerdings koppeln nicht alle astrozytären Connexine mit jedem oligodendrozytären Connexin. So ist beispielsweise eine Kopplung von Cx43 und Cx32 nicht möglich, eine Kopplung von Cx30 und Cx32 zeigt sich hingegen häufig [109]. Dementsprechend bleiben weitere Untersuchungen hinsichtlich der Fusionspartner der Rosetten in Oli-neu Zellen von großem Interesse. Außerdem bleibt es zu ergründen, ob sich die möglichen Fusionspartner von Rosetten, präformierenden Komplexen und den diffusen Partikelarealen unterscheiden und somit Rückschlüsse auf unterschiedliche Funktionen einzelner Partikel ermöglichen.

5.2.1 Rosetten und Präformierende Komplexe in undifferenzierten Oli-neu Zellen und Schwann-Zellen im FRIL

Da sich die Rosetten und präformierenden Komplexen in den Oli-neu Zellmembranen als sehr prägnant erwiesen hatten, war es von großem Interesse, einen Vergleich dieser Formationen in kultivierten Zellen mit denen im Myelin des ZNS (Oligodendrozyten) oder PNS (Schwann-Zellen eines Ischiasnerven) herauszuarbeiten. Als Vergleich diente hier die Arbeit von Rash *et al.* [127], da in dieser bereits Rosetten im Ischiasnerven (PNS) beschrieben worden waren. Generell lässt sich konstatieren, dass sich die Zellmembranen der Oli-neu Zellen und die des Myelins des Ischiasnerven der Maus im FRIL stark ähneln. Beide weisen partikelreiche Areale und Immunogoldmarkierungen für Cx29 auf. Darüber hinaus sind auf beiden Membranen Rosetten und präformierende Komplexe ersichtlich. Die NND der Connexone einer Rosette der Oli-neu Zellen ist jedoch signifikant kleiner als die der Connexone der Myelinscheiden. Wie

bereits erwähnt, wurde durch Miller *et al.* vermutet, dass die Formation der Connexone durch andere Membranbestandteile und Verbindungspartner beeinflusst wird [105]. Somit könnte eine Erklärung dafür, dass die NND der Connexone einer Rosette der Oli-neu Zellen kleiner ist, darin liegen, dass sich im Versuchsansatz dieser Arbeit die Oli-neu Zellen in Monokultur befanden. Falls sich die Connexone der Zellen untereinander koppeln, wäre dies nur zwischen Oli-neu Zellen möglich. Zum einen könnte die kleinere NND dadurch begünstigt werden, dass so nur autologe Gap Junctions gebildet werden können. Zum anderen könnte dies dadurch gefördert werden, dass die Zellmembranen dieselben Bestandteile aufweisen und sich die Gap Junctions in der Membran somit enger zusammen formieren könnten. Eine Kopplung zwischen unterschiedlichen Zelltypen könnte aufgrund der unterschiedlichen Kopplungspartner und der unterschiedlichen Membranbeschaffenheit im Umkehrschluss eine größere NND der Connexone hervorrufen, was somit die Ergebnisse der NND der Connexone in Schwann-Zellen erklären könnte.

Während für Cx32 intrazelluläre Gap Junction-Plaques zwischen den Myelinlamellen gezeigt werden konnten [97], wurden diese für Cx29 bislang nicht festgestellt. Stattdessen fanden sich die Cx29-immunmarkierten Rosetten auf der adaxonalen Myelinmembran [127]. Daher können diese Connexone ausschließlich in der gegenüberliegenden Membran des Axons Kopplungspartner finden. Auf dem Axon konnte Cx29 jedoch nicht detektiert werden [74]. Als mögliche Kopplungspartner zeigten Rash *et al.* auf dem Axon des Ischiassnerven eine rosettenförmige Anordnung von Kv1-Kanälen mit einer passenden rosettenförmigen Anordnung von Cx29 auf dem inneren Myelin. Sollten diese Kaliumkanäle Cx29 binden, wäre ein Kaliumaustausch zwischen Axoplasm und Myeloplasma möglich [127]. Dies passt zu der beschriebenen Rolle der Oligodendrozyten im Rahmen der räumlichen Kaliumpufferung im ZNS, wo eine Kaliumumverteilung im glialen Synzytium vermutet wird [100]. Darüber hinaus schlussfolgerten Rash *et al.* [127], dass durch den Kaliumaustausch zwischen Axon und Myelin möglicherweise eine frühere und gleichzeitige Depolarisierung an den Internodien potenziert und dadurch die Schnelligkeit sowie die Frequenz der saltatorischen Weiterleitung erhöht werden könnte. Ob sich dies auch auf das ZNS übertragen lässt, gilt es in weiteren Versuchen zu eruieren. Hier wäre beispielsweise einer Co-Kultivierung mit anderen Zelltypen, etwa Astrozyten oder Neuronen, und eine Betrachtung im Mausmodell von großem Interesse. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit verglichenen Membranareale aus Oli-neu Zellen bzw. Schwann-Zellen unterschiedlicher Reifungsstadien entstammen. Aus diesem Grund wäre ein Vergleich aus myelinbildenden Oligodendrozyten und den Ischiaspräparaten oder auch eine *in vitro*-Betrachtung von Schwann-Zellen im Vergleich zu Oli-neu Zellen aufschlussreich. Hinsichtlich der Myelinbildung in Oligodendrozyten wäre im Weiteren auch interessant, in welchen Myelinlagen Rosetten und ihre jeweiligen Bindungspartner ansässig sind, denn Rash *et al.* [127] bezogen sich in ihrer

Arbeit auf die Rosetten in der innersten Myelinlage und auch Li *et al.* [74] fanden Cx29 bisher weder in der E-Seite des Myelins noch auf dem Axon des Ischiasnerven.

5.3 Cuprizon und Probenecid in undifferenzierten Oli-neu Zellen

Wie bereits erläutert, bildet das CPZ-Modell als toxisch-experimentelles Modell eine passende Grundlage für die Forschung auf dem Themengebiet der MS. Durch CPZ werden phänotypische Auffälligkeiten induziert, die im Rahmen der MS ähnlich auftreten [157]. Auch konnte histopathologisch gezeigt werden, dass sowohl die weiße als auch die graue Substanz durch CPZ beeinträchtigt wird, so wie es auch im Rahmen der MS auffällt [47,152]. Hinsichtlich des Pathomechanismus bildet das CPZ-Modell die „*inside-out*“ Hypothese der MS ab, wobei davon ausgegangen wird, dass auf eine primäre Oligodendrozytendysfunktion eine sekundäre Inflammation folgt [147]. Im Rahmen dessen kommt es zum oligodendrozytären Zelluntergang und zur Demyelinisierung im ZNS.

Die interzelluläre Kommunikation im panglialen Synzytium erfolgt maßgeblich via Gap Junctions, die aus einzelnen Connexinen bestehen. Ausgehend von der Vorstellung, dass die Oligodendrozytenproblematik im CPZ-Modell durch eine Störung der Gap Junction-vermittelten interzellulären Kommunikation (*gap junction intercellular communication*; gjic) ausgelöst werden kann, erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung ausgewählter Connexine in undifferenzierten Oli-neu Zellen unter CPZ-Applikation auf RNA- und Proteinebene. Neben den Connexinen sind allerdings auch oligodendrozytenspezifisch exprimierte Proteine, insbesondere Myelinproteine, von besonderer Bedeutung für die Homöostase der Oligodendrozyten. Aus diesem Grund sollte auch die Auswirkung der CPZ-Applikation in undifferenzierten Oli-neu Zellen auf die Proteine MBP und PLP1 untersucht werden.

In den vorliegenden Untersuchungen ließen sich durch die Applikation des CPZ negative Effekte auf die Proteinexpression der untersuchten Connexine und Myelinproteine abbilden. Durch diese Erkenntnis über die CPZ-bedingten Einflüsse stellte sich die Frage, ob diese Effekte reversibel sind und ihnen somit entgegengewirkt werden kann. Ein mögliches Agens bildet an dieser Stelle das PBN. Als Medikament wird PBN vor allem aufgrund seiner urikosurischen aber auch seiner antiinflammatorischen Wirkungen derzeit bereits in der Behandlung der Gicht eingesetzt [145]. In jüngerer Zeit wurde die pharmakologische Inhibition der Pannexin-Kanäle durch PBN entdeckt [136], ebenso wie die der P2X7-Rezeptoren [15]. Hainz *et al.* [51] konnten bereits im Mausmodell zeigen, dass PBN den Einflüssen von CPZ entgegenwirken kann, denn eine durch CPZ induzierte Demyelinisierung konnte durch die Applikation von PBN signifikant reduziert werden. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass unter anderem eine Pannexin-bedingte Inflamationsreaktion durch CPZ ausgelöst wird, welche

wiederum durch PBN aufgehalten werden kann. Sowohl solche Pannexine, als auch die aktivierenden P2X7-Rezeptoren konnten bereits in Oligodendrozytenkulturen aus 12 Tage alten Ratten nachgewiesen werden [37].

In den vorliegenden Untersuchungen konnten einige oligodendrozytenspezifische Connexine und Proteine in undifferenzierten Oli-neu Zellen nachgewiesen werden. Insbesondere erfolgte erstmals der Nachweis von Panx1 in diesen Zellen. In weiterführenden Untersuchungen sollte dargestellt werden, ob durch die Applikation von CPZ Effekte auf diese Proteine in undifferenzierten Oli-neu Zellen induziert werden können. Außerdem sollte untersucht werden, ob diese Effekte durch PBN umkehrbar sind.

5.3.1 Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN induziert keinen signifikanten Effekt auf Ebene der RNA-Analyse

Sowohl die Applikation von CPZ als auch von CPZ+PBN hat keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression der untersuchten oligodendrozytären Connexine. Auch hinsichtlich der oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine zeigt sich durch die Applikation von CPZ und CPZ+PBN keine signifikante Beeinflussung.

Diese Ergebnisse scheinen zunächst erstaunlich, denn es war eine Reduktion der mRNA-Expression als Ausdruck eines CPZ-induzierten Oligodendrozytenfunktionsstörung vermutet worden. Andererseits zeigten Mason *et al.* [90] bereits *in vivo*, dass durch CPZ zwar ein Untergang von reifen (*maturen*) Oligodendrozyten zu verzeichnen ist, die Zahl ihrer Vorläuferzellen jedoch zu Beginn der Demyelinisierungsphase kompensatorisch ansteigt. Da es sich bei Oli-neu Zellen um Vorläuferzellen handelt, hätte in Anbetracht dieser Erkenntnisse somit die Annahme getroffen werden können, dass durch die CPZ-Applikation eine Proliferation der Oli-neu Zellen möglich wäre. Entsprechend hätte mit einem Anstieg der mRNA-Expression gerechnet werden können, jedoch gibt es hierfür in den vorliegenden Untersuchungen bei fehlender signifikanter Änderung der mRNA-Expression keinerlei Anhaltspunkte. In den vorliegenden Begebenheiten waren zwar unterstützende Faktoren für eine Zellproliferation potentiell gegeben, z. B. durch ausreichend Wachstumsmedium mit Insulin zur Stimulation des *Insulin-like-growth factor* [95], Mason *et al.* [90] vermuteten jedoch, dass ein Großteil der proliferierenden OPC aus anderen Hirnarealen immigrierten. Die Möglichkeiten hierzu waren in den vorliegenden Untersuchungen nicht herstellbar, da die Oli-neu Zellen in Monokultur inkubiert wurden. An dieser Stelle wären beispielsweise weiter Folgeversuche in einer Co-Kultivierung von Oli-neu Zellen nach CPZ-Applikation und ohne CPZ-Applikation notwendig. Möglicherweise könnten dann eine Proliferation durch die Oli-neu Zellen induziert werden, welche nicht von CPZ beeinträchtigt wurden.

Morell *et al.* zeigten *in vivo* bereits die erstaunlichen Auswirkungen auf die mRNA-Expression für *Mbp* im CPZ-Modell. Hierbei kam es zunächst zu einer Reduktion der mRNA-Expression,

gefolgt von einem Anstieg der Expression noch während der CPZ-Behandlung. Diese Beobachtung wurde in Relation zur Myelininformation gesetzt, denn nach einer initialen Demyelinisierung folgte noch im Laufe der CPZ-Behandlung die Remyelinisierung [106]. Diese Ergebnisse konnten durch Jurevics *et al.* und Hesse *et al.* untermauert werden. Zudem wurde Ähnliches auch für PLP1 nachgewiesen [56,62]. Ob die Effekte des Expressionsanstiegs und der Remyelinisierung nun allerdings auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen oder auf ausgereifte Oligodendrozyten zurückzuführen sind, ist aus dem Tiermodell nicht zu schließen. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden die beschriebenen Effekte allerdings nicht widerspiegelt. Somit wird die hohe Relevanz weiterer Untersuchungen im Zellmodell mit differenzierten Oli-neu Zellen unterstrichen.

Auch bleibt zu berücksichtigen, dass sich die Versuche *in vivo* auf einen zeitlichen Rahmen von mehreren Wochen bezogen. In den Versuchsansätzen dieser Arbeit waren die Zellen *in vitro* lediglich 24h dem CPZ bzw. CPZ+PBN ausgesetzt. In Anlehnung an Versuche von Martinez-Pinilla *et al.* [87] wären an dieser Stelle Versuche in anderen Zeitintervallen (z. B. 48h und 72h) von großem Interesse.

Die genannten Effekte aus anderen Arbeitsgruppen ließen sich im Rahmen dieser Arbeit auf Ebene der RNA-Analyse nicht reproduzieren. Aus diesem Grund stellt sich neben den oben genannten methodischen Überlegungen die Frage, ob das Ausbleiben von Effekten auf die Transkription durch die Inkubation mit CPZ auf den Zelltyp oder das Vorläuferstadium zurückzuführen sind. Eine mögliche Überlegung wäre zudem, ob Oligodendrozyten-Vorläuferzellen *per se* nicht durch CPZ beeinträchtigt werden. Somit war es von großer Bedeutung, die Connexine und oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine in Oli-neu Zellen unter CPZ-Applikation auf Proteinebene zu untersuchen.

5.3.2 Applikation von CPZ bzw. CPZ und PBN induziert einen signifikanten Effekt auf Ebene der Proteinanalyse

Nach den weniger aussagekräftigen Ergebnissen der RNA-Analyse der CPZ-Applikation, galt es, auf Proteinebene zu untersuchen, ob sich signifikante Einflüsse durch CPZ und CPZ+PBN nachweisen lassen.

Bereits durch die mikroskopische Betrachtung der Zellen wurde ein signifikanter Abfall der Zellgröße durch die CPZ-Applikation deutlich. Dies ließ sich statistisch objektivieren. Auch durch die CPZ+PBN-Applikation war ein Abfall der Zellgröße ersichtlich, dieser war jedoch von weniger großer Signifikanz als durch die reine CPZ-Applikation. Somit wurde die Annahme getroffen, dass durch CPZ doch eine Auswirkung auf undifferenzierte Oli-neu Zellen und somit auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ausgeübt wird. Darüber hinaus wurde angenommen, dass durch PBN diesem Effekt entgegengewirkt werden kann. Aus diesem Grund erfolgte die genauere Untersuchung dieser Effekte hinsichtlich Cx29, MBP und PLP1.

Sowohl durch die Betrachtung der Immunfluoreszenzfärbungen für Cx29 als auch mittels der statistischen Auswertung wird deutlich, dass durch die Applikation von CPZ die immunpositive Fläche signifikant ($p \leq 0,01$) reduziert wird. Dies spiegelt die RNA-Analyse aus dieser Versuchsgruppe jedoch nicht wider. Da im Rahmen des beschriebenen Versuchs die immunpositive Fläche im zweidimensionalen Bild ermittelt wurde, konnte eine etwaige Proteinumverteilung in der dreidimensionalen Zelle, woraus sich im zweidimensionalen Bild ebenfalls eine Reduktion der immunpositiven Fläche ergeben könnte, nicht in die Beurteilung einbezogen werden. Dies gilt es in weiteren Versuchen zu beleuchten. Allerdings kommen diese signifikanten Veränderungen in der Immunfluoreszenzfärbung im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Vorstellung nahe, dass durch CPZ ein negativer Einfluss auf Connexine ausgeübt wird. Dies könnte somit ein Anzeichen dafür sein, dass eine CPZ-bedingte Misskommunikation via Cx29 sowie eine Cx29-Reduktion am oligodendrozytären Zelluntergang beteiligt sein könnten, die mRNA-Expression dabei jedoch noch nicht beeinflusst wird. Fraglich bleibt, ob sich diese These auf alle Connexine übertragen lässt.

Erstaunlicherweise wurden bisher noch nicht viele Connexine im CPZ-Modell untersucht. Parenti *et al.* erarbeiteten einen Vergleich von Cx47 mit MBP und CNPase im *Western Blot* im CPZ-Modell. Für Cx47 war hierbei ersichtlich, dass es nach CPZ-Applikation zu einem Anstieg des Connexins kam [117]. Dies erscheint paradox, da bisher von einem negativen Einfluss durch CPZ auf Connexine ausgegangen wurde, so wie es auch die Immunfluoreszenzauswertung für Cx29 zeigt. Unter Betrachtung der Tatsache, dass Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Rahmen der Demyelinisierung durch CPZ *in vivo* einen kompensatorischen Anstieg der Zellzahl zeigen [90], könnte dies so auch für den Anstieg des Cx47 gelten, da auch diese Untersuchungen *in vivo* durchgeführt wurden. Somit bleibt an dieser Stelle offen, ob durch CPZ in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen generell ein negativer Einfluss auf die Connexin-Expression entsteht, worauf die vorliegenden Ergebnisse hinweisen könnten. Diese Einflüsse könnten *in vivo* durch einen Anstieg an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen kompensiert werden, was wiederum zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Parenti *et al.* [117] und Mason *et al.* [90] passen würde. Andererseits erfüllen unterschiedliche Connexine auch unterschiedliche Aufgaben in Oligodendrozyten. So wird z. B. Cx47 eine Schlüsselrolle im Rahmen der Differenzierung von Oligodendrozyten und der Myelinogenese zugeteilt [117]. Die genaue Funktion des Cx29 scheint jedoch weiterhin unklar. Somit wäre denkbar, dass sich der Einfluss durch CPZ auch unter den einzelnen Connexine unterscheidet. Aus diesem Grund wäre ein Vergleich der einzelnen Connexine unter CPZ-Applikation jeweils sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von großer Bedeutung. Ein gleichwertiger Vergleich unterschiedlicher Connexine in verschiedenen Versuchsansätzen erscheint an dieser Stelle nur wenig zielführend und sollte kritisch hinterfragt werden.

Der Anteil der immunpositiven Fläche für Cx29 stellt sich in der Inkubationsgruppe mit CPZ+PBN vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe dar. Auch statistisch zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zur CPZ-Applikation ist die immunpositive Fläche der CPZ+PBN-Gruppe signifikant größer ($p \leq 0,01$). Dies gibt Anlass zu der Annahme, dass PBN in Oli-neu Zellen und somit möglicherweise auch in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen generell der CPZ-induzierten Reduktion des Cx29 entgegenwirken kann. Dies deckt sich mit den Annahmen von Hainz *et al.*, die ebenfalls gegensteuernde Eigenschaften des PBN im Rahmen einer CPZ-Applikation nachweisen konnten. Dort zeigte sich ein größerer Axondurchmesser in optischen Nerven nach CPZ+PBN-Applikation als nach CPZ-Applikation [51].

Ebenso wie für Cx29 konnte auch für PLP1 ($p \leq 0,0001$) und für MBP ($p \leq 0,01$) durch die Applikation von CPZ eine signifikante Reduktion der immunpositiven Fläche induziert werden. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass in der RNA-Analyse durch CPZ keine signifikanten Effekte abgebildet werden konnten.

Die eindrücklichen Ergebnisse im Rahmen der Proteinanalyse dieser Arbeit passen zu den Ergebnissen der Proteinanalysen von Parenti *et al.* [117] und Jurevics *et al.* [62]. Dort konnte im Mausmodell durch eine CPZ-Diät ein Abfall des MBP-Proteins im *Western Blot* nachgewiesen werden, welcher gravierender wurde, je länger die CPZ-Diät andauerte. Nach Umstellung der Ernährung stagnierte das MBP-Proteinlevel im betrachteten Zeitraum von sechs Wochen jedoch. Anders verhielt es sich mit der *Mbp*-mRNA, welche nach Umstellung auf normales Futter bereits zeitnah einen kompensatorischen, überschießenden Anstieg zeigte [62]. Hier könnte davon ausgegangen werden, dass zwar die mRNA bereits vorliegt, jedoch noch nicht genügend Translation stattgefunden hatte, sodass nach sechs Wochen Regeneration lediglich wenig Anstieg des MBP-Proteins zu verzeichnen war.

Für PLP1 liegen derzeit lediglich RNA-Untersuchungen vor, welche sich deckungsgleich zu dem für *Mbp* beschriebenen mRNA-Expressionsverlauf verhielten. Durch die Applikation von CPZ kam es zu einem kurzfristigen Abfall der *Plp1* mRNA. Noch während der fortgeführten CPZ-Diät stieg die Expression nachfolgend an. Das mRNA-Level normalisierte sich nach sechswöchiger Gabe von Standardfutter sogar [62]. Wie anhand des MBP ersichtlich, lässt sich das Verhalten der mRNA nicht vollumfänglich auf die Proteinsynthese übertragen. Die Auswirkung der CPZ-Diät auf das PLP1-Proteinlevel kann somit aus der RNA-Analyse nicht übertragen werden, weshalb sie genauer untersucht werden müssten.

Zu den Hauptaufgaben des MBP und PLP1 gehören die Kompaktierung des Myelins (MBP) [17] und die strukturelle Organisation des Myelins (PLP1) [19]. Unter Betrachtung der Tatsache, dass durch CPZ ein negativer Effekt auf die Proteinsynthese von MBP und PLP1 in Oli-neu Zellen ausgewirkt wird, ist es nur denkbar, dass beim Fehlen der Funktion eben dieser Proteine ein Myelinschaden potenziert werden könnte.

In den beschriebenen Untersuchungen im Mausmodell erfolgte eine CPZ-Diät über mehrere Wochen hinweg. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Zellmodell lediglich eine CPZ-Applikation mit einer Dauer von 24 h betrachtet. Somit ist es umso eindrücklicher, dass im Rahmen dieser kurzen Applikationsdauer bereits Einflüsse auf die Proteinsynthese abgebildet werden konnten. Die Tatsache, dass in anderen Versuchen für MBP und PLP1 *in vivo* ein negativer Effekt durch CPZ sowohl auf die mRNA-Expression als auch auf die Proteinsynthese nachgewiesen wurde und sich dies so nicht in der vorliegenden RNA-Analyse in Oli-neu Zellen widerspiegelt, erscheint verwunderlich. Analog zu den Überlegungen im Rahmen der RNA-Analyse, könnte dies auf die Inkubationszeit mit den jeweiligen Wirkstoffen zurückzuführen sein. Zur Verifizierung dieser Überlegung wären auch für die Proteinanalyse weitere Versuche in anderen Zeitintervallen (Inkubation für 48h oder 72h) von großem Interesse. Eine andere Überlegung wäre, ob Oligodendrozyten-Vorläuferzellen einen natürlichen Schutz gegen CPZ aufweisen, was möglicherweise auf eine gewisse internale Resistenz oder auch auf eine besonders schnelle Regeneration zurückzuführen sein könnte. Passend zu den Versuchen der Remyelinisierung *in vivo* wäre somit auch die Betrachtung einer Erholungsphase nach CPZ-Applikation *in vitro* mit Inkubation im Kulturmedium ohne CPZ sehr interessant.

Bei Betrachtung der Auswirkungen durch die Applikation von CPZ+PBN zeigt sich für PLP1, passend zur Auswertung des Cx29, die immunpositive Fläche der Zellen im Vergleich mit dem der Kontrollgruppe gleich ausgeprägt. Auch statistisch zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zur CPZ-Gruppe ist die immunpositive Fläche der CPZ+PBN-Gruppe größer. Die statistische Auswertung zeigt hier einen signifikanten ($p \leq 0,001$) Anstieg der immunpositiven Zellfläche. Somit besteht der Anschein, dass die Applikation von PBN den Auswirkungen einer CPZ-Applikation für PLP1 entgegenwirken kann.

Anders verhält es sich für das MBP-Protein. Hier zeigt sich durch die Applikation von CPZ+PBN eine signifikant ($p \leq 0,01$) geringere immunpositive Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen der Applikation von CPZ bzw. CPZ+PBN besteht kein signifikanter Unterschied. Es stellt sich die Frage, warum das MBP das einzige Protein in diesen Untersuchungen darstellt, bei welchem durch PBN kein Gegeneffekt zum CPZ ausgelöst werden kann. Interessanterweise beschäftigten sich bereits Jurevics *et al.* mit der Erholung von MBP und PLP1 nach CPZ-Diät im Mausmodell. Im Rahmen der RNA-Analyse zeigt Mbp eine überschießende Regeneration nach Absetzen der CPZ-Therapie. Das Proteinlevel erholte sich für MBP nach Futterumstellung nicht in gleicher Geschwindigkeit wie die mRNA, sondern stagnierte zunächst. Die RNA-Analyse für *Plp1* zeigte ebenfalls einen Anstieg der Expression, jedoch nicht in solch steilen Maße wie für Mbp. Ob sich das PLP1-Proteinlevel in gleicher Geschwindigkeit regeneriert, ergibt sich aus den Untersuchungen von Jurevics *et al.* nicht [62]. In Anbetracht dessen, dass sich in diesen Untersuchungen die *Mbp*-mRNA ausgeprägter regenerierte als die *Plp1*-mRNA, wäre es naheliegend davon auszugehen, dass

eine solche Regeneration durch PBN unterstützt worden wäre. Umso erstaunlicher also, dass durch PBN kein positiver Effekt auf die MBP-Expression im Rahmen einer CPZ-Applikation möglich war.

Um dieses Ergebnis zu ergründen, wäre es an dieser Stelle interessant, wie sich die mRNA- und Proteinexpression für MBP und PLP1 in weiteren Untersuchungen über einen anderen zeitlichen Rahmen (bspw. 48 oder 72h) sowie nach einer Erholungsphase im Anschluss an die CPZ-Applikation verhält.

5.4 Methodendiskussion

Wie bereits ausführlich diskutiert, wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Vielfalt an unterschiedlichen Untersuchungsmethoden angewendet, um somit neue Erkenntnisse über die Oli-neu Zellen und den Einfluss von CPZ und PBN zu erhalten. Jede Technik wies dabei individuelle Störanfälligkeiten auf.

Im Rahmen der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung wurde eine neue Technik mit dem Programm *ImageJ* etabliert. Hierfür wurde im ersten Schritt händisch die Zellfläche einer bestimmten Anzahl an Oligodendrozyten ermittelt, im zweiten Schritt wurde die dazugehörige immunpositive Fläche der Zellen bestimmt. Hieraus ließ sich der prozentuale Anteil der immunpositiven Fläche an jeder Zelle berechnen. Zur besseren Reproduzierbarkeit wurden die Untersuchungen stets mit derselben Hardware und Software durchgeführt. Im Rahmen der Untersuchung war es von besonderer Relevanz darauf zu achten, jegliche Anteile einer Zelle einzubeziehen. Um dies zu optimieren, wurden zur Untersuchung nur Zellen ausgewählt, welche sich nicht mit anderen überlappten. Ansonsten wäre eine genaue Zuordnung der immunpositiven Fläche zu den einzelnen Zellen nicht eindeutig möglich gewesen.

Auch die FRIL-Technik birgt einige Herausforderungen. Zum einen in der Herstellung der Replika, zum anderen auch aufgrund der langwierigen Auswertung, die eine hohe Expertise erfordert. Bei der Anwendung der FRIL-Technik lag das besondere Augenmerk darauf, möglichst viele Zell-Zell-Kontaktflächen abzubilden. Nur an diesen Flächen werden im FRIL Connexine als interzelluläre Verbindungen, wie beispielsweise Gap Junctions als *pits* oder Partikel sichtbar. Hierzu hatte es sich in mehreren Versuchen als sinnvoll erwiesen, Pellets abgelöster und zentrifugierter Zellen mit möglichst wenig Mediumrückständen zu verwenden. Cx29 hatte bereits in Vorversuchen der RNA-Analyse besonders signifikante Werte gezeigt. Dies spiegelte sich auch in der Immunfluoreszenzauswertung wider. Besonders auffällig erschien in diesem Rahmen, dass das Fluoreszenzsignal nicht nur in der Nähe des Zellkerns, sondern auch in der Zellmembran ansässig war. Somit wurde die Abbildung dieses Connexins im FRIL als sehr wahrscheinlich erachtet. Aus diesen genannten Gründen sowie aufgrund des hohen Versuchsaufwandes und der Tatsache, dass zu Cx29 bereits Vergleichsuntersuchungen vorlagen, wurde sich in der vorliegenden FRIL-Untersuchung

ausschließlich auf die ultrastrukturelle Analyse des Cx29 beschränkt. Auch hier wurden zur besseren Reproduzierbarkeit die Untersuchungen stets mit derselben Hardware und Software durchgeführt. Im Rahmen der Auswertung war es zunächst entscheidend festzulegen, welche Replikaareale welchen Zellbestandteilen entsprechen. Hierbei stellt es sich als erschwerend heraus, dass die Replika im Elektronenmikroskop lediglich zweidimensional abgebildet werden kann. Zur Erzeugung eines dreidimensionalen Bildeindrucks, wurden in der höchsten Vergrößerungsstufe stets Bilder in einem um 8° zueinander versetzten Winkel aufgenommen und mit einem Programm digital übereinandergelegt. Durch eine zuvor erfolgte Auftragung des Platin-Kohle-Films in verschiedenen Bedampfungswinkeln erschienen Vorsprünge und Unebenheiten der Replika bei der Betrachtung dieser so genannten „Stereobilder“ dreidimensional. War nun unter dreidimensionaler Bildbetrachtung ein homogenes Replikaareal mit Partikeln, welche immunogoldmarkiert waren, ersichtlich, konnte dieses Areal als Zellmembran bestätigt werden. Rash *et al.* beschrieben bereits Cx29 im FRIL für periphere Nerven [127]. Die Arbeitsgruppe beschrieb Partikelformationen in Form von hexameren Rosetten, welche aus einzelnen Cx29-Connexonen bestehen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob sich diese Formationen auch auf Zellmembranen von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen als Zellen des zentralen Nervensystems zeigen lassen, was möglich war. Um valide Daten zu erhalten, wurde die *Signal-to-noise-Ratio* und die *Nearest-Neighbor-Distance* bestimmt. Hierfür war es von besonderer Relevanz sicherzustellen, dass in einem untersuchten Areal alle Rosetten sowie im zweiten Schritt auch alle präformierenden Komplexe des Untersuchungsbereiches einbezogen wurden. Durch die Beachtung all dieser Kriterien wurde die größtmögliche Validität der untersuchten Daten sichergestellt.

5.5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Oli-neu Zellen einige oligodendrozytenspezifische exprimierten Proteine und Connexine besitzen. Hierdurch besteht ein großes Potential zu Forschungszwecken, welches sich nicht nur auf das Themengebiet der MS beschränkt.

Generell liegt der besondere Vorteil der Oli-neu Zellen in der einfachen Expansion der Zellen sowie darin, dass sie bis in hohe Passagen stabile Populationen hervorbringen [61]. Die Vorteile von *in vitro* Untersuchungen sind Skalierbarkeit, Konsistenz und ethische Vertretbarkeit [150]. Dies ist in Oli-neu Zellen gegeben. Ein weiterer Vorteil besteht in der Tatsache, dass in Oli-neu Zellen trotz ihrer Immortalisierung eine Differenzierung induziert werden kann [14], was die Untersuchungsmöglichkeiten um eine zeitliche Komponente erweitert. Somit stellen die Oli-neu Zellen ein umfangreiches Zellmodell dar, wodurch *in vitro* eine hohe Qualität sichergestellt und eine valide Aussagekraft gewährleistet werden kann.

Insbesondere besteht in Oli-neu Zellen die Möglichkeit einer Betrachtung der in dieser Arbeit gezeigten oligodendrozytenspezifisch exprimierten Proteine, entkoppelt von ihrer Funktion als Myelinproteine, da undifferenzierte Oli-neu Zellen das Myelin noch nicht formieren können. Ein besonderes Augenmerk sollte darüber hinaus auf die eindrücklichen Ergebnisse der FRIL-Untersuchungen gelegt werden, denn es erfolgte bereits in undifferenzierten Oli-neu Zellen der ultrastrukturelle Nachweis des Cx29. Auch diese Tatsache unterstreicht das enorme Potential dieser Zellreihe, z. B. hinsichtlich weiterer Untersuchungen der Connexin-Funktion und der Connexin-Kopplung in Co-Kultivierung mit anderen Zellen. Außerdem wird deutlich, dass Oli-neu Zellen nicht nur besondere Ähnlichkeiten zu anderen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen aufweisen, sondern auch hinsichtlich des Cx29 mit Schwann-Zellen aus dem peripheren Nervensystem verglichen werden können.

Das beschriebene Potential der Oli-neu Zellen wurde im Weiteren genutzt, indem die Auswirkung von CPZ auf diese Zellen untersucht wurden, um somit mögliche Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der MS ziehen zu können. Es bestanden nur wenig Vergleichsarbeiten über CPZ-Applikationen *in vitro*. Bisher waren überwiegend Myelinproteine nach CPZ-Applikation untersucht worden. Bezüglich der Connexine wurde zuvor lediglich Cx47 untersucht [117]. Entsprechend war es zunächst notwendig, die CPZ-bedingten Auswirkungen auf Oli-neu Zellen im undifferenzierten Stadium aufzuzeigen, um so seine Relevanz in der MS-Forschung statuieren zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließen sich auf RNA-Ebene keine signifikanten Effekte durch CPZ abbilden. Jedoch wurde die Proteinsynthese von Cx29 sowie von MBP und PLP1 durch die Applikation von CPZ reduziert und somit negativ beeinflusst. Aus diesem Grund stellt sich die entscheidende Frage, ob CPZ lediglich auf die Translation, nicht aber auf die Transkription einwirken kann, oder ob diese Beobachtung einen anderen Hintergrund hat. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz

zwischen der RNA- und Proteinanalyse könnte im methodischen Vorgehen der CPZ-Applikation bestehen. In Anlehnung an andere *in vitro*-Studien der CPZ-Behandlung [12,23] wurden in der vorliegenden Arbeit 0,5 mM CPZ in 50% EtOH verwendet und die Oli-neu Zellen für 24h im jeweiligen Medium belassen. An dieser Stelle könnte ein weiteres großes Forschungspotential in der Verwendung anderer Konzentrationen, Applikationszeiten oder Regenerationszeiten liegen. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass sich in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im undifferenzierten Stadium beschäftigt wurde. Somit wären weitere Untersuchungen im differenzierten Zustand der Oli-neu Zellen von großem Interesse.

In vivo zeigten Tiere, denen PBN appliziert wurde, weniger CPZ-induzierte Effekte als unbehandelte Tiere [51]. Insbesondere einer durch CPZ induzierten Demyelinisierung konnte durch die Applikation von PBN entgegengewirkt werden. Da PBN ein Pannexin-1-Inhibitor ist, wurden diese Effekte als Hinweis für eine von Panx1 modulierte Inflamationsreaktion gesehen [51], welcher durch die Inhibition von Panx1 entgegengewirkt werden konnte. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Rahmen der CPZ-Versuche hinsichtlich der Proteinexpression für Cx29 und PLP1 eine protektive Wirkung durch die zusätzliche Applikation von PBN, nicht jedoch für MBP. Durch Silverman *et al.* ist bekannt, dass PBN keinen Effekt auf Connexine hat [136]. Ob nun die vorliegenden Ergebnisse auf einem direkten Einfluss durch PBN auf die Proteinexpression von Cx29 und PLP1 oder auf einen sekundären Mechanismus zurückzuführen sind, bleibt derzeit unklar. Da in Oligodendrozytenkulturen bereits Pannexine gezeigt werden konnten [37] und in den vorliegenden Untersuchungen Panx1 auch in Oli-neu Zellen nachweislich war, ist ein direkter Einfluss von PBN auf Panx1 wahrscheinlich. Dies gilt es in weiteren Versuchen zu verifizieren. Warum MBP nicht durch PBN beeinflusst werden konnte, verbleibt derzeit ebenfalls unklar. Dieser Fragestellung gilt es weiter nachzugehen.

Insgesamt lässt sich durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass Oli-neu Zellen bereits im undifferenzierten Stadium einige oligodendrozytenspezifische Proteine und Connexine exprimieren. Besonders Cx29 ist an dieser Stelle herauszustellen, da es in der RNA-Analyse signifikant hohe Expressionen aufwies und auf ultrastruktureller Ebene im FRIL eine vergleichbare Darstellung zu Cx29 im PNS aufzeigt.

Durch die Applikation von CPZ konnte auf Proteinebene signifikante negative Effekte auf die Proteinexpression von Cx29, MBP und PLP1 induziert werden. Durch eine zusätzliche Applikation von PBN konnte diesen Effekten für Cx29 und PLP1 entgegengewirkt werden. Hieraus ergeben sich weitere Hinweis für einen protektiven Effekt von PBN gegenüber CPZ und somit möglicherweise auch im Kontext einer MS.

Abschließend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Untersuchungen die Überlegung untermauern konnten, dass PBN ein möglicher Ansatz zur Therapie der MS ist. Bis zu einem möglichen Einsatz als Medikament in der MS-Therapie bedarf es jedoch weitere Untersuchungen. In Anlehnung an die vorliegenden Ergebnisse, sind vor allem die Expression und die Effekte von CPZ und PBN auf Panx1 in Oligodendrozyten und insbesondere in Oligodendrozyten Zellen auf RNA-, Protein- und subzellulärer Ebene von großem Interesse.

6 Literaturverzeichnis

1. Abudara V, Retamal MA, Del Rio R, Orellana JA (2018) Synaptic functions of hemichannels and pannexons: A double-edged sword. *Front Mol Neurosci* 11:
2. Alfredsson L, Olsson T (2019) Lifestyle and environmental factors in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9:
3. Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL (2002) Connexin29 Is Uniquely Distributed within Myelinating Glial Cells of the Central and Peripheral Nervous Systems. *The Journal of Neuroscience* 22:6458–6470
4. Bacmeister CM, Barr HJ, McClain CR, Thornton MA, Nettles D, Welle CG, Hughes EG (2020) Motor learning promotes remyelination via new and surviving oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 23:819–831
5. Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG (2015) Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol* 14:103–113
6. Bao L, Locovei S, Dahl G (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572:65–68
7. Baracaldo-Santamaría D, Corrales-Hernández MG, Ortiz-Vergara MC, Cormane-Alfaro V, Luque-Bernal RM, Calderon-Ospina CA, Cediel-Becerra JF (2022) Connexins and Pannexins: Important Players in Neurodevelopment, Neurological Diseases, and Potential Therapeutics. *Biomedicines* 10:
8. Barylko B, Dobrowolski Z (1984) Ca^{2+} -calmodulin-dependent regulation of F-actin-myelin basic protein interaction. *Eur J Cell Biol* 35:327–35
9. Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol Rev* 81:871–927
10. 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:
11. Beckmann A, Grißmer A, Wolf S, Recktenwald J, Meier C (2019) Oxygen-Glucose Deprivation in Mouse Astrocytes is Associated with Ultrastructural Changes in Connexin 43 Gap Junctions. *Neuroscience* 397:67–79
12. Bénardais K, Kotsiari A, Škuljec J, Koutsoudaki PN, Gudi V, Singh V, Vulinović F, Skripuletz T, Stangel M (2013) Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotox Res* 24:244–250
13. Berghoff SA, Düking T, Spieth L, Winchenbach J, Stumpf SK, Gerndt N, Kusch K, Ruhwedel T, Möbius W, Saher G (2017) Blood-brain barrier hyperpermeability precedes demyelination in the cuprizone model. *Acta Neuropathol Commun* 5:94
14. Bey GR, Padiath QS (2023) Enhanced differentiation of the mouse oli-neu oligodendroglial cell line using optimized culture conditions. *BMC Res Notes* 16:

15. Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildreorde M, Skarratt KK, Fuller SJ, Sluyter R, Stokes L (2014) Probenecid blocks human P2X7 receptor-induced dye uptake via a pannexin-1 independent mechanism. *PLoS One* 9:
16. 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. *Journal of Biological Chemistry* 282:31733–31743
17. Boggs JM (2006) Myelin basic protein: A multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:1945–1961
18. Boison D, Stoffel W (1989) Myelin-deficient rat: a point mutation in exon III (A----C, Thr75----Pro) of the myelin proteolipid protein causes dysmyelination and oligodendrocyte death. *EMBO J* 8:3295–3302
19. Boison D, Bqssow H, Donatella D'urso, Miiller H-W, Stoffell W (1995) Adhesive Properties of Proteolipid Protein Are Responsible for the Compaction of CNS Myelin Sheaths. *The Journal of Neuroscience* 75:5502–5513
20. Braun PE, Sandillon F, Edwards A, Matthieu J-M, Privat A (1988) Immunocytochemical Localization by Electron Microscopy of 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase in Developing Oligodendrocytes of Normal and Mutant Brain. *The Journal of Neuroscience* 8:30573066
21. Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins : the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1–27
22. Buschmann JP, Berger K, Awad H, Clarner T, Beyer C, Kipp M (2012) Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *Journal of Molecular Neuroscience* 48:66–76
23. Cammer W (1999) The neurotoxicant, cuprizone, retards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. *J Neurol Sci* 168:116–120
24. Carey EM, Freeman NM (1983) Biochemical changes in cuprizone-induced spongiform encephalopathy. *Neurochem Res* 8:1029–1044
25. Carlton WW (1966) Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol* 8:512–521
26. Carlton WW (1967) Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Science* 6:11–19
27. Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261–1276
28. Copray S, Balasubramaniyan V, Levenga J, de Bruijn J, Liem R, Boddeke E (2006) Olig2 Overexpression Induces the In Vitro Differentiation of Neural Stem Cells into Mature Oligodendrocytes. *Stem Cells* 24:1001–1010

29. Dahl G, Locovei S (2006) Pannexin: To gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life* 58:409–419
30. Dahl G, Keane RW (2012) Pannexin: From discovery to bedside in 11±4 years? *Brain Res* 1487:150–159
31. Davis BM, Guo L, Brenton J, Langley L, Normando EM, Cordeiro MF (2016) Automatic quantitative analysis of experimental primary and secondary retinal neurodegeneration: implications for optic neuropathies. *Cell Death Discov* 2:
32. Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T (2002) Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of β -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. *Plant Mol Biol Report* 20:347–356
33. Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett M V, Spray DC, Willecke K (1989) Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:10148–10152
34. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, Stockwell BR (2012) Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149:1060–1072
35. Dobrowolski Z, Osińska H, Mossakowska M, Barylko B (1986) Ca^{2+} -calmodulin-dependent polymerization of actin by myelin basic protein. *Eur J Cell Biol* 42:17–26
36. Dobson R, Giovannoni G (2019) Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol* 26:27–40
37. Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C (2010) P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia* 58:730–740
38. Duncan ID, Radcliff AB, Heidari M, Kidd G, August BK, Wierenga LA (2018) The adult oligodendrocyte can participate in remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E11807–E11816
39. Eiberger J, Kibschull M, Strenzke N, Schober A, Büssow H, Wessig C, Djahed S, Reucher H, Koch DA, Lautermann J, Moser T, Winterhager E, Willecke K (2006) Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice. *Glia* 53:601–611
40. Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35:495–516
41. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F (1997) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 185:579–82
42. Fiebich BL, Akter S, Akundi RS (2014) The two-hit hypothesis for neuroinflammation: Role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain. *Front Cell Neurosci* 8:
43. Fujimoto K (1995) Freeze-fracture replica electron microscopy combined with sds digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins: Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 108:3443–3449

44. Fujimoto K (1997) SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes: practical procedure, interpretation and application. *Histochem Cell Biol* 107:87–96
45. Fulton D, Paez PM, Campagnoni AT (2010) The Multiple Roles of Myelin Protein Genes During the Development of the Oligodendrocyte. *ASN Neuro* 2:AN20090051
46. Gold R, Linington C, Lassmann H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 Years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129:1953–1971
47. Goldberg J, Clarner T, Beyer C, Kipp M (2015) Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice. *Journal of Molecular Neuroscience* 57:166–175
48. Gudz TI, Komuro H, Macklin WB (2006) Glutamate Stimulates Oligodendrocyte Progenitor Migration Mediated via an alpha Integrin/Myelin Proteolipid Protein Complex. *The Journal of Neuroscience* 26:2458–2466
49. Gupta S, Chiu Y-H, Manjegowda MC, Desai BN, Ravichandran KS, Bayliss DA (2025) Distinct properties and activation of hexameric and heptameric Pannexin 1 channel concatemers. *J Gen Physiol* 157:
50. Hainz N, Wolf S, Tschernig T, Meier C (2016) Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation* 39:123–128
51. Hainz N, Becker P, Rapp D, Wagenpfeil S, Wonnenberg B, Beisswenger C, Tschernig T, Meier C (2017) Probenecid-treatment reduces demyelination induced by cuprizone feeding. *J Chem Neuroanat* 85:21–26
52. Hanstein R, Negoro H, Patel NK, Charollais A, Meda P, Spray DC, Suadican SO, Scemes E (2013) Promises and pitfalls of a Pannexin1 transgenic mouse line. *Front Pharmacol* 4:
53. Harauz G, Libich D (2009) The Classic Basic Protein of Myelin – Conserved Structural Motifs and the Dynamic Molecular Barcode Involved in Membrane Adhesion and Protein-Protein Interactions. *Curr Protein Pept Sci* 10:196–215
54. Hardy RJ, Lazzarini RA, Colman DR, Friedrich VL (1996) Cytoplasmic and Nuclear Localization of Myelin Basic Proteins Reveals Heterogeneity Among Oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 46:24–257
55. Hauser SL, Oksenberg JR (2006) The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron* 52:61–76
56. Hesse A, Wagner M, Held J, Brück W, Salinas-Riester G, Hao Z, Waisman A, Kuhlmann T (2010) In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiol Dis* 37:362–369

57. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting P-Y, Suzuki K, Matsushima GK (1998) Microglialmacrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BLr6 mice.
58. Hüttemann M, Zhang Z, Mullins C, Bessert D, Lee I, Nave K-A, Appikarla S, Skoff RP (2009) Different Proteolipid Protein Mutants Exhibit Unique Metabolic Defects. *ASN Neuro* 1:165–180
59. Iacobas S, Iacobas DA (2010) Astrocyte proximity modulates the myelination gene fabric of oligodendrocytes. *Neuron Glia Biol* 6:157–169
60. Jhelum P, Santos-Nogueira E, Teo W, Haumont A, Lenoël I, Stys PK, David S (2020) Ferroptosis mediates cuprizone-induced loss of oligodendrocytes and demyelination. *Journal of Neuroscience* 40:9327–9341
61. Jung M, Krämer E, Grzenkowski M, Tang K, Blakemore W, Aguzzi A, Khazaie K, Chlichlia K, Von Blankenfeld G, Kettenmann H, Trotter J (1995) Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *European Journal of Neuroscience* 7:1245–1265
62. Jurevics H, Largent C, Hostettler J, Sammond DW, Matsushima GK, Kleindienst A, Toews AD, Morell P (2002) Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *J Neurochem* 82:126–136
63. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE, Murray JP (1951) Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *Journal of Experimental Medicine* 93:615–633
64. Kesterson JW, Carlton WW (1971) Histopathologic and enzyme histochemical observations of the cuprizone-induced brain edema. *Experimental and Molecular Pathology* 15:82–96
65. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009) The cuprizone animal model: New insights into an old story. *Acta Neuropathol* 118:723–736
66. 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
67. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H (2000) Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis. *Am J Pathol* 157:267–276
68. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y (2019) Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. *Cells* 8:
69. Kumar NM, Gilula NB (1996) The Gap Junction Review Communication Channel. *Spray* 84:381–388
70. Kunzelmann P, Blümcke I, Traub O, Dermietzel R, Willecke K (1997) Coexpression of connexin45 and -32 in oligodendrocytes of rat brain. *J Neurocytol* 26:17–22

71. Lee DW, Kwon JI, Woo CW, Heo H, Kim KW, Woo DC, Kim JK, Lee DH (2021) In vivo measurement of neurochemical abnormalities in the hippocampus in a rat model of cuprizone-induced demyelination. *Diagnostics* 11:
72. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, Edan G (2010) Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain* 133:1900–1913
73. Li J, Habbes H, Eiberger J, Willecke K, Dermietzel R, Meier C (2007) Analysis of connexin expression during mouse Schwann cell development identifies Connexin29 as a novel marker for the transition of neural crest to precursor cells. *Glia* 55:93–103
74. Li X, Lynn BD, Olson C, Meier C, Davidson KG V, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI (2002) Connexin29 expression, immunocytochemistry and freeze-fracture replica immunogold labelling (FRIL) in sciatic nerve. *European Journal of Neuroscience* 16:795–806
75. Li X, Ionescu A V, Lynn BD, Lu S, Kamasawa N, Morita M, Davidson KG V, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI (2004) Connexin47, Connexin29 and Connexin32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain. *Neuroscience* 126:611–630
76. Locovei S, Wang J, Dahl G (2006) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580:239–244
77. Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X 7 receptor death complex. *FEBS Lett* 581:483–488
78. López-Muguruza E, Matute C (2023) Alterations of Oligodendrocyte and Myelin Energy Metabolism in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci* 24:
79. Lu RQ, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH (2000) Sonic Hedgehog-Regulated Oligodendrocyte Lineage Genes Encoding bHLH Proteins in the Mammalian Central Nervous System. *Neuron* 25:317–329
80. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 46:907–911
81. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions A study of 113 cases. *Brain* 122:2279–2295
82. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707–717
83. Magnotti LM, Goodenough DA, Paul DL (2011) Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *Glia* 59:26–34
84. Mao Y (2016) Nearest neighbor distances calculation with Image J.

85. Markoullis K, Sargiannidou I, Gardner C, Hadjisavvas A, Reynolds R, Kleopa KA (2012) Disruption of oligodendrocyte gap junctions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 60:1053–1066
86. Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N, Roncaroli F, Reynolds R, Kleopa KA (2014) Oligodendrocyte Gap Junction Loss and Disconnection From Reactive Astrocytes in Multiple Sclerosis Gray Matter. *Journal of Neuropathol & Experimental Neurology* 73:865–879
87. Martínez-pinilla E, Rubio-sardón N, Villar-conde S, Navarro G, Del Valle E, Tolivia J, Franco R, Navarro A (2021) Cuprizone-induced neurotoxicity in human neural cell lines is mediated by a reversible mitochondrial dysfunction: Relevance for demyelination models. *Brain Sci* 11:1–16
88. Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β .
89. Marzan DE, Brügger-Verdon V, West BL, Liddelow S, Samanta J, Salzer JL (2021) Activated microglia drive demyelination via CSF1R signaling. *Glia* 69:1583–1604
90. Mason JL, Jones JJ, Taniike M, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK (2000) Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination. *J Neurosci Res* 61:251–262
91. Massa PT, Mugnaini E (1982) Cell Junctions and Intramembrane Particles of Astrocytes and Oligodendrocytes: a Freeze-Fracture Study. *Neuroscience* 7:523–538
92. Massa PT, Mugnaini E (1985) Cell-Cell Junctional Interactions and Characteristic Plasma Membrane Features of Cultured Rat Glial Cells. *Neuroscience* 14:
93. Matsushima GK, Morell P (2001) The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathology* 11:107–116
94. Maxeiner S, Krüger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K (2003) Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience* 119:689–700
95. McMorris FA, McKinnon RD (1996) Regulation of Oligodendrocyte Development and CNS Myelination by Growth Factors: Prospects for Therapy of Demyelinating Disease. *Brain Pathology* 6:313–329
96. Mei F, Lehmann-Horn K, Shen Y-AA, Rankin KA, Stebbins KJ, Lorrain DS, Pekarek K, A Sagan S, Xiao L, Teuscher C, von Büdingen H-C, Wess J, Lawrence JJ, Green AJ, Fancy SP, Zamvil SS, Chan JR (2016) Accelerated remyelination during inflammatory demyelination prevents axonal loss and improves functional recovery. *Elife* 5:

97. Meier C, Dermietzel R, Davidson KGV, Yasumura T, Rash JE (2004) Connexin32-Containing Gap Junctions in Schwann Cells at the Internodal Zone of Partial Myelin Compaction and in Schmidt-Lanterman Incisures. *Journal of Neuroscience* 24:3186–3198
98. Mendel I, de Rosbo NK, Ben-Nun A (1995) A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor V β expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25:1951–1959
99. Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL (2003) Connexins Are Critical for Normal Myelination in the CNS. *The Journal of Neuroscience* 23:5963–5973
100. Menichella DM, Majdan M, Awatramani R, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL (2006) Genetic and physiological evidence that oligodendrocyte gap junctions contribute to spatial buffering of potassium released during neuronal activity. *Journal of Neuroscience* 26:10984–10991
101. Messori L, Casini A, Gabbiani C, Sorace L, Muniz-Miranda M, Zatta P (2007) Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalton Transactions* 2112–2114
102. Michalski K, Henze E, Nguyen P, Lynch P, Kawate T (2018) The weak voltage dependence of pannexin 1 channels can be tuned by N-terminal modifications. *Journal of General Physiology* 150:1758–1768
103. Milks LC, Kumar NM, Houghten R, Unwin N, Gilula NB (1988) Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J* 7:2967–2975
104. Miller MJ, Kangas CD, Macklin WB (2009) Neuronal expression of the proteolipid protein gene in the medulla of the mouse. *J Neurosci Res* 87:2842–2853
105. Miller RG, Pinto P, Silva DA (1977) Short Communications Particle rosettes in the periaxonal Schwann cell membrane and particle clusters in the axolemma of rat sciatic nerve.
106. Morell P, Barrett C V, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK (1998) Gene Expression in Brain during Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination. *Molecular and Cellular Neuroscience* 12:220–227
107. Nagy JI, Rash JE (2000) Short review Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Rev* 32:29–44
108. Nagy JI, Rash JE (2003) Astrocyte and Oligodendrocyte Connexins of the Glial Syncytium in Relation to Astrocyte Anatomical Domains and Spatial Buffering. *Cell Commun Adhes* 10:401–406
109. Nagy JI, Ionescu A V, Lynn BD, Rash JE (2003) Coupling of Astrocyte Connexins Cx26, Cx30, Cx43 to Oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications From Normal and Connexin32 Knockout Mice. *Glia* 44:205–218

110. Nagy JI, Ionescu A V, Lynn BD, Rash JE (2003) Connexin29 and Connexin32 at Oligodendrocyte and Astrocyte Gap Junctions and in Myelin of the Mouse Central Nervous System. *J Comp Neurol* 464:356–370
111. Nagy JI, Dudek FE, Rash JE (2004) Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system.
112. Novak AM, Lev-Ari S (2023) Resilience, Stress, Well-Being, and Sleep Quality in Multiple Sclerosis. *J Clin Med* 12:
113. 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. *The Journal of Neuroscience* 23:4549–4559
114. Olga K, Yulia B, Vassilios P (2020) The functions of mitochondrial 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase and prospects for its future. *Int J Mol Sci* 21:
115. Omlin FX, Webster HF, Palkovits CG, Cohen SR (1982) Immunocytochemical Localization of Basic Protein in Major Dense Line Regions of Central and Peripheral Myelin. *J Cell Biol* 95:242–248
116. Orthmann-Murphy JL, Freidin M, Fischer E, Scherer SS, Abrams CK (2007) Two Distinct Heterotypic Channels Mediate Gap Junction Coupling between Astrocyte and Oligodendrocyte Connexins. *The Journal of Neuroscience* 27:13949–13957
117. Parenti R, Cicirata F, Zappalá A, Catania A, La Delia F, Cicirata V, Tress O, Willecke K (2010) Dynamic expression of Cx47 in mouse brain development and in the cuprizone model of myelin plasticity. *Glia* 58:1594–1609
118. Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Uña AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF (2007) The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res* 32:279–292
119. Pelegrin P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *Journal of immunology* 180:7147–57
120. Pereira GB, Dobretsova A, Hamdan H, Wight PA (2011) Expression of myelin genes: Comparative analysis of Oli-neu and N20.1 oligodendroglial cell lines. *J Neurosci Res* 89:1070–1078
121. Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1:92–95
122. Philippi M, Vyklicky L, Orkand RK (1996) Potassium currents in cultured glia of the frog optic nerve. *Glia* 17:72–82

123. Rash JE, Duffy HS, Dudek FE, Bilhartz BL, Ray Whalen L, Yasumura T (1997) Grid-Mapped Freeze-Fracture Analysis of Gap Junctions in Gray and White Matter of Adult Rat Central Nervous System, With Evidence for a „Panglial Syncytium“ That Is Not Coupled to Neurons. *Journal of Comparative Neurology* 388:265–292
124. Rash JE, Yasumura T (1999) Direct immunogold labeling of connexins and aquaporin-4 in freeze-fracture replicas of liver, brain, and spinal cord: factors limiting quantitative analysis. *Cell Tissue Res* 296:307–321
125. Rash JE (2010) Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168:982–1008
126. Rash JE, Kamasawa N, Davidson KGV, Yasumura T, Pereda AE, Nagy JI (2012) Connexin composition in apposed gap junction hemiplaques revealed by matched double-replica freeze-fracture replica immunogold labeling. *Journal of Membrane Biology* 245:333–344
127. Rash JE, Vanderpool KG, Yasumura T, Hickman J, Beatty JT, Nagy JI (2016) K V 1 channels identified in rodent myelinated axons, linked to Cx29 in innermost myelin: support for electrically active myelin in mammalian saltatory conduction. *J Neurophysiol* 115:1836–1859
128. Raslan A, Hainz N, Beckmann A, Tschernig T, Meier C (2016) Pannexin-1 expression in developing mouse nervous system: new evidence for expression in sensory ganglia. *Cell Tissue Res* 364:29–41
129. Rassul SM, Otsu M, Styles IB, Neely RK, Fulton D (2023) Single-molecule tracking of myelin basic protein during oligodendrocyte differentiation. *Biological Imaging* 3:
130. Readhead C, Takasashi N, Shine HD, Saavedra R, Sidman R, Hood L (1990) Role of Myelin Basic Protein in the Formation of Central Nervous System Myelin. *Ann N Y Acad Sci* 605:280–285
131. Recktenwald JC (2020) Hyperosmolare Sucrose-Lösung induziert ultrastrukturelle Veränderungen in astrozytären Gap Junctions. Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
132. Scherer SS, Braun PE, Grinspan J, Collarini E, Wang D-Y, Kamholz J (1994) Differential Regulation of the 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase Gene during Oligodendrocyte Development. *Neuron* 12:1363–1375
133. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis HHS Public Access. *Nat Methods* 9:671–675
134. Sen MK, Almuslehi MSM, Shortland PJ, Coorsen JR, Mahns DA (2020) Revisiting the Pathoetiology of Multiple Sclerosis: Has the Tail Been Wagging the Mouse? *Front Immunol* 11:
135. Severs NJ (2007) Freeze-fracture electron microscopy. *Nat Protoc* 2:547–576
136. Silverman W, Locovei S, Dahl G (2008) Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:

137. Silverman W, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson S, Scemes E, Keane R, Dahl G (2009) The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 284:18143–18151
138. Skoff RP, Bessert DA, Cerghet M, Franklin MJ, Rout UK, Nave K-A, Carlock L, Ghandour MS, Armant DR (2004) The myelin proteolipid protein gene modulates apoptosis in neural and non-neural tissues. *Cell Death Differ* 11:1247–1257
139. Skoff RP, Saluja I, Bessert D, Yang X (2004) Analyses of Proteolipid Protein Mutants Show Levels of Proteolipid Protein Regulate Oligodendrocyte Number and Cell Death in vitro and in vivo. *Neurochem Res* 29:2095–2103
140. Söhl G, Eiberger J, Jung YT, Kozak CA, Willecke K (2001) The Mouse Gap Junction Gene Connexin29 Is Highly Expressed in Sciatic Nerve and Regulated during Brain Development. *Biol Chem* 382:
141. Söhl G, Willecke K (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10:173–180
142. Söhl G, Hombach S, Degen J, Odermatt B (2013) The oligodendroglial precursor cell line Oli-neu represents a cell culture system to examine functional expression of the mouse gap junction gene connexin29 (Cx29). *Front Pharmacol* 4:
143. Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar BA, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao HB, Dahl G (2011) Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels* 5:
144. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJG (2012) Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci* 13:507–514
145. Talbott JH (1953) Diagnosis and Treatment of Gouty Arthritis. *California Medicine* 79:220–226
146. Tepavčević V, Lubetzki C (2022) Oligodendrocyte progenitor cell recruitment and remyelination in multiple sclerosis: the more, the merrier? *Brain* 145:4178–4192
147. Titus HE, Chen Y, Podojil JR, Robinson AP, Balabanov R, Popko B, Miller SD (2020) Pre-clinical and Clinical Implications of “Inside-Out” vs. “Outside-In” Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Front Cell Neurosci* 14:
148. Trotter J, Schachner M (1989) Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Developmental Brain Research* 46:115–122
149. Vejar S, Oyarzún JE, Retamal MA, Ortiz FC, Orellana JA (2019) Connexin and pannexin-based channels in oligodendrocytes: Implications in brain health and disease. *Front Cell Neurosci* 13:
150. Verma A, Verma M, Singh A (2020) Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation* 269–293

151. Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E, Bhutta ZA, Gebrehiwot TT, Hay SI, Khalil IA, Krohn KJ, Liang X, Naghavi M, Mokdad AH, Nixon MR, Reiner RC, Sartorius B, Smith M, Topor-Madry R, Werdecker A, Vos T, Feigin VL, Murray CJL (2019) Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 18:269–285
152. Wergeland S, Torkildsen Ø, Myhr KM, Mørk SJ, Bø L (2012) The cuprizone model: Regional heterogeneity of pathology. *APMIS* 120:648–657
153. Whitham R. H., Bourdette D. N., Hashim G. A., Herndon R. M., Ilg R. C., Vandenbark A. A., Offner H. (1991) Lymphocytes from SJL/J mice immunized with spinal cord respond selectively to a peptide of proteolipid protein and transfer relapsing demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 101:146–145
154. Wilson R, Brophy PJ (1989) Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination. *J Neurosci Res* 22:439–448
155. Winkelmann A, Loebermann M, Reisinger EC, Hartung HP, Zettl UK (2016) Disease-modifying therapies and infectious risks in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 12:217–233
156. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134
157. Zatta P, Raso M, Zambenedetti P, Wittkowski W, Messori L, Piccioli F, Mauri PL, Beltramini M (2005) Copper and zinc dismetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:1502–1513
158. 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
159. Zirngibl M, Assinck P, Sizov A, Caprariello A V., Plemel JR (2022) Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. *Mol Neurodegener* 17:

7 Danksagung

Zum Schluss möchte ich all den Menschen, die mich in der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Aufnahme in Ihre Abteilung. Dies bezieht sich insbesondere auf die umfangreiche fachliche sowie persönliche Unterstützung und den stetigen und angenehmen fachlichen Austausch.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Anja Beckmann für die angenehme Betreuung und die tatkräftige fachliche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle die Hilfestellungen bei der Anfertigung der FRIL-Proben und der statistischen Auswertung.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. rer. nat. Nadine Hainz für die nette Betreuung, die Einarbeitung in die Abteilung, die Erarbeitung des Themas und die Durchführung und Auswertung der Versuche.

Herrn Alexander Grißmer danke ich für die konstante Unterstützung in der Durchführung der Laborversuche und insbesondere für die kompetente Anleitung in der Durchführung und Auswertung der FRIL-Versuche.

Ich bedanke mich bei Frau Andrea Rabung für die Mithilfe bei der Durchführung der qPCR, bei Herrn Martin Messer für die Unterstützung in der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung und bei Frau Amal Bechchar für ihren Einsatz in der Durchführung der Gelelektrophorese.

Ein weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. Jacqueline Trotter von der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die Bereitstellung der Zelllinie Oli-neu.

Außerdem gilt Frau Belinda König und allen anderen Mitarbeitenden der TEM-Abteilung des Forschungsgebäudes 61.4 mein Dank.

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern, meine Schwester und meinen Partner Sebastian, die mich nicht nur durch das gesamte Medizinstudium begleitet haben, sondern mir auch auf dem langen Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit beigestanden und mich stets unterstützt haben.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.