

Aus der Fachrichtung
Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier

**Die Applikation von Probenecid in zwei Tiermodellen der Multiplen Sklerose:
Positive Effekte auf Myelinisierung und Immunstatus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017

vorgelegt von Philipp Becker
geboren am 10.01.1993 in St.Wendel

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Zusammenfassung.....	1
1 Summary	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Multiple Sklerose	5
2.2 Cuprizon-Modell.....	7
2.3 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	9
2.4 Pannexin und Probenecid	12
2.5 Hypothesen	15
2.5.1 Cuprizon-Modell	15
2.5.2 EAE-Modell	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Verwendete Materialien und Geräte	16
3.2 Versuchstiere des CPZ-Modells	20
3.2.1 Haltung der CPZ-Tiere.....	20
3.2.2 Einteilung der Versuchsgruppen des CPZ-Modells.....	20
3.2.3 Probenecid-Behandlung	21
3.3 Versuchstiere des EAE-Modells	22
3.3.1 Haltung der EAE-Tiere	22
3.3.2 Einteilung der Versuchsgruppen des EAE-Modells.....	23
3.3.3 Induktion der EAE	26

3.3.4	EAE-Score.....	27
3.4	Durchflusszytometrische Methode.....	28
3.4.1	Organentnahme	28
3.4.2	Milzpräparation	28
3.4.3	Erythrozytenlyse.....	29
3.4.4	Zellzahlbestimmung	29
3.4.5	Antikörperfärbung.....	29
3.5	Lichtmikroskopie.....	31
3.5.1	Paraffineinbettung	31
3.5.2	Anfertigung der Paraffinschnitte	31
3.5.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Paraffinschnitte	31
3.5.4	Luxol-Fast-Blue-Färbung der Paraffinschnitte	32
3.5.5	Diaminobenzidin-Färbung der Paraffinschnitte	32
3.6	Transmissionselektronenmikroskopie	34
3.6.1	Epon-Einbettung.....	34
3.6.2	Herstellung der Ultradünnschnitte	35
3.6.3	Befilmung der Grids.....	35
3.6.4	Kontrastierung der Grids	36
3.6.5	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	36
3.6.6	g-ratio	37
3.6.7	Auswertung der Aufnahmen	38
3.7	Datenverarbeitung und statistische Analyse.....	39
3.7.1	Durchflusszytometrie	39
3.7.2	Transmissionselektronenmikroskopie	39
3.7.3	EAE-Score.....	40
4	Ergebnisse	41

4.1	Ergebnisse des CPZ-Modells	41
4.1.1	Durchflusszytometrie	41
4.1.2	Lichtmikroskopie	45
4.1.3	Transmissionselektronenmikroskopie	50
4.2	Ergebnisse des EAE-Modells	53
4.2.1	EAE-Score	53
4.2.2	Durchflusszytometrie	57
5	Diskussion	65
6	Fazit	80
7	Literaturverzeichnis	82
8	Anhang	91
8.1	Deskriptive Statistik des CPZ-Modells	91
8.2	Deskriptive Statistik des EAE-Modells	93
9	Publikation	97
	Danksagung	98
	Eidesstattliche Erklärung	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1.	Versuchsgruppen des CPZ-Modells	21
Abb. 3-2.	Schematische Darstellung der Gruppe EAE des therapeutischen EAE-Ansatzes	23
Abb. 3-3.	Versuchsgruppen des EAE 250 mg Probenecid Versuchs	25
Abb. 3-4.	Berechnung der g-ratio	37
Abb. 4-1.	Zellzahlen pro 100 µl Blut im CPZ-Versuch	42
Abb. 4-2.	Zellzahlen pro Milz im CPZ-Versuch	44
Abb. 4-3.	Lichtmikroskopische Aufnahmen des Corpus callosum nach HE-Färbung	46
Abb. 4-4.	Lichtmikroskopische Aufnahmen des Corpus callosum nach LFB-Färbung	47
Abb. 4-5.	Lichtmikroskopische Aufnahmen des Corpus callosum nach MBP-Immunhistochemie.....	48
Abb. 4-6.	Lichtmikroskopische Aufnahmen des Corpus callosum nach CNPase-Immunhistochemie	49
Abb. 4-7.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des optischen Nerven	50
Abb. 4-8.	GEE-Analyse der Axon-Durchmesser	51
Abb. 4-9.	GEE-Analyse der g-ratios	52
Abb. 4-10.	Krankheitsverlauf der Tiere im EAE 100 mg Probenecid Versuch.....	53
Abb. 4-11.	Krankheitsverlauf der Tiere im EAE 250 mg Probenecid Versuch.....	55
Abb. 4-12.	Klinische Symptomatik an einzelnen Behandlungstagen im EAE 250 mg Probenecid Versuch	56
Abb. 4-13.	Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 100 mg Probenecid Versuch	57
Abb. 4-14.	Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch nach Oberflächenfärbung	58
Abb. 4-15.	Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch nach intrazellulärer Färbung	59
Abb. 4-16.	Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 250 mg Probenecid Versuch	61
Abb. 4-17.	Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch nach Oberflächenfärbung.....	63
Abb. 4-18.	Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch nach intrazellulärer Färbung	64

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1:	Materialliste.....	16
Tab. 3-2:	Geräteliste	19
Tab. 3-3:	Einteilung der CPZ-Tiere nach Versuchsgruppen.....	21
Tab. 3-4:	Einteilung der EAE-Tiere des EAE 100mg Probenecid Versuchs nach Versuchsgruppen.....	23
Tab. 3-5:	Einteilung der EAE-Tiere des EAE 250mg Probenecid Versuchs nach Versuchsgruppen.....	24
Tab. 3-6:	Auflistung der Antikörper	30
Tab. 8-1:	Absolute Zellzahlen pro 100 µl Blut im CPZ-Versuch.....	91
Tab. 8-2:	Prozentuale Zellzahlen pro 100 µl Blut im CPZ-Versuch.....	91
Tab. 8-3:	Absolute Zellzahlen pro Milz im CPZ-Versuch.....	91
Tab. 8-4:	Prozentuale Zellzahlen pro Milz im CPZ-Versuch.....	92
Tab. 8-5:	Regressionskoeffizienten mit zugehörigen 95% Konfidenzintervallen in µm im Axon-Durchmesser-Gruppenvergleich.....	92
Tab. 8-6:	Regressionskoeffizienten mit zugehörigen 95% Konfidenzintervallen im g-ratio-Gruppenvergleich	92
Tab. 8-7:	Absolute Werte Axon-Durchmesser und g-ratio	92
Tab. 8-8:	Klinische Symptomatik der EAE-Tiere an einzelnen Behandlungstagen im EAE 250 mg Probenecid Versuch.....	93
Tab. 8-9:	Absolute Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 100 mg Probenecid Versuch.....	93
Tab. 8-10:	Prozentuale Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 100 mg Probenecid Versuch.....	94
Tab. 8-11:	Absolute Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch.....	94
Tab. 8-12:	Prozentuale Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch.....	94
Tab. 8-13:	Absolute Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch.....	95
Tab. 8-14:	Absolute Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 250 mg Probenecid Versuch.....	95
Tab. 8-15:	Prozentuale Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 250 mg Probenecid Versuch.....	95
Tab. 8-16:	Absolute Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch.....	96
Tab. 8-17:	Prozentuale Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch.....	96
Tab. 8-18:	Prozentuale Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch.....	96

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Abs.	Absatz
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BBB	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	Beziehungsweise
ca.	zirka
CFA	complete Freund´s adjuvant
CNPase	Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPZ	Cuprizon
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FoxP3	forkhead box protein P3
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
M	Molarität, mol pro Liter
MBP	Myelin Basic Protein
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar

MOG	Myelin Oligodendrocyt Glycoprotein
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
OAT	Organischer Anionen-Transporter
OPC	Oligodendrozyten-Vorläufer-Zelle
p	Prozentuale Angabe des Signifikanzniveaus
P2X7R	purinerge ionotrope P2X7-Rezeptor
Panx1	Pannexin1
PBN	Probenecid
PBS	phosphate buffered saline
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PLP	Proteolipid Protein
PP-MS	primär progrediente Multiple Sklerose
PTX	Pertussis-Toxin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RR-MS	relapsing-remitting Multiple Sklerose
Sec	Sekunde
SP-MS	sekundär progrediente Multiple Sklerose
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Treg	regulatorische T-Zelle
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Zusammenfassung

Multiple Sklerose stellt ein häufiges neurologisches Krankheitsbild dar, für das es bisher keine ursächliche Therapie gibt und dessen palliative und symptomatische Therapie oft mit einer Vielzahl an Nebenwirkungen einhergeht. Um die komplexe Pathophysiologie besser zu verstehen, werden seit Jahrzehnten verschiedene Mausmodelle der Multiplen Sklerose eingesetzt, aus deren Erforschung bereits neue Therapieoptionen hervorgegangen sind. In der vorliegenden Arbeit wurden das toxische Cuprizon-Modell und das immunologische EAE-Modell verwendet, um mögliche positive Wirkungen des Gichtmedikaments Probenecid zu untersuchen. Es sollte überprüft werden, ob Probenecid im Cuprizon-Modell eine Demyelinisierung des optischen Nervens verringert und ob eine Probenecid-Therapie im EAE-Modell den Krankheitsverlauf der Versuchstiere günstig beeinflusst. In beiden Modellen sollten Zellzahlveränderungen mit durchflusszytometrischen Messungen verschiedener Leukozyten-Populationen in Blut und Milz detektiert werden, um so mögliche Hinweise auf eine immunologische Wirkung von Probenecid zu erhalten. Es wurde jeweils eine Versuchsgruppe mit einer täglichen intraperitonealen Probenecid-Injektion behandelt.

Im Cuprizon-Versuch wurden von den entnommenen optischen Nerven ultrastrukturelle Querschnittsaufnahmen erstellt, auf denen die Axon-Durchmesser und g-ratios bestimmt und mithilfe der Generalized Estimating Equation miteinander verglichen wurden. Hierbei zeigte sich ein signifikant größerer medianer Axon-Durchmesser der mit Cuprizon therapierten Versuchsgruppe im Vergleich zu den Gruppen ohne Probenecid-Therapie, was einen deutlichen Hinweis gibt, dass eine Probenecid-Therapie Demyelinisierungsvorgänge mindert. Die Ursache dieser Probenecid-Wirkung liegt möglicherweise in einer Reduktion von oxidativem Stress oder in einem IL-1 β vermittelten immunologischen Mechanismus, der sich auch auf den Neuritenschaden, der als Folge der Demyelinisierung entsteht, auswirkt. Interessant ist an dieser Stelle auch, dass die Demyelinisierung im optischen Nerven generell geringer ausgeprägt war, als in anderen Hirnregionen. Nach Blut- und Milzentnahme wurden die abgezählten Leukozyten gefärbt und durchflusszytometrisch absolute und prozentuale Zellzahlen verschiedener Leukozyten-Populationen bestimmt. In diesen Messungen fiel im Cuprizon-Versuch besonders auf, dass der prozentuale Anteil der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten in der Standardfutter-Gruppe sowohl im Blut als auch in der Milz signifikant höher als in allen CPZ-Gruppen war, während in den anderen Zellpopulationen keine Unterschiede im Gruppenvergleich auftraten. Dass die Unterschiede fast ausschließlich in der Population der CD25⁺-Zellen gefunden wurden, kann die These aufkommen, dass diese

Zellen im CPZ-Modell vermindert auftreten, ohne dass dies durch eine Probenecid- oder Solvent-Therapie beeinflusst wurde.

Die EAE-Tiere wurden mit einer MOG-Emulsion immunisiert und anschließend täglich untersucht, um anhand eines Scores den Krankheitsverlauf zu beurteilen. Ab einem bestimmten Krankheitsstadium wurden die Tiere mit Probenecid therapiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine Probenecid-Therapie den Krankheitsverlauf günstig beeinflusst. Es wurde ein Aufhalten der Symptomprogredienz gezeigt, die dosisabhängig war, da erst eine Probenecid-Dosis von 250 mg pro kg Körpergewicht ausreichte, um eine positive therapeutische Wirkung nachzuweisen. Da Probenecid Pannexin-Kanäle und P2X7-Rezeptoren blockiert, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Angriffspunkt ein Ausgangspunkt mehrerer Prozesse mit unterschiedlichen und weitreichenden Folgen darstellt, von dem ausgehend verschiedene Mechanismen der Oligodendrozyten- und Neuronenschädigung ablaufen. Wahrscheinlich scheint hier einerseits ein Mechanismus, der ebenfalls ausgehend von IL-1 β über den Signalweg der Inflammation-Aktivierung auf die Blut-Hirnschranke und auf unterstützende Zellen des angeborenen Immunsystems wirkt, andererseits aber auch direkt eine Wirkung auf T-Lymphozyten entfaltet. Gestützt wird dieser Gedanke dadurch, dass im 250 mg EAE-Versuch der prozentuale Anteil der CD3⁺CD4⁺ Zellen pro Milz die Anteile der Kontroll-Gruppe und der EAE/PBN überstieg. Man könnte also hier davon ausgehen, dass bei zwar gleichgebliebener Treg-Anzahl, die Anzahl der autoreaktiven CD4⁺ T-Helferzellen in der EAE- und EAE/solvent-Gruppe am Ort der Antigenpräsentation im peripheren lymphatischen Organ zugenommen hat, während dies durch eine Probenecid-Therapie unterblieb.

Diese Arbeit gibt Anhaltspunkte dafür, dass Probenecid als Therapeutikum bei Multipler Sklerose durchaus Sinn macht, da eine Therapie im Mausmodell nicht zu vernachlässigende Vorteile erbracht hat. Zusätzlich spricht das geringe Nebenwirkungsprofil in Verbindung mit der langen Erfahrung im Umgang mit dem Medikament zumindest für eine unterstützende Therapie. Es müssen jedoch einzelne Teilaspekte in weiterer Forschung genauer geklärt werden, um die Pharmakodynamik des Medikaments in Bezug auf die Pathophysiologie der Multiplen Sklerose besser zu verstehen.

1 Summary

Multiple sclerosis is a common neurological disorder for which there is no causal therapy and whose palliative and symptomatic therapy is often associated with a variety of side effects. In order to better understand the complex pathophysiology, various mouse models of multiple sclerosis have been used for decades, from which research new therapeutic options have already emerged. In the present work, the toxic cuprizone model and the immunological EAE model were used to investigate possible positive effects of the gout medication probenecid. It should be examined whether probenecid in the cuprizone model reduces demyelination of the optical nerve and if a probenecid therapy in the EAE model favorably affects the course of the disease of the test animals. In both models, cell number changes should be detected by flow cytometry measurements of different leukocyte populations in blood and spleen in order to obtain possible evidence of an immunological effect of probenecid. One experimental group was treated with a daily intraperitoneal injection of probenecid.

In the cuprizone test, the ultrastructural cross-sections were obtained from the extracted optical nerves, on which the axon diameter and g-ratios were determined and compared with the Generalized Estimating Equation. A significantly larger median axon diameter of the cuprizone treated experimental group was compared with the groups without probenecid therapy, which clearly indicates that a probenecid therapy reduces demyelination. The cause of this probenecid effect may be a reduction in oxidative stress or in an IL-1 β -mediated immunological mechanism affecting neurite damage resulting from demyelination. It is also interesting at this point that the demyelination in the optical nerves was generally less pronounced than in other brain regions. After blood sampling and spleen removal, the abolished leukocytes were stained and absolute and percentage cell numbers of different leukocyte populations were determined by flow cytometry. In these measurements, the percentage of CD3⁺CD4⁺CD25⁺ lymphocytes in the standard feed group was significantly higher in both the blood and spleen than in all CPZ groups, whereas in the other cell populations there was no difference in the group comparison. The fact that the differences were found almost exclusively in the population of the CD25⁺ cells can lead to the thesis that these cells are reduced in the cuprizone model without this being influenced by probenecid or solvent therapy.

The EAE animals were immunized with an MOG emulsion and then examined daily to assess the course of the disease by means of a score. From a certain stage of the disease the animals were treated with probenecid. It was found that probenecid therapy had a favorable effect on

the course of the disease. There was shown a dose-dependent positive therapeutic effect, a dose of 250 mg per kg of body weight was needed to demonstrate a positive therapeutic effect. Since Probenecid blocks pannexin channels and P2X7 receptors, it can be assumed that this attack point is a starting point of several processes with different and far-reaching consequences, starting with different mechanisms of oligodendrocyte and neuronal damage. It is probable that on the one hand, a mechanism which also acts as a starting-point for IL-1 β via the signaling pathway of inflammasome activation on the blood-brain barrier and on supporting cells of the innate immune system also appears to have an immediate effect on T-lymphocytes. This idea is supported by the fact that in the 250 mg EAE experiment, the percentage of CD3⁺CD4⁺ cells per spleen exceeded the proportions of the control group and the EAE/PBN. Thus, the number of autoreactive CD4⁺ T helper cells in the EAE and EAE/solvent group at the site of antigen presentation in the peripheral lymphatic organ has increased while the Treg number remains the same, while this did not occur through a probenecid therapy.

This work provides evidence that probenecid as a therapeutic agent in multiple sclerosis makes sense, since a therapy in the mouse model has not led to negligible advantages. In addition, the low side-effect profile in combination with the long experience with the drug speaks at least for a supporting therapy. However, individual partial aspects have to be clarified in further research in order to better understand the pharmacodynamics of the drug with regard to the pathophysiology of multiple sclerosis.

2 Einleitung

2.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-inflammatorische Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die durch Demyelinisierung und axonale Schädigung zentraler Neurone gekennzeichnet ist (Gold et al., 2006). Die Erkrankung, von der weltweit zirka 2,5 Millionen Menschen betroffen sind (Tullman, 2013), beginnt zumeist im frühen bis mittleren Erwachsenenalter und zeigt eine Häufung bezüglich des weiblichen Geschlechts (Hauser and Oksenberg, 2006) und bezüglich auf industrialisierten Kontinenten wie Europa, Nordamerika oder Australien lebenden Menschen (Noseworthy et al., 2000). Die klinische Manifestation der MS ist abhängig von der Lokalisation der demyelinisierten Herde im ZNS, somit reicht sie von sensiblen und motorischen Ausfällen, über Gesichtsfeldausfälle bei Entzündung des optischen Nervens, bis hin zu kognitiven Schwierigkeiten und Depressionen (Compston and Coles, 2008). Bei ungefähr 85% der Patienten tritt als häufigste Verlaufsform die sogenannte „relapsing-remitting“ MS (RR-MS) auf, die durch schubförmige Episoden gekennzeichnet ist. Während der Episoden treten neurologische Symptome auf, die sich über eine längere Zeit wieder zurückbilden (Remission), jedoch geht diese Verlaufsform meistens in eine sekundär progrediente (SP-MS) über, bei der mehr und mehr eine dauerhafte neurologische Symptomatik bestehen bleibt (Hauser and Oksenberg, 2006). Weiterhin können während der Schubepisode mit Magnetresonanztomographie demyelinisierte Herde in der Weißen Substanz detektiert werden. Zirka 10% der Patienten zeigen von Krankheitsbeginn an eine sich kontinuierlich verschlechternde Verlaufsform mit fortschreitender neurologischer Symptomatik, die als primär progrediente MS (PP-MS) bezeichnet wird. (Hauser and Oksenberg, 2006). Es wird davon ausgegangen, dass die Pathogenese der MS auf Immunsystem-vermittelter Inflammation beruht, jedoch auch von genetischen und umweltbedingten Faktoren beeinflusst wird (Hemmer et al., 2015). Hier wird beispielsweise verschiedenen Allelen des Gens HLA DRB1, das für die an der Antigenpräsentation beteiligten Haupthistokompatibilitätskomplexen II (MHC II)-Moleküle kodiert, eine besondere Bedeutung für das vermehrte Auftreten der MS zugesprochen (Sawcer and Hellenthal, 2011). Ein Umweltfaktor, der epidemiologisch mit einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken in Verbindung gebracht wird, ist die Infektion mit Epstein-Barr-Virus (Levin et al., 2010). Diese Erkenntnis stärkt auch eine Hypothese der MS-Entstehung, wobei autoreaktive T-Zellen durch infektiöse Antigene in peripheren lymphatischen Organen aktiviert werden und nach Einwandern ins ZNS eine Autoimmunreaktion auslösen. Die

Entstehung beruht hier auf dem Mechanismus der sogenannten „molekularen Mimikry“ (Fujinami and Oldstone, 1985). Bei diesem Mechanismus können T-Zellen durch ein exogenes mikrobielles Protein, das strukturelle Ähnlichkeit zu einem körpereigenen Protein aufweist, aktiviert werden und sich so gegen diese körpereigenen Proteine, wie zum Beispiel myelin basic protein (MBP), richten (Wucherpfennig and Strominger, 1995). Eine andere Möglichkeit für die Entstehung autoreaktiver T-Zellen und damit eine Möglichkeit der MS-Entstehung besteht darin, dass im Thymus natürliche, zufällig entstandene autoreaktive T-Zellen nicht negativ selektiert werden, der Apoptose entgehen und vom Thymus aus in den Körper und somit auch in ZNS gelangen (Yin et al., 2011). Außerhalb des Thymus führt vermutlich ein vermindertes Auftreten von regulatorischen T-Zellen (Tregs) bei MS-Patienten dazu, dass die autoimmune Wirkung dieser autoreaktiven T-Zellen nicht von Tregs unterdrückt wird (Viglietta et al., 2004). Neben dem "molekularen Mimikry" gilt die sogenannte "bystander activation" als weitere Ursache, die zur Pathogenese der MS beiträgt. In dem Fall führt eine mikrobielle Infektion zur Aktivierung von Antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie dendritischen Zellen, die dann wiederum vorformierte autoreaktive T-Zellen aktivieren (Fujinami et al., 2006). Durch „molekulares Mimikry“ oder „bystander activation“ entstandene ZNS-spezifische autoreaktive T-Zellen gelangen im Normalfall nicht ins ZNS, da die Blut-Hirn-Schranke (BBB), die hauptsächlich aus Astrozyten und speziellen Endothelzellen aufgebaut ist, neben körperfremden Stoffen auch Immunzellen am Übertritt ins ZNS hindert (Ortiz et al., 2014). Bei MS-Patienten wurde eine erhöhte Durchlässigkeit der BBB festgestellt (Tofts and Kermode, 1989), was autoreaktiven T-Zellen die Migration ins ZNS erleichtert. Nachdem diese ins ZNS eingewandert sind und ihr spezifisches körpereigenes Antigen als pathogen erkannt haben, schütten sie eine Vielzahl an Zytokinen aus, die einerseits zur Demyelinisierung beitragen, aber andererseits auch die BBB zerstören und so die erleichterte Migration weiterer Immunzellen ermöglichen (Hemmer et al., 2015). Neben weiteren Lymphozyten wandern auch Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, ins ZNS ein. An dieser Stelle setzt das Zweitlinientherapeutikum Natalizumab an, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der durch Hemmung des Integrin $\alpha4\beta1$ -Moleküls, die Migration von Leukozyten über die BBB ins ZNS inhibiert und so die Krankheitsprogression und die Anzahl der Schübe und der demyelinisierenden Herde signifikant vermindert (Polman et al., 2006; Yednock et al., 1992). Die eingewanderten Makrophagen tragen zusammen mit Mikrogliazellen (Gold et al., 2006) durch Stickstoffmonoxid (Redford et al., 1997), Matrixmetalloproteasen (Leppert et al., 2001) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Hauser and Oksenberg, 2006), aber auch CD8⁺ T-Zellen

(Salou et al., 2015), zur Entstehung von demyelinisierten Herden und Zerstörung oder Blockade von Axonen, und damit auch der zugehörigen Neuronen, bei (Gold et al., 2006; Hemmer et al., 2015). Es wird davon ausgegangen, dass gerade dieser zentrale Neuronen-Verlust, der in Folge der Demyelinisierung oder direkt durch die toxischen Mediatoren entsteht, die fortschreitende Progression der MS-Symptomatik verursacht (Filippi and Rocca, 2005; Neumann, 2003). Die heterogene Klinik der MS, ihre verschiedenen Verlaufsformen und die autoimmun-vermittelte Pathogenese (Gold et al., 2006), die mit Demyelinisierung und neuronaler Schädigung einhergeht wurde in verschiedenen Mausmodellen der MS erforscht und somit besser, wenn auch bisher noch unzureichend, verstanden. Gerade die hier beschriebene autoimmune, durch T-Zellen vermittelte Pathogenese spiegelt sich im Mausmodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), bei der durch Immunisierung eine MS-ähnliche Erkrankung der Mäuse ausgelöst wird, wider (Gold et al., 2006).

2.2 Cuprizon-Modell

Diesem immunologischen Modell der EAE steht das toxische Cuprizon-Modell gegenüber. Zwar imitiert dieses die Komplexität der autoimmunen Prozesse der Multiplen Sklerose beim Menschen weniger gut, es lassen sich hier jedoch Prozesse der De- und Remyelinisierung besser zeigen (Blakemore and Franklin, 2008). Cuprizon (Biscyclohexanonoxaldehydhydrat, CPZ) ist ein Chelator, der, systemisch verabreicht, vermehrte Kupferausscheidung der Mäuse und eine Apoptose von Oligodendrozyten mit anschließender axonaler Demyelinisierung bewirkt (Matsushima and Morell, 2001; Venturini, 1973). Erstmals wurde das CPZ-Modell 1966 von Carlton beschrieben, der bei Mäusen nach Cuprizongabe eine Demyelinisierung bemerkte (Carlton, 1966). Der genaue Pathomechanismus, der ausschließlich zum Untergang der Oligodendrozyten führt, ohne dass andere Zellpopulationen betroffen sind, ist bisher nur unvollständig verstanden (Torkildsen et al., 2008). Eine Hypothese, die aufgekommen ist, nachdem in Axonen von Cuprizon-behandelten Mäusen eine immense Vergrößerung von Mitochondrien festgestellt wurde (Suzuki, 1969), geht davon aus, dass der Kupferentzug eine Schädigung von Mitochondrien der Oligodendrozyten verursacht. Die Entstehung dieser sogenannten „Megamitochondrien“ (Wagner and Rafael, 1977) geht mit vermehrter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien einher, die möglicherweise durch Beeinträchtigung der Atmungskette und Störung daran beteiligten Enzyme und Cofaktoren begünstigt wird (Flatmark et al., 1980; Hoppel and Tandler, 1973; Praet et al., 2014). Hinzu kommt eine Vergrößerung des Endoplasmatischen Retikulums (Hemm et al.,

1971) mit Beeinträchtigung der Protein- und Lipidbiosynthese (Goldberg et al., 2013; Praet et al., 2014). Oligodendrozyten erbringen hohe Syntheseleistungen für ständige Myelinumbauprozesse, die einerseits Energie in Form von ATP und andererseits Proteine und Lipide als Membranbausteine benötigen. Vermutlich wird die Apoptose dieser Zellen letztendlich durch eine Kombination aus Energiedefizit, insuffizienter Protein- und Lipidsynthese und direkter Zellzerstörung durch oxidativen Stress hervorgerufen (Praet et al., 2014; Zendedel et al., 2013). Erstaunlich ist hierbei, dass Oligodendrozyten-Progenitor-Zellen (OPC), die anfälliger für ROS sind, nicht absterben (Butts et al., 2008). Im häufigsten verwendeten Versuchsaufbau, der in ähnlicher Form auch von uns benutzt und von Hiremath et al. 1998 initiiert wurde, werden 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse 6 Wochen lang (in unserem Modell 20 Tage) einer 0,2%-igen CPZ-Diät unterzogen, was zunächst zur Demyelinisierung und nach Futterumstellung auf Standardfutter zur spontanen Remission mit Remyelinisierung führt (Hiremath et al., 1998). Eine Ausdehnung der diätetischen Fütterung auf einen Zeitraum von mindestens 12 Wochen zieht eine chronische Demyelinisierung mit nur mangelhafter Remyelinisierung nach sich (Matsushima and Morell, 2001). Aufgrund dieser Erkenntnisse war die Erforschung von akuter beziehungsweise chronischer Demyelinisierung und Remyelinisierung mit einfachen Versuchsbedingungen, geringer klinischer Symptomatik der Tiere und guter Reproduzierbarkeit verbunden (Praet et al., 2014; Zendedel et al., 2013). Der komplexe Prozess der Remyelinisierung beginnt mit der Proliferation von Oligodendrozyten-Progenitor-Zellen. Diese wandern zu den demyelinisierten Arealen, differenzieren sich zu Oligodendrozyten und umwickeln die entmarkten Axone mit der Myelinmembran („axonwrapping“, (Zendedel et al., 2013)) (Franklin and Ffrench-Constant, 2008). Bevor dieser Vorgang ablaufen kann, kommt es vermutlich zum Einwandern von Makrophagen und Mikrogliazellen, die Zelldetritus und abgestorbene Oligodendrozyten phagozytieren und somit die Voraussetzung für eine Ansiedlung neu differenzierter Oligodendrozyten schaffen (Voss et al., 2012). Dies bedeutet, dass eine Remyelinisierung nur nach zuvor erfolgter Immunreaktion stattfinden kann. Die Rolle, die T-Lymphozyten hierbei spielen, ist bisher nicht verstanden. Einerseits wird davon ausgegangen, dass Lymphozyten nicht zur Pathogenese des CPZ-Modells beitragen (Hiremath et al., 2008), was unter anderem dadurch erklärt wird, dass das Kupfer-abhängige und für die Proliferation von aktivierten T-Zellen notwendige Zytokin IL-2 in zu geringer Menge vorhanden ist (Matsushima and Morell, 2001). Andererseits haben Mana et al. autoimmune T-Zellen in mit Cuprizon behandelten Mäusen gefunden, die in vitro nach Kontakt mit Myelinproteinen eine vermehrte Ausschüttung von IL-10 zeigten (Mana et al.,

2009). Beim Cuprizon-Modell gibt es im Gegensatz zu immunologischen Modellen, wie der MOG-induzierten EAE, kein Scoring-System, da die Mäuse hier keine einheitliche Klinik ausbilden. Die Symptomatik ist von mehreren Faktoren abhängig, wie beispielsweise der Lokalisation der Demyelinisierung, wobei die Mäuse unter anderem motorische und koordinative Defizite, Verhaltensauffälligkeiten, Gewichtsverlust oder einen Hydrozephalus zeigen (Praet et al., 2014). Obwohl die Pathogenese der Multiplen Sklerose sich von der des Cuprizon-Modells unterscheidet, ist das Toxin-vermittelte Modell bestens geeignet, um die De- und Remyelinisierung verständlicher zu machen, um möglicherweise neue therapeutische Ansätze für die menschliche Erkrankung zu etablieren, die nicht an immunologischen Prozessen ansetzen (Procaccini et al., 2015). Durch die zusätzliche Anwendung des CPZ-Modells konnten beispielsweise Deshmukh et al. zeigen, dass eine signifikante Senkung des klinischen Score-Werts im EAE-Modell weniger auf einer immunsuppressiven Wirkung des Medikaments und viel mehr auf einer Beeinflussung von Remyelinisierungs-Vorgängen beruhte (Deshmukh et al., 2013).

2.3 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) stellt ein immunologisches Tiermodell der Multiplen Sklerose dar. Durch subkutane Immunisierung des Tiers mit bestimmten Bestandteilen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) oder proteolipid protein (PLP), oder durch den Transfer antigenspezifischer T-Zellen (Ben-Nun et al., 1981) beginnt nach einer Latenzphase ein inflammatorischer Prozess, der zur Schädigung neuronaler Myelinscheiden, zur sogenannten Demyelinisierung, und der damit verbundenen Symptomatik führt (Gold et al., 2006).

Das EAE-Modell ist das am häufigsten verwendete immunologische Tiermodell in der Forschung zur Pathogenese der Multiplen Sklerose, bei dem eine Immunisierung der Tiere mit ZNS-Antigenen eine autoimmun-vermittelte Erkrankung des ZNS auslöst (Procaccini et al., 2015). Erstmals wurde ein solches Modell 1933 beschrieben. Rivers et al. impften hierbei wiederholt Rhesusaffen mit ZNS-Gewebe von Kaninchen, was nach einer Vielzahl von Injektionen zu demyelinisierenden Schädigungen im zentralen Nervensystem der Primaten führte (Rivers et al., 1933). Verbessert wurde die Technik durch die Kombination der Antigeninjektion mit complete Freund's adjuvant (CFA) (Kabat et al., 1951) und später zusätzlich durch eine Booster-Injektion mit Pertussis-Toxin (PTX) (Munoz and Mackay,

1984), wodurch mittlerweile eine einzelne Injektion ausreicht, um die gewünschte Immunreaktion bei dem Versuchstier hervorzurufen (Gold et al., 2006).

Die so injizierten Antigene werden von APC aufgenommen, prozessiert und in lokalen Lymphknoten über MHC-II-Moleküle CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert. Nachdem die T-Zelle mit ihrem T-Zellrezeptor (TCR) an das präsentierte Antigen gebunden hat, schüttet die APC eine Vielzahl an Mediatoren aus, darunter IL-12 und IL-23 (Cua et al., 2003), was zur Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der T-Zelle führt. Die so entstandenen IFN- γ sezernierenden CD4⁺ Th1- (Hofstetter et al., 2005) und IL-17 produzierenden Th17-Zellen (Murphy and Stockinger, 2010) wandern ausgehend von dem sekundär lymphatischen Organ durch den ganzen Körper des Tieres, aufgrund ihrer Aktivierung auch durch die Bluthirnschranke (BBB) ins ZNS, wo sie auf ihr spezifisches Antigen treffen (Kuerten and Lehmann, 2011; Targoni et al., 2001). Nach Antigenkontakt setzt die T-Zelle ihre humoralen Botenstoffe frei und löst eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Spät-Typ aus. Eine lokale Inflammation mit Infiltration von Makrophagen und unspezifischen T-Zellen, die wiederum eine Flut an Zytokinen und Sauerstoffradikalen ausschütten, bewirkt schließlich die Zerstörung der umliegenden Myelinscheide (Kuerten and Lehmann, 2011). Aufgrund noch nicht verstandener Mechanismen kommt es nach einiger Zeit zum Abklingen der Entzündung. Wenn die Nervenzelle mit ihrem demyelinisierten Axon und der zugehörige Oligodendrozyt zu diesem Zeitpunkt noch intakt sind, beginnen ein Prozess der Remyelinisierung und ein Rückgang der Symptomatik. Nichtsdestotrotz enden die dauerhaften Entzündungsvorgänge im ZNS in irreversibler Gewebeschädigung (Kuerten and Lehmann, 2011; Trapp et al., 1998). Wie auch die Multiple Sklerose beim Menschen kann die EAE unterschiedliche Verlaufsformen annehmen; hierbei spiegelt sich die Methodik der EAE-Induktion aufgrund Verwendung verschiedener Induktionsagenzien und Tierstämme in heterogener Klinik der Tiere wider. So verläuft eine mit MOG₃₅₋₅₅ induzierte EAE bei C57BL/6 Mäusen chronisch-progredient (Mendel et al., 1995), während eine Immunisierung von SJL/J Mäusen mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ zu einer relapsing-remitting EAE führt (Whitham et al., 1991). Im Unterschied zur sehr heterogenen Klinik der menschlichen MS bildet sich in diesem Mausmodell eine typische Symptomatik des Bewegungsapparates aus, die mit motorischen Ausfällen der Schwanzmuskulatur beginnt, über die untere Extremität bis hin zu den Vorderläufen aufsteigt und schließlich zu einer vollständigen Tetraplegie des Tieres führt. Gerade der Einsatz transgener Mäuse ermöglicht die Erforschung einzelner molekularer Mechanismen, die an der Krankheitsentstehung beteiligt sind (Rangachari and Kuchroo, 2013). Ein Kritikpunkt an der MOG-induzierten EAE bei Mäusen hingegen besteht darin, dass die Schädigungen weniger

durch Demyelinisierung, sondern größtenteils durch direkte Gewebeerstörung, auch von Nervenzellen, hervorgerufen wird (Gold et al., 2006).

Die meisten EAE-Modelle basieren auf dem oben beschriebenen Mechanismus antigenspezifischer $CD4^+$ T-Helferzellen, die entweder durch Immunisierung induziert oder direkt transferiert werden. Da in entzündlichen Läsionen von MS-Patienten vermehrt $CD8^+$ T-Zellen entdeckt wurden (Jacobsen et al., 2002; Monteiro et al., 1995; Woodroffe et al., 1986), sind seit Anfang der 2000er Jahre EAE-Modelle aufgekommen, die auf einer durch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen hervorgerufenen Pathogenese beruhen, beispielsweise durch den Transfer MOG-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen (Sun et al., 2001) und MBP-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen (Huseby et al., 2001). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die ausgebildete Symptomatik der Mäuse nicht nur von der durch die $CD4^+$ T-Helferzellen hervorgerufenen unterschied, sondern sogar größere Ähnlichkeit (Salou et al., 2015) zur menschlichen MS-Symptomatik aufwies (Huseby et al., 2001; Na et al., 2008; Saxena et al., 2008). Obwohl diese Ergebnisse starke Indizien für eine zentrale Rolle der $CD8^+$ Zellen in der Proinflammation darstellen, gibt es andererseits auch Beweise dafür, dass sie die Immunreaktion bremsen und den Krankheitsverlauf der EAE verbessern (York et al., 2010). Ortega et al. beispielsweise konnten zeigen, dass regulatorische $CD8^+$ T-Zellen eine direkte Zerstörung pathogener $CD4^+$ T-Helferzellen bewirken (Ortega et al., 2013). Wie genau diese regulatorischen Mechanismen ablaufen ist bisher noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand derzeitiger Forschung.

Eine weitere T-Zell-Unterart, die an der Entstehung der autoimmunen Entzündungsvorgänge beteiligt ist, stellt die $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zelle (Treg) dar. Einerseits schützten in Mäuse transferierte Tregs diese vor einer klinischen Manifestation der EAE (Kohm et al., 2002), während auf der anderen Seite eine anti-CD25-Antikörper-Gabe vor der Induktion diesen Schutz verminderte (Reddy et al., 2004). FoxP3 (forkhead box protein P3) stellt hierbei einen für die Treg-Entwicklung entscheidenden Transkriptionsfaktor dar, dessen Verlust mit schwerer Immundefizienz, sowohl bei der Maus als auch beim Menschen, einhergeht (Zozulya and Wiendl, 2008). Zusätzlich führte eine Verminderung von Tregs zu vermehrter Ausschüttung Autoimmunreaktion-begünstigender Zytokine wie IL-17 und IFN- γ (O'Connor and Anderton, 2008; Reddy et al., 2005). Diese Erkenntnisse können ein Hinweis darauf sein, dass Tregs einen entscheidenden Einfluss darauf nehmen, ob sich überhaupt eine autoimmune Erkrankung ausbildet (O'Connor and Anderton, 2008), in dem sie möglicherweise die Interaktion zwischen Antigenpräsentierender Zelle (Dendritischer Zelle) und naiver T-Zelle im sekundär lymphatischen Organ stören und die Möglichkeit der Krankheitsentstehung

mindern (Tadokoro et al., 2006) oder durch Zytokinausschüttung (u.a. IL-10) die Aktivität pathogener T-Zellen direkt inhibieren (Zozulya and Wiendl, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen, die IL-10 produzieren, vor allem während der Remissionsphase im ZNS vorkommen, was nahelegt, dass Tregs, und hier auch IL-10, mitverantwortlich für den Symptomverlauf der EAE sind (McGeachy et al., 2005).

2.4 Pannexin und Probenecid

Pannexin, hier speziell Pannexin1 (Panx1), ist ein im menschlichen Körper fast ubiquitär vorkommendes Glykoprotein, das wenig selektive Kanäle in Zellmembranen bildet. Diese Kanäle lassen eine transmembranäre Passage zellulärer und extrazellulärer Substanzen, wie Anionen, Kationen und auch Adenosintriphosphat (ATP), zu (Dahl and Keane, 2012). Pannexin-Kanäle wurden erstmal im Jahr 2000 beschrieben, als Panchin et al. nach Innexinen, Gap Junction-bildenden, nur in wirbellosen Tieren vorkommenden Proteinen, in Wirbeltieren suchten. Aufgrund ihrer strukturellen Homologie zu Connexinen und der Sequenzhomologie zu Innexinen wurden diese neu entdeckten Kanalproteine, die den Namen „Pannexine“ erhielten, als neue Art von Gap Junction-Proteinen bezeichnet (Panchin et al., 2000). Im Unterschied zu Gap Junctions jedoch, die jeweils aus zwei Hemikanälen, sogenannten Connexonen aus je sechs Connexinen, zusammengesetzt sind und interzelluläre Austausch-Verbindungen bilden, gibt es bisher keine Anhaltspunkte dafür, dass Pannexine physiologisch interzelluläre Kanäle bilden oder eine vergleichbare Funktion erfüllen (Dahl and Locovei, 2006). Vielmehr schaffen sie ausschließlich eine Verbindung zwischen Zytoplasma und Extrazellularraum (Dahl and Locovei, 2006; Dahl and Keane, 2012). Die Offenwahrscheinlichkeit eines Panx1-Kanals unterliegt verschiedenen Mechanismen: So führen beispielsweise mechanische Stimulation (Bao et al., 2004), ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Locovei et al., 2006b), ein Abfall der extrazellulären Sauerstoffkonzentration (Locovei et al., 2006a) und auch ein ATP-vermittelter Mechanismus zur Aktivierung des Kanals. Die Aktivierung durch ATP erfolgt hierbei durch die Interaktion purinerges metabotroper P2Y- (Locovei et al., 2006b) und ionotroper P2X7-Rezeptoren (P2X7R) mit dem Panx1-Kanal, wobei davon ausgegangen wird, dass eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem nicht selektiven Kationenkanal P2X7 und dem Panx1-Kanal besteht (Dahl and Keane, 2012; Locovei et al., 2007). Schon vor Entdeckung des Panx1 und dessen Auftreten mit dem P2X7R wurde eine Beteiligung des P2X7R an der angeborenen Immunantwort postuliert, als Ferrari et al. eine ATP induzierte, P2X7R-vermittelte IL-1 β Freisetzung in menschlichen Makrophagen feststellten (Ferrari et al., 1997;

Pelegrin and Surprenant, 2006), wobei aber auch die Inhibition von Panx1 die IL-1 β Freisetzung aufhebt (Pelegrin and Surprenant, 2006). IL-1 β ist ein von Makrophagen sezerniertes pyrogenes Zytokin, das lokale und systemische Entzündungsvorgänge auslöst und somit einen Teil des angeborenen Immunsystems darstellt (Dinarello, 1998; Martinon et al., 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ATP einerseits über den P2X7R, ähnlich wie bei der Glutamat-induzierten AMPA- oder Kainat-Rezeptoraktivierung (Alberdi et al., 2002), einen Kalziumeinstrom in Oligodendrozyten und somit deren Zelltod auslöst und dass andererseits eine P2X7R-Blockade Demyelinisierungsprozesse vermindert und eine Besserung der klinischen EAE-Symptomatik bewirkt (Matute et al., 2007). Ein weiterer Mechanismus, der zum Zelluntergang im ZNS führt, ist die ATP-induzierte Inflammasom-Aktivierung über den P2X7R und den Panx1-Kanal (Silverman et al., 2009). Das Inflammasom stellt, als Teil des angeborenen Immunsystems, einen Multiproteinkomplex dar, dessen Kaskade in einer Aktivierung von Caspase-1 mündet. Diese bewirkt im letzten Schritt die IL-1 β -Aktivierung und Freisetzung, wodurch letztendlich eine Entzündungsreaktion und Zellerstörung ausgelöst wird (Martinon et al., 2002). Hierbei bindet wahrscheinlich extrazelluläres ATP an den P2X7R, was eine durch direkte Protein-Protein-Interaktion ausgelöste Öffnung des Panx1-Kanals bewirkt. Durch den offenen Kanal strömt intrazelluläres ATP nach extrazellulär und kann somit wiederum an den P2X7R binden, um das Signal autokrin zu verstärken (Dahl and Keane, 2012). Dahl und Keane sehen in diesem „Mechanismus der ATP-Signalverstärkung“ die eigentliche Bedeutung des Panx1-Kanals an der Inflammasom-Aktivierung. Steigt die extrazelluläre ATP-Konzentration über einen Schwellenwert an, so kommt es über einen negativen Rückkopplungsmechanismus zum Schließen des Panx1-Kanals (Qiu and Dahl, 2009), was eine überschießende Aktivierung und sekundäre Gewebeschädigung verhindert (Dahl and Keane, 2012). Diese sekundäre Gewebeschädigung ist Folge des primären Zelluntergangs, der wiederum direkt durch eine traumatische Verletzung, beispielsweise eine Blutung, entsteht (Mautes et al., 2000). Dies bedeutet, dass nicht nur Zellen im Gebiet der Verletzung zugrunde gehen, sondern auch zunächst nicht beteiligte in deren Umgebung. Hierfür könnte die P2X7R- und Panx1-Kanal-vermittelte Inflammasomaktivierung mitverantwortlich sein (Dahl and Keane, 2012), da untergehende Zellen P2X7R-aktivierende Substanzen, wie ATP (Adamson and Leitinger, 2014), freisetzen und Panx1-Kanäle auch direkt, beispielsweise durch niedrige Sauerstoffkonzentrationen, geöffnet werden. Diese Aktivierung ist so massiv, dass möglicherweise der negative Rückkopplungsmechanismus versagt und eine überschießende Aktivierung vermehrte Zellschädigung bewirkt (Dahl and Keane, 2012). Dieser vermehrte

Zelluntergang wurde auch bei murinen T-Zellen beobachtet, nachdem sie mit ATP behandelt wurden. Hierbei führte eine zuvor erfolgte Blockade der Panx1-Kanäle durch Probenecid zu einer Reduktion des T-Zelluntergangs (Shoji et al., 2014). Daher ist Panx1 nicht nur an der angeborenen Immunantwort, sondern auch an der erworbenen, und hier vor allem an der T-Zell-vermittelten Immunantwort, beteiligt (Adamson and Leitinger, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass von aktivierten T-Zellen durch Panx1-Kanäle freigesetztes ATP purinerge P2X-Rezeptoren aktiviert (Schenk et al., 2008) und somit über P2X7-Rezeptoren möglicherweise autokrin der Signalverstärkung und parakrin der T-Zellaktivierung in der Umgebung dient (Yip et al., 2009). Darüber hinaus hatte eine Blockade der Panx1-Kanäle in menschlichen und murinen T-Zellen eine Inhibition der IL-2-Transkription, ein für die lymphozytäre Proliferation und Differenzierung notwendiges Zytokin, zur Folge (Woehrle et al., 2010). Panx1-Kanäle, auch im Zusammenhang mit P2X7R und ATP, sind sowohl an der Immunantwort, als auch direkt an Zellschädigungsmechanismen beteiligt. Die Beeinflussung dieses Proteins hat in Mausmodellen bereits Erfolge gezeigt, beispielsweise konnten Hainz et al. zeigen, dass die Behandlung mit dem Panx1-Inhibitor Probenecid bei EAE-Mäusen eine verminderte klinische Symptomatik im Vergleich zu nicht-behandelten EAE-Mäusen verursachte (Hainz et al., 2016).

Probenecid (PBN; 4-Dipropylsulfamoylbenzoesäure) ist ein Medikament, das ursprünglich hergestellt wurde, um die renale Penicillin-Ausscheidung zu reduzieren und somit dessen Plasmaspiegel zu erhöhen (Robbins et al., 2012). In den proximalen Tubuluszellen der Niere hemmt PBN den organischen Anionen-Transporter (OAT), der für die Wiederaufnahme verschiedener in der Niere frei filtrierter Anionen, darunter auch Penicillin und Harnsäure, nötig ist (Roch-Ramel and Guisan, 1999). Diese Eigenschaft des PBNs ist auch der Grund dafür, dass es heute teilweise noch, wenn auch nicht als Mittel der Wahl, in der Gichttherapie zur Anwendung kommt. Silverman et al. haben herausgefunden, dass PBN auch Pannexin-Kanäle blockiert und somit möglicherweise bei Gichtpatienten nicht nur durch erhöhte Harnsäureausscheidung, sondern auch durch Verminderung von Entzündungsvorgängen zur Symptomlinderung beiträgt (Silverman et al., 2008). Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf den Panx1-Kanal, dessen Beteiligung an angeborener und erworbener Immunantwort, der langjährigen Erfahrung mit dem Medikament PBN und der geringen Nebenwirkungsrate, könnte die Blockade des Panx1-Kanals durch das Medikament PBN eine Möglichkeit darstellen inflammatorische Vorgänge therapeutisch zu mindern (Dahl and Keane, 2012). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass PBN auch eine Pannexin-unabhängige, direkte Inhibition von P2X7R hervorruft (Bhaskaracharya et al., 2014).

2.5 Hypothesen

2.5.1 Cuprizon-Modell

Hypothese 1.1: Eine Therapie mit Probenecid im Cuprizon-Modell führt zu Veränderungen von T-Zellpopulationen in der Milz und im Blut.

Hypothese 1.2: Eine Therapie mit Probenecid im Cuprizon-Modell führt zu einer verminderten Demyelinisierung des optischen Nerven. In diesem Modell wurden bisher keine ultrastrukturellen Untersuchungen durchgeführt, daher liegt der Schwerpunkt der Untersuchung des toxischen Cuprizon-Modells in der Elektronenmikroskopie.

2.5.2 EAE-Modell

Hypothese 2.1: Eine Therapie mit Probenecid im EAE-Modell verringert die klinische Symptomatik der Versuchstiere.

Hypothese 2.2: Eine Therapie mit Probenecid im EAE-Modell führt ebenfalls zu Veränderungen von T-Zellpopulationen in der Milz und im Blut.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien und Geräte

Tab. 3-1: Materialliste

Material	Firma
0,2% Cuprizon-Futter	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
anti- mouse CD25 0,2 mg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Anti-CNPase Antikörper	abcam®, Cambridge, UK
Anti-MBP Antikörper	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
APC anti-mouse CD4	BioLegend, San Diego, USA
BD Facsflow Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Benzyl dimethylamine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bleinitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CD3 0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, USA
CD4 0,2 mg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser Ø 12mm	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
DEPEX mounting medium	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Diaminobenzidin-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Doderyl Succinic Anhydride	Science Services GmbH, München, Deutschland
Eisessig (Essigsäure)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
EM bed-812 Einbettmedium	Science Services GmbH, München, Deutschland
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Erythrozytenlysepuffer	
Ethanol	Zentrales Chemikalienlager der UdS
FOX P3 0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Fresubin Trinknahrung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Hämatoxilin (nach Ehrlich)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Heparin-Natrium 5.000 i.E./ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Hooke Kit™ MOG35-55/CFA Emulsion PTX	Hooke Laboratories, Inc., Lawrence, USA
Horse radish Peroxidase Antikörper	BioLegend, San Diego, USA
IFN-γ 0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, USA
IL-10 0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, USA

Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Isofluran Verdampfer	Harvard Instruments, Massachusetts, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Grüssing, Filsum, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Ketavet (100mg/ml)	Pfizer, Berlin, Deutschland
Kresylviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfer Grid 1.2 Schlitznetze	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lithium-Carbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Luxol-Fast-Blue (LFB)	ARCOS Organics, Nidderau, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methylbenzoat	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Methylenblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Monensin	BioLegend, San Diego, USA
Mononatriumzitatdihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nadic Methyl Anhydride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaOH Suprapurum	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Natriumcacodylat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl, 0,9%)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Natrium-Zitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Normales Ziegenserum (NGS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Parafilmpapier	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Pioloform	Kuraray Europe GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Probenecid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Propylenglykolmonomethyletheracetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Rinderserumalbumin-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rompun (2%)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Roti-Histokitt Eindeckmedium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotihistol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Plast (Paraffin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Standardnagerfutter	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Streckblättchen	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Europe, Staufen, Deutschland

Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau	Appllichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Acros organics, Geel, Belgien
Xylol	Zentrales Chemikalienlager der UdS
Zellsieb (70 µm)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zitronensäuremonohydrat	Zentrales Chemikalienlager der UdS

Tab. 3-2: Geräteliste

Geräte	Firma
BD FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bench: Hera Safe KS	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Diamantmesser	DiATOME, Hatfield, USA
Inkubator: HERAcell 150i	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Kamera (ORCA-D2)	Visitron Systems, Puchheim
Kamera Olympus MegaView III	Olympus, Hamburg, Deutschland
Leica EM UC7 Ultramikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
LUNA-II™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Westburg, Belgien
Mikroskop Zeiss Apotome 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop: PrimoVert	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2025	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo, Zwingenberg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop FEI Tecnai G2	FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Biofuge Primo R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge Fresco 17	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge: Megafuge 16R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

3.2 Versuchstiere des CPZ-Modells

3.2.1 Haltung der CPZ-Tiere

Im toxischen Modell der Multiplen Sklerose verursacht die Verabreichung von Cuprizon eine Demyelinisierung im ZNS der Mäuse. Für die Versuche im Cuprizon-Modell wurden acht Wochen alte, männliche Mäuse des Stammes C57BL/6J aus Eigenzucht verwendet. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% in der Tierhaltung am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes) in Homburg. Die Tiere bekamen Standardnagerfutter der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, welchem 0,2% Cuprizon (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) beigemischt war. Das Futter wurde bei 4-6°C gelagert und täglich frisch in die Mausekäfige gelegt. Trinkwasser war zu jeder Zeit verfügbar. Der Umgang mit den Tieren, die Haltung und die Versuchsdurchführung entsprachen den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden vom zuständigen Referat des saarländischen Ministeriums für Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt. Die Cuprizon-Versuche wurden von Frau Dr. rer. nat. Nadine Hainz (Abteilung Frau Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier) durchgeführt.

3.2.2 Einteilung der Versuchsgruppen des CPZ-Modells

Die Mäuse wurden in 4 Gruppen eingeteilt. Als Therapiegruppe des CPZ-Modells diente die Gruppe CPZ/PBN (n=12): C57BL/6J-Mäuse, die zehn Tage die Cuprizondiät erhielten und weitere zehn Tage Cuprizon-Diät mit täglicher intraperitonealer Injektion von 100mg Probenecid pro kg Körpergewicht. Die anderen Gruppen waren die Gruppe Standardfutter (n=6): C57BL/6J-Tiere, die zwanzig Tage Standardfutter erhielten, die Gruppe CPZ/solvent (n=10): C57BL/6J-Tiere, die zehn Tage Cuprizon-Diät erhielten und weitere zehn Tage Cuprizon-Diät mit täglicher intraperitonealer Solvent-Injektion und die Gruppe CPZ/CPZ (n=11): C57BL/6J-Tiere mit zwanzig Tagen Cuprizon-Diät.

Tab. 3-3: Einteilung der CPZ-Tiere nach Versuchsgruppen

Gruppe	Behandlung	n
CPZ/CPZ	20 d CPZ	11
CPZ/solvent	10 d CPZ + 10 d CPZ und Solvent	10
CPZ/PBN	10 d CPZ + 10 d CPZ und PBN	12
Standardfutter	20 d Standardfutter	6

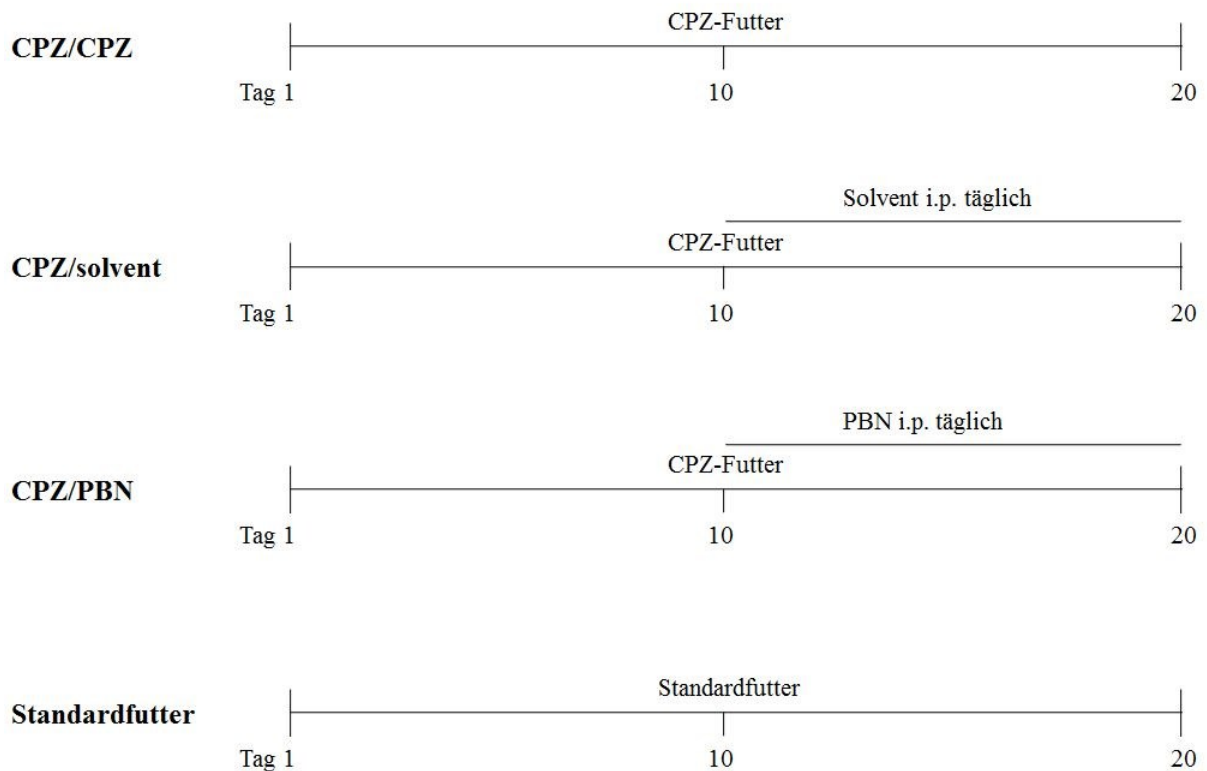


Abb. 3-1. Versuchsgruppen des CPZ-Modells

3.2.3 Probenecid-Behandlung

Die Mäuse erhielten eine Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht Probenecid pro Behandlungstag. Zur Herstellung von 5 ml Probenecid-Lösung wurden 50 mg PBN (w/v) in 150 µl 2 N NaOH (v/v), 850 µl 1M Tris, 4 ml NaCl in 0,9% NaCl in dest. H₂O und 12,5 µl 2 N HCl gelöst. Das Solvent hatte die gleiche Zusammensetzung ohne Probenecid.

3.3 Versuchstiere des EAE-Modells

3.3.1 Haltung der EAE-Tiere

Im inflammatorischen EAE-Modell der Multiplen Sklerose entwickeln die Mäuse nach Immunisierung motorische Defizite, die täglich anhand eines Scores (s.u.) erfasst wurden. Hierzu wurden auch täglich der Gesundheitszustand und das Gewicht der Mäuse kontrolliert. Für die EAE-Versuche wurden weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6J von Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die 11 bis 12 Wochen alten Tiere wurden in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% in der Tierhaltung am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes) in Homburg gehalten. Standardfutter und Trinkwasser war ständig verfügbar. Nachdem die Tiere erste Symptome zeigten, wurde zusätzlich Futter und Wasser, auch in Form hochkalorischer Fresubin-Trinknahrung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH), in Bodennähe bereitgestellt. Der Umgang mit den Tieren, die Haltung und die Versuchsdurchführung entsprachen den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden vom zuständigen Referat des saarländischen Ministeriums für Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt. Die EAE-Versuche wurden von Frau Dr. rer. nat. Nadine Hainz (Abteilung Frau Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier) durchgeführt.

3.3.2 Einteilung der Versuchsgruppen des EAE-Modells

3.2.2.1 Versuchsgruppen des EAE 100 mg Probenecid Versuchs

Im EAE 100 mg Probenecid Versuch waren 3 Gruppen vorgesehen. Bei allen Tieren wurde eine EAE, wie unten beschrieben, induziert. Die klinische Symptomatik jedes Tieres wurde ab dem ersten Tag täglich beurteilt und bei Erreichen eines Score-Wertes von mindestens 1,0 an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, wurde bei dem entsprechenden Tier, je nach Gruppenzugehörigkeit, eine tägliche intraperitoneale Injektion mit 100 mg/kg KG Probenecid (Gruppe EAE/PBN, n=7) oder Solvent (Gruppe EAE/solvent, n=9) für 14 Tage durchgeführt. Die Tiere der Gruppe EAE (n=4) erhielten keine Therapie. Auch hier entsprach die Zusammensetzung der PBN-Lösung und des Solvents zur intraperitonealen Injektion der des CPZ-Modells.

Tab. 3-4: Einteilung der EAE-Tiere des EAE 100mg Probenecid Versuchs nach Versuchsgruppen

Gruppe	Immunisierung	Therapie	n
EAE	Hooke Kit™ MOG ₃₅₋₅₅	keine	4
EAE/solvent	Hooke Kit™ MOG ₃₅₋₅₅	Solvent	9
EAE/PBN	Hooke Kit™ MOG ₃₅₋₅₅	Probenecid	7

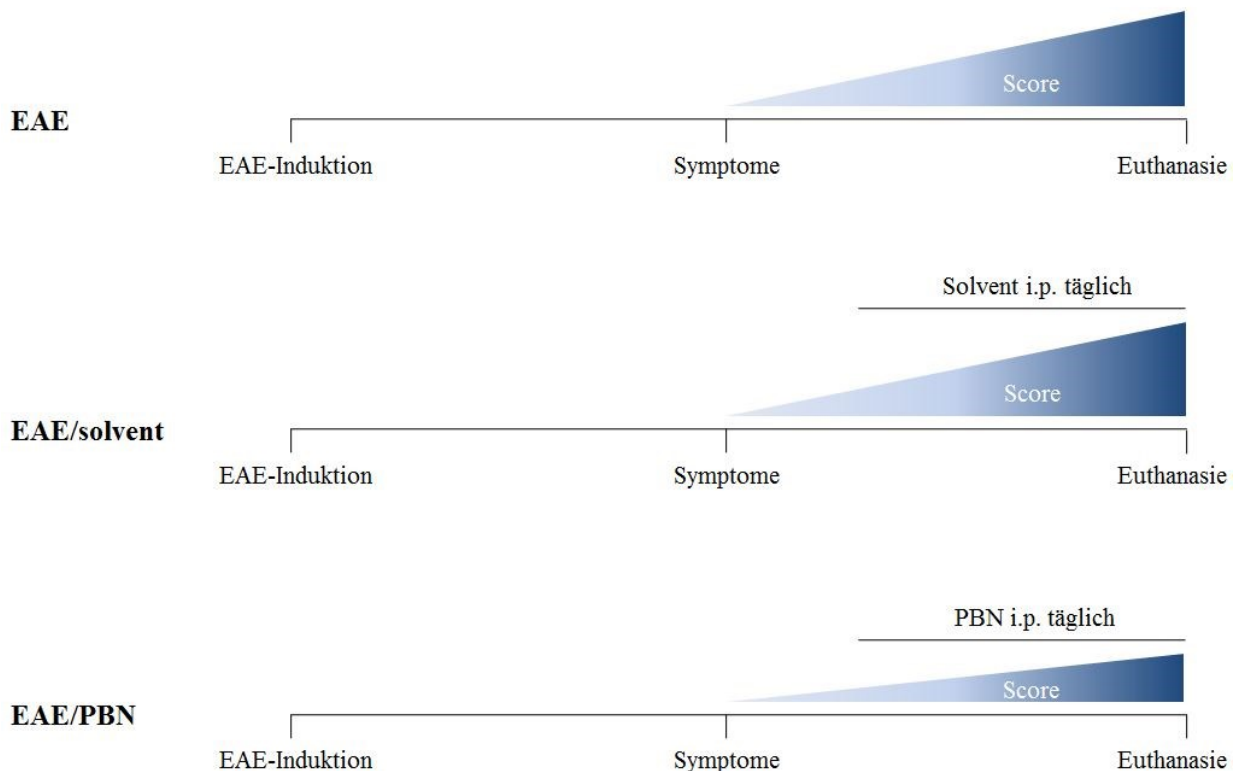


Abb. 3-2. Schematische Darstellung der Gruppe EAE des therapeutischen EAE-Ansatzes

3.2.2.2 Versuchsgruppen des EAE 250 mg Probenecid Versuchs

Im EAE 250mg Probenecid Versuch waren 4 Gruppen vorgesehen. Bei allen Tieren der Gruppen EAE, EAE/solvent und EAE/PBN wurde eine EAE, wie unten beschrieben induziert, die Kontroll-Gruppe erhielt weder eine Immunisierung noch eine Behandlung. Die klinische Symptomatik jedes Tieres wurde ab dem ersten Tag täglich beurteilt und bei Erreichen eines Score-Wertes von 2,0 wurde bei dem entsprechenden Tier, je nach Gruppenzugehörigkeit, eine tägliche intraperitoneale Injektion mit 250 mg/kg KG Probenecid (Gruppe EAE/PBN, n=9) oder Solvent (Gruppe EAE/solvent, n=10) für 20 Tage durchgeführt. Die Tiere der Gruppe EAE (n=6) erhielten keine Therapie. Auch hier entsprach die Zusammensetzung der PBN-Lösung und des Solvents zur intraperitonealen Injektion der des CPZ-Modells.

Tab. 3-5: Einteilung der EAE-Tiere des EAE 250mg Probenecid Versuchs nach Versuchsgruppen

Gruppe	Immunisierung	Therapie	n
EAE	Hooke Kit™ MOG ₃₅₋₅₅	keine	6
EAE/solvent	Hooke Kit™ MOG ₃₅₋₅₅	Solvent	10
EAE/PBN	Hooke Kit™ MOG ₃₅₋₅₅	Probenecid	9
Kontrolle	keine	keine	8

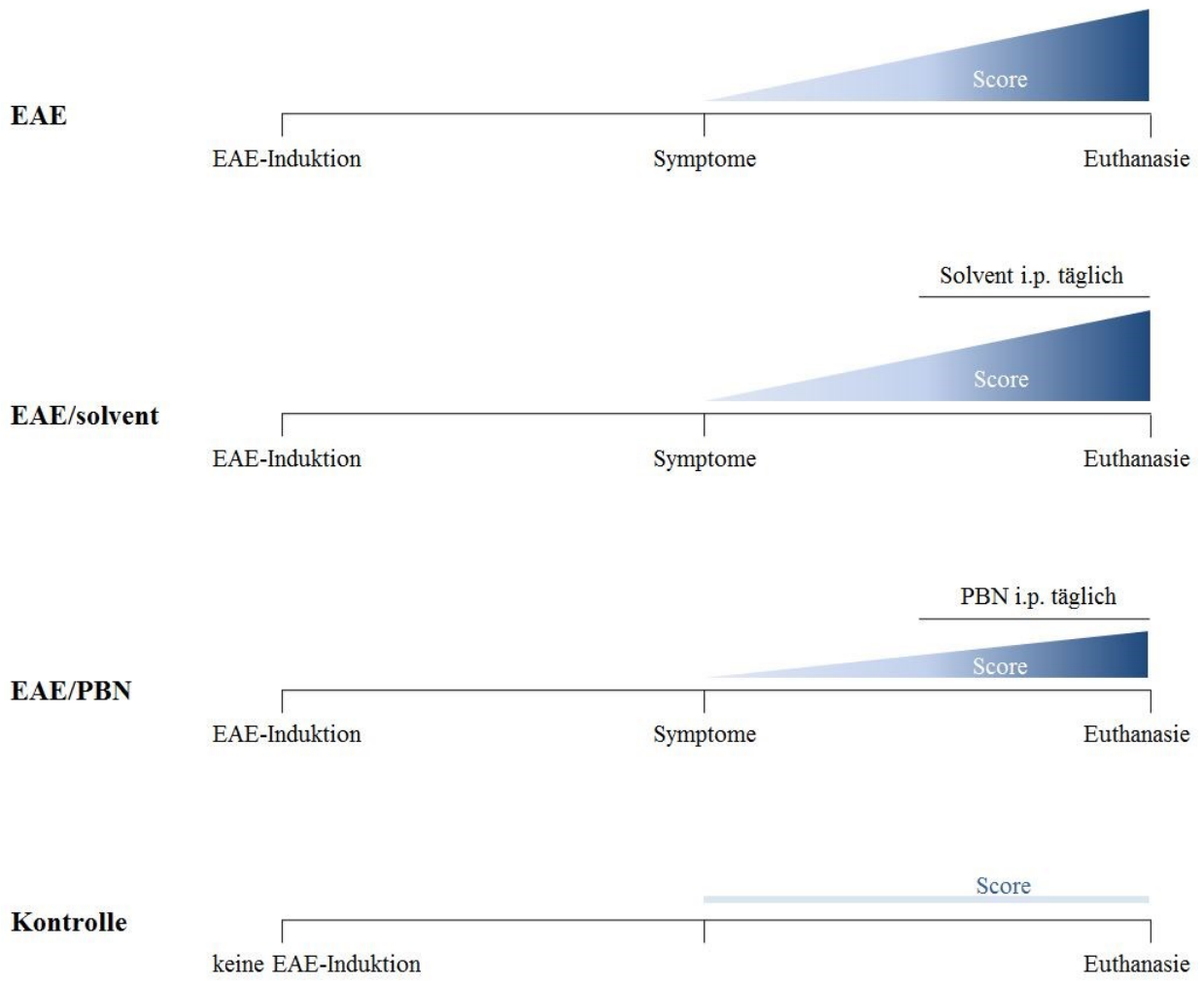


Abb. 3-3. Versuchsgruppen des EAE 250 mg Probenecid Versuchs

3.3.3 Induktion der EAE

Die Tiere wurden mindestens 7 Tage vor Versuchsbeginn in die Tierhaltung zur Akklimatisierung eingebracht. Zur Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis wurde das Hooke Kit™ MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion mit PTX (cat. no. EK-2110) (Hooke Laboratories, Inc., Lawrence, USA) verwendet. Das Kit enthält zum einen eine Emulsion aus MOG₃₅₋₅₅ und CFA (complete Freund's adjuvant), die bereits in 1ml Spritzen mit je 1mg MOG₃₅₋₅₅ abgefüllt ist, und zum anderen ein Injektionsfläschchen mit gefriergetrocknetem Pertussis-Toxin (PTX). Gemäß Herstellerangaben wurde die Immunisierung der Tiere durchgeführt. Die Immunisierung der Tiere fand in der Tierhaltung statt, um Transportstress zu vermeiden. Zunächst wurden die Tiere gewogen und anschließend mit einer Isofluran-Sauerstoff-Inhalationsnarkose (5% Isofluran in Sauerstoff) anästhesiert. Unter Narkose erfolgte dann die Injektion mit je 0,1 ml MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion subkutan in den oberen und unteren Rücken. So wurde jede Maus mit einer Gesamtdosis von 0,2 mg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Das gefriergetrocknete Pertussis-Toxin (PTX) wurde in 0,9% NaCl gelöst und bei 4-6°C gelagert. 4 h nach der Immunisierung erhielt jede Maus eine intraperitoneale 250 ng/kg KG PTX Injektion. Als Booster wurde die PTX-Injektion weitere 24 h später in gleicher Dosierung wiederholt.

3.3.4 EAE-Score

Die Tiere wurden täglich gewogen und ihre Symptomatik anhand des folgenden Scores eingeteilt:

Grad 0,0	keine Symptome
Grad 0,5	Lähmung (Parese) der Schwanzspitze
Grad 1,0	Parese des gesamten Schwanzes oder leichte Ataxie
Grad 1,5	Schwanzparese und leichte Schwäche der Hinterbeine
Grad 2,0	einseitige schwere Hinterbein-Parese oder mittelgradige Ataxie mit Gangunsicherheit
Grad 2,5	beidseitige schwere Hinterbein-Parese
Grad 3,0	komplette beidseitige Hinterbein-Parese
Grad 3,5	komplette beidseitige Hinterbein-Parese und Schwäche eines Vorderbeins oder schwere Ataxie mit dem Unvermögen zu laufen
Grad 4,0	Lähmung aller vier Extremitäten (Tetraplegie)
Grad 5,0	Tod

Bei Erreichen des Score-Werts 3,5 beziehungsweise bei einem Gewichtsverlust von über 20% des Körpergewichts vor der Immunisierung erfolgte ein vorzeitiges Ausscheiden des entsprechenden Tieres aus dem Versuch.

3.4 Durchflusszytometrische Methode

3.4.1 Organentnahme

Die Tiere wurden mit Hilfe einer intraperitonealen Ketavet/Rompun-Injektion (100 mg Ketaminhydrochlorid pro kg KG und 10 mg Xylazin pro kg KG) narkotisiert. Nachdem das Versuchstier keine Reaktion auf Reflexprüfung sowohl der oberen als auch der unteren Extremitäten zeigte, wurde es auf einer Präparationsplatte mit Nadeln fixiert, Thorax und Abdomen mit Ethanol benetzt und der Brustkorb eröffnet. Anschließend wurde mit einer Kanüle die Spitze des linken Ventrikels des noch schlagenden Herzens punktiert, um so zirka 0,5 ml Blut in einer heparinisierten Spritze aufzuziehen. Danach wurde der Situs der Maus eröffnet, die Milz freipräpariert und entnommen. Weiterhin wurden Gehirn und die optischen Nerven konserviert.

3.4.2 Milzpräparation

Um phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) herzustellen, wurden 100 g NaCl, 2,5 g KCl, 7,12 g Na₂HPO₄, 2 g H₂O und 2,5 g KH₂PO₄ in 800 ml Aqua bidest. gelöst, der pH wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung mit H₂O auf 1 Liter aufgefüllt.

Die Milz wurde in ein 50 ml Falcon mit 10 ml Nährmedium gegeben und bis zum folgenden Versuchsschritt auf Eis gelagert. Danach wurde sie in einer Petrischale mithilfe einer Schere mechanisch zerkleinert und mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße), das auf einem 50 ml Falcon auflag, gepresst. Das Sieb wurde mehrmals mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) nachgespült und das Falcon anschließend auf 30 ml mit PBS aufgefüllt.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde 5 min bei 250 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

3.4.3 Erythrozytenlyse

Das nach Zentrifugieren entstandene Zellpellet wurde in 5 ml Erythrozytenlysepuffer gelöst, die Suspension mehrmals resuspendiert und bei 20°C 15 min inkubiert.

Durch Zugabe von 10 ml PBS mit 0,2% BSA (Bovines Serumalbumin) wurde die Reaktion gestoppt und die Zellsuspension erneut durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert.

Anschließend wurde wiederum 5 min bei 250 g und 20°C zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Es erfolgte ein Waschschrift: Das Zellpellet wurde in 30 ml PBS gelöst, erneut 5 min bei 250 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das jetzt entstandene Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen, um die Zellzahl zu bestimmen.

3.4.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe des automatischen Cell Counters Luna II von Logos Biosystems (Westburg, Belgien). Die in 1 ml PBS gelöste Zellsuspension wurde 1:40 mit PBS vorverdünnt und danach mit 1:2 mit Trypanblau gefärbt, um intakte Zellen von toten Zellen unterscheiden zu können. Nach Befüllen der Cell Counter Slides berechnete der Luna II Cell Counter unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (hier $F=1:80$) automatisch die Zellzahl pro ml.

3.4.5 Antikörperfärbung

3.4.5.1 Färbung mit Oberflächenantikörpern

Um die Zellen mit den Antikörpern zu färben, wurde jeweils zu 10^6 Zellen 10 µl Antikörperlösung (CD3, CD4, CD25) in der jeweiligen, wie in der Tabelle angegebenen, Verdünnung hinzugegeben.

Daraufhin erfolgte eine 45-minütige Inkubation im Dunkeln bei 20°C. Nach der Inkubation wurde die Suspension zweimalig mit 500 µl PBS gewaschen und jeweils 5 min bei 20°C mit 400 g zentrifugiert. Das nach dem zweiten Waschschrift entstandene Zellpellet wurde in 300 µl FACSflow-Flüssigkeit aufgenommen, um im darauffolgenden Schritt gemessen zu werden.

3.4.5.2 Färbung mit intrazellulären Antikörpern

Nach der Zellzählung wurden 106 Zellen in 1 ml Zellkulturmedium im Brutschrank (5% CO₂, 37°C) für 5 h inkubiert und mit Monensin 1000x (BioLegend), Ionomycin (1 mg/ml Stocklösung; 100 ng/ml Endkonzentration) und PMA (1 mg/ml Stocklösung; 50 ng/ml Endkonzentration) stimuliert. Anschließend folgte die extrazelluläre Färbung, wozu die Zellen zunächst zweimal mit PAB (PBS + 0,5% BSA + 0,01% NaN₃) gewaschen und je 5 min bei 400g zentrifugiert wurden. Danach wurde das Zellpellet in 90 µl PAB resuspendiert, 10 µl APC anti-mouse CD4 (1:100) hinzugegeben und 30 min bei 20°C inkubiert. Zu Anfang des Fixierungsschrittes wurden die Zellen wiederum zweimal mit PAB gewaschen und je 5 min bei 400 g zentrifugiert, worauf ein Resuspendieren der Zellen in 50 µl 4% PFA in PBS folgte mit anschließender zehnminütiger Inkubation bei 20°C im Dunkeln. Im Permeabilisations-Schritt wurden die Zellen erneut zweimal mit PAB gewaschen und je 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PAB aufgenommen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert, um am Folgetag intrazellulär gefärbt zu werden. Dazu wurde die Suspension 5 min bei 400 g zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in 100 µl PAB + 0,5% Saponin aufgenommen und je 10 µl der folgenden Antikörper in der unten angegebenen Konzentration hinzugegeben: FoxP3, IFN- γ , IL-10. Es folgte eine einstündige Inkubation im Dunkeln, eine darauffolgende zweimalige Waschung mit PAB + 0,1% Saponin und je fünfminütige Zentrifugation bei 400 g. Nach einer Aufnahme des Zellpellets in 300 µl PAB konnte die FACS-Messung durchgeführt werden.

Tab. 3-6: Auflistung der Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Inkubation
CD3 0,5 mg/ml	FITC	1:500	45 min, 20°C
CD4 0,2 mg/ml	APC	1:800	45 min, 20°C
CD25 0,2 mg/ml	PE	1:200	45 min, 20°C
FOX P3 0,5 mg/ml	Alexa Fluor 488	1:200	45 min, 20°C
IL-10 0,5 mg/ml	FITC	1:500	45 min, 20°C
IFN- γ 0,5 mg/ml	FITC	1:500	45 min, 20°C

3.5 Lichtmikroskopie

3.5.1 Paraffineinbettung

Zur Fixierung wurden die Gehirne über Nacht in 4%-iges Paraformaldehyd (PFA) gelegt. Am nächsten Tag wurden die Organe entnommen und nach Waschen in PBS, für 3 h gewässert. Danach erfolgte die Entwässerung durch aufsteigende Isopropanol-Reihe (70%, 80%, 90% je 1,5 h und 100% zweimal 1,5 h). Als Intermedium wurde Methylbenzoat verwendet, in dem die Probe dreimal 1,5 h inkubierte, bevor die Substanz zweimal je 2 h durch Paraffininkubation ersetzt wurde. Erwärmtes, flüssiges Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 58°C (Roti-Plast, 6642.2) wurde in Ausgießformen gegeben, das Organ darin ausgerichtet, ein Paraffinblockhalter hinzugegeben und dieser mit Paraffin bis zum Rand aufgefüllt, um folgend auf 20°C abzukühlen und auszuhärten.

3.5.2 Anfertigung der Paraffinschnitte

Nach Aushärtung wurden die Gewebeblöcke durch Abtragung überschüssigen Paraffins geformt und in die Trimmvorrichtung eingebracht. Das Anfertigen der 4 µm dicken Schnitte erfolgte durch Mikrotomie (Mikrotom Leica RM 2025). Die ersten Probeschnitte wurden unter dem Mikroskop bewertet und das Mikrotom gegebenenfalls nachjustiert. Die entstandenen Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels aufgenommen und in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Danach wurden sie mit einem Objektträger aufgenommen und auf einer auf 40°C erwärmten Wärmeplatte 30 min getrocknet. Eine Weiertrocknung fand bei 37°C über Nacht statt.

3.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Paraffinschnitte

Zur Herstellung 0,1%-iger Eosin-Lösung wurde 0,4 g Eosin-Pulver mit 400 ml Aqua dest. und 2-3 Tropfen Essigsäure vermischt. Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert. Dazu wurde dreimal je 5 min mit Xylol, zweimal je 5 min mit 100%-igem, einmal 5 min mit 90%-igem und ebenfalls einmal 5 min mit 80%-igem Isopropanol inkubiert. Die nun entparaffinierten Schnitte wurden 8 min in Hämatoxylin sauer nach Ehrlich überführt, in Aqua dest. gewaschen und 12 min unter fließendem Wasser gebläut. Nach erneutem Schwenken in Aqua dest. wurden sie für 2,5 min in die 0,1%-ige Eosinlösung eingebracht und in 90%-igem Isopropanol geschwenkt. Durch zweimal 5 minütiger Inkubation in Isopropanol und dreimal 5 minütiger Inkubation in Xylol erfolgte im letzten Schritt die Entwässerung.

3.5.4 Luxol-Fast-Blue-Färbung der Paraffinschnitte

Um 0,2%-ige LFB-Lösung herzustellen, wurde 0,8 g LFB-Pulver langsam nach und nach in einem Stoffgemisch aus 400 ml 96%-igem Ethanol und 2 ml Eisessig aufgelöst. 0,1%-ige Kresylviolett-Lösung wurde durch Vermengen von 0,1 g Kresylviolett mit 100 ml Aqua dest. und 1 ml 10%-iger Essigsäure angefertigt. Im ersten Schritt wurde die Entparaffinierung durchgeführt. Die Objektträger wurden dreimal je 5 min mit Xylol, zweimal je 5 min mit 100%-igem und einmal 5 min mit 90%-igem Isopropanol gewaschen, um dann über Nacht bei 60°C in der 0,2%-igen LFB-Lösung zu inkubieren. Am zweiten Tag erfolgte eine je 2-minütige Waschung in 90%-igem und 70%-igem Ethanol und in Aqua dest. Nach je 10 sec Schwenken in 0,05%-iger Lithium-Carbonat-Lösung und 70%-igem Ethanol, wurden die Schnitte für 5 min in 0,1%-ige Kresylviolett-Lösung gelegt, um darauffolgend 30 sec mit Aqua dest., 1 min mit 96%-igem Ethanol, 1 min mit 96%-iger Ethanol-Eisessig und 1 min mit 96%-igem Ethanol gespült zu werden. Die Entwässerung wurde entsprechend dem HE-Protokoll durchgeführt.

3.5.5 Diaminobenzidin-Färbung der Paraffinschnitte

Zur Herstellung von 10 mM Citratpuffer mit einem pH Wert von 6,0 wurden 0,265 g Zitronensäuremonohydrat und 2,57 g Mononatriumzitatdihydrat in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Um 3%-ige Wasserstoffperoxid-PBS-Lösung mit einem pH Wert von 7,4 zu erzeugen, wurde 4,28 ml 35%-ige Wasserstoffperoxid-Lösung mit 45,72 ml PBS vermischt. Auch bei dieser Färbemethode erfolgte im ersten Schritt eine Entfernung des Einbettungsmaterials der Gewebeschnitte. In diesem Fall wurden die Objektträger dreimal 5 min in Xylol, zweimal 5 min in 100%-iges Isopropanol und je 3 min in 95%-iges, 90%-iges und 70%-iges Ethanol und in Aqua dest. überführt, um danach 30 min bei 95°C im Citrat-Puffer zu inkubieren. Um zu verhindern, dass die Antikörper unspezifische Bindungen eingehen wurden vor Antikörperinkubation diese möglichen Bindungen durch Zugabe von 5%-igem Normal Goat Serum (NGS) blockiert. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4°C die Primäantikörperinkubation mit Myelin Basic Protein (MBP) Antikörpern in einer Verdünnung von 1:100 in PBS und mit Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (CNPase) Antikörpern in einer Verdünnung von 1:200 in PBS. Am 2. Tag wurde nach zweimal 2-minütiger PBS-Waschung, 10-minütiger 3%-iger Wasserstoffperoxid-Inkubation und erneuter zweimal 2-minütiger PBS-Waschung der jeweilige Horse radish Peroxidase Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 hinzugegeben 45 min bei 20°C inkubiert und erneut zweimal 2 min mit PBS gewaschen. Auf diesen Schritt folgte dann die die Färbung mit

Diaminobenzidin-Lösung mit einer Inkubationszeit von 4 min bei den MBP-gefärbten, und 5 min bei den CNPase-gefärbten Objektträgern und Negativkontrollen. Zum Stoppen der Färbereaktion wurden die Schnitte in PBS geschwenkt und für 2 min in Aqua dest. gelegt. Im letzten Schritt erfolgte die Entwässerung durch Waschen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3 min 70%, 6 min 90%, zweimal 5 min 100% Isopropanol, dreimal 5 min Xylol). Bei allen Färbungen wurden am Ende die Objektträger mit DePexmounting medium eingedeckt.

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie

3.6.1 Epon-Einbettung

Nach der Organentnahme wurde der Optische Nerv zunächst in 0,4 M Cacodylat-Puffer bei 4°C gelagert, um anschließend nach Luft (1961) und Glauert (1975) von Hand in Epon eingebettet zu werden.

Um 0,4 M Cacodylat-Puffer herzustellen, wurden 42,8 g Natriumcacodylat in 250 ml Aqua bidest. gelöst. Mit 0,1 N Salzsäure wurde der pH-Wert der Lösung zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt. Nach Auffüllen der Lösung auf 500 ml mit Aqua bidest. wurde filtriert. Die 0,1 M Lösung wurde durch weitere Verdünnung mit Aqua bidest. aus der 0,4 m Cacodylat-Pufferlösung hergestellt.

Zur Herstellung der Epon-Fertigmischung (A+B) wurden zwei Stammlösungen hergestellt, Stammlösung A aus 116 ml Dodecyl Succinic Anhydride + 72,33 ml EM bed-812, und Stammlösung B aus 100 ml EM bed-812 und 89 ml Nadic Methyl Anhydride, die in einem 1:1 Verhältnis vermischt wurden. Diese Mischung wurde 5:1 mit Benzyltrimethylamine vermischt.

Zur Einbettung wurde der Nerv am ersten Tag viermal je 10 min in 0,1 molarem Cacodylat-Puffer gewaschen und danach für 4 h in 2%-ige Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Cacodylat-Puffer zur weiteren Fixierung gestellt. Die entstandenen Osmium-Abfälle wurden mit Ascorbinsäure in Methanol neutralisiert und entsorgt. Danach wurde die Probe wiederum viermal für je 5 min mit Aqua dest. gewaschen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am zweiten Tag wurde der Nerv durch Behandeln mit aufsteigenden Alkohol-Lösungen entwässert. Zunächst dreimal je 5 min in 70%-iger Ethanol-Lösung, dann je 30 min in 80%-igem, 90%-igem, 96%-igem, 100%-igem wasserfreiem Ethanol und dreimal in 100%-igen wasserfreiem Aceton. Daraufhin wurde der optische Nerv je 1 h in eine 3:1 Aceton-Epon-Mischung und eine 1:1 Aceton-Epon-Mischung eingelegt und über Nacht schloss sich eine Infiltration bei 20°C mit einer 1:3 Aceton-Epon-Mischung an. Am dritten Tag wurde das Material mit reinem Epon für 1 h bei 40°C und wiederum für 1 h bei 20°C mit reinem Epon behandelt. Im letzten Schritt folgte die Orientierung der Nerven in den mit reinem Epon gefüllten Silikoneinbettformen mit anschließender Auspolymerisation für mindestens 48 h bei 60°C.

3.6.2 Herstellung der Ultradünnschnitte

Die auspolymerisierten Blöcke mit den optischen Nerven wurden zunächst in die gewünschte Form gebracht und angespitzt. Anschließend erfolgte an einem Leica EM UC7 Ultramikrotom bei 6°C Schneidewinkel (45°C Messerwinkel) das Zuschneiden mit Hilfe eines Diamantmessers (Diatome ultra) in 65 nm – 68 nm dicke Schnitte. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfer Grid 1.2 Schlitznetze (Plano) aufgezogen.

3.6.3 Befilmung der Grids

Um die Befilmung vorzubereiten, wurde das Vorratsgefäß der Befilmungsapparatur mit Pioloform befüllt, nachdem diese zuvor mit Chloroform ausgespült worden war. Mit Kernseife und Aqua dest. wurden die Objektträger gereinigt und mit fusselfreiem Tuch getrocknet. Die pneumatische Wanne wurde mit Aqua dest. bis Erreichen des Meniskus gefüllt. Darauf folgend wurde der Objektträger mittels Pinzette in Pioloform getaucht, wobei die Lösung nach 1 min mit konstanter Geschwindigkeit abgelassen wurde. Nach weiteren 30 sec wurde der Objektträger für mindestens 30 min in eine Objektträgerbox gestellt, getrocknet und der Objektträger rundherum eingeritzt. Anschließend wurde mittels sauberen Glasstabs der Meniskus der zuvor mit Aqua dest. überfüllten pneumatischen Wanne abgestrichen. Der Objektträger wurde angehaucht bis sich ein Kondenswasser-Film gebildet hatte und danach langsam bei 45°C vom Rand der Wanne ins Wasser gelassen. Dadurch schwamm der Pioloform-Film auf der Wasseroberfläche, worauf der Objektträger vorsichtig herausgezogen und verworfen werden konnte. Dabei ist zu beachten, dass die Wasseroberfläche auf keinen Fall mit den Händen berührt wird, da der Fettfilm der Haut ausreicht, um den Pioloform-Film stark zu verunreinigen. Erschien der Film auf der Wasseroberfläche silberfarben und hatte er eine glatte Struktur ohne Staubpartikel oder Schmutz, wurde er mit Grids belegt. Die raue Seite der Kupfer-Grids sollte hierbei nach unten, die glänzende nach oben zeigen. Nachdem Parafilmpapier auf dem Film abgerollt worden war, wurde beides herausgezogen und zum Trocken in einer Petrischale abgelegt.

3.6.4 Kontrastierung der Grids

Zur Kontrastierung der Ultradünnschnitte wurde Bleicitrat nach Reynolds (1963) verwendet. 1,33 g Bleinitrat und 1,76 g Zitronensäure Natrium-Salz wurden in 30 ml frisch abgekochtem Aqua dest. gelöst und für 30 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde 1 N NaOH Suprapurum bis zu einem pH-Wert von 11,95 hinzugegeben und mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Die Ultradünnschnitte wurden 5 min auf einzelnen Tropfen der Bleicitratlösung nach Reynolds kontrastiert, mit Aqua dest. gewaschen und zuletzt bei 20°C an der Luft getrocknet.

3.6.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Pro Grid wurden 3 Anschnitte des optischen Nerven aufgenommen. Pro Anschnitt wurden 3 Übersichtsaufnahmen in 6000-facher Vergrößerung und 3 Detailaufnahmen in 16500-facher Vergrößerung gemacht (Transmissionselektronenmikroskop FEI Tecnai G2; FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA; Kamera Olympus MegaView III; Olympus, Hamburg, Deutschland).

3.6.6 g-ratio

In den Querschnittsdetaillaufnahmen der optischen Nerven wurde die sogenannte g-ratio bestimmt. Die g-ratio entspricht dem Quotienten aus Axon-Durchmesser ohne Myelinscheide und Axon-Durchmesser (Axon mit Myelinscheide) (Guy et al., 1991). Damit entspricht die g-ratio einem objektivierten Maß für die Dicke der Myelinscheide, das unabhängig von dem in der Auswertung benutzten Bildformat ist. Theoretisch kann dieser Quotient Werte zwischen 0 und 1 annehmen. 1, wenn das Axon komplett demyelinisiert ist. Immer kleiner wird der g-ratio-Wert, beziehungsweise immer mehr geht der Wert gegen 0, je größer der Myelinscheiden-Durchmesser wird.

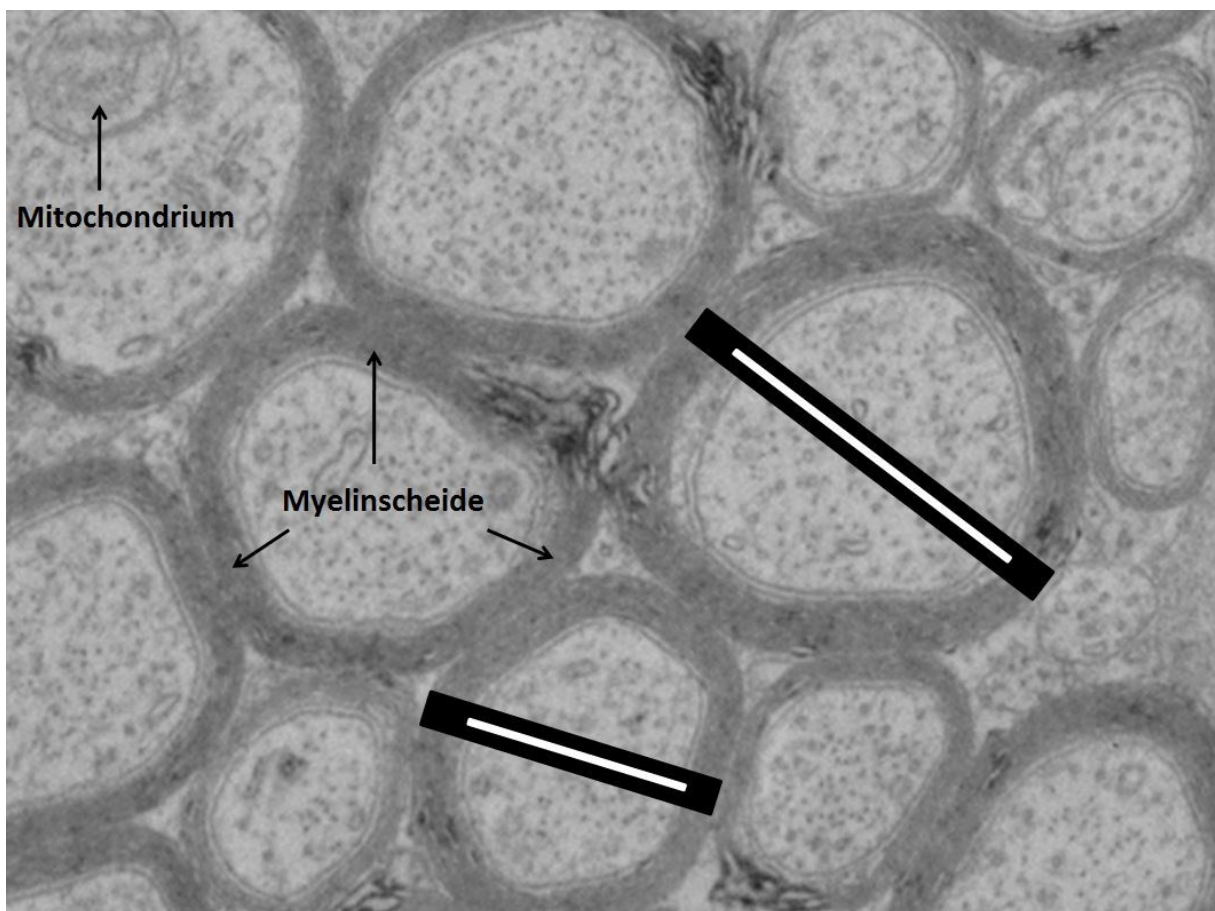


Abb. 3-4. Berechnung der g-ratio

g-ratio = Quotient aus Axon-Durchmesser ohne Myelinscheide (weiß) und Axon-Durchmesser (Axon mit Myelinscheide, schwarz)

Unter Berücksichtigung struktureller und funktioneller Gesichtspunkte, liegt der theoretisch optimale Wert der g-ratio bei 0,76-0,77 (Chomiak and Hu, 2009) und der gemessene Mittelwert bei 0,76-0,81, wobei ein Mittelwert von 0,81 für Axone des optischen Nervs, hauptsächlich jedoch bei Ratten, angegeben wird (Benninger et al., 2006; Chau et al., 2000; Chomiak and Hu, 2009; Guy et al., 1989). In optischen Nerven von C57BL/6-Mäusen fanden Millet et al. einen g-ratio-Mittelwert von 0.7064 (Millet et al., 2012).

3.6.7 Auswertung der Aufnahmen

Ausgewertet wurden elektronenmikroskopische Querschnittsaufnahmen von optischen Nerven in den Vergrößerungen 6000-fach (entspricht einer Fläche von $14,5 \mu\text{m} \times 10,6 \mu\text{m}$), als Übersichtsaufnahme, und 16500-fach (entspricht einer Fläche von $5,3 \mu\text{m} \times 3,9 \mu\text{m}$) als Detailaufnahme. Bei der Übersichtsauswertung wurden alle Axone auf einem Bild gezählt, sowohl myelinisierte als auch demyelinisierte. Aus diesen beiden Werten wurde für jede Aufnahme der Quotient x aus demyelinisierten und myelinisierten Axonen gebildet ($x = \text{demyelinisiert} / \text{myelinisiert}$). Die Übersichtsquotienten aus allen Aufnahmen eines Tiers wurden gemittelt, sodass pro Tier ein Quotienten-Mittelwert ausgerechnet wurde. Dieser wurde nun auf die Detailaufnahmen in 16500-facher Vergrößerung ($5,3 \mu\text{m} \times 3,9 \mu\text{m}$) übertragen, um hier die dem Quotienten entsprechende Anzahl an myelinisierten und demyelinisierten Axonen zu vermessen. Wurde beispielsweise ein Quotient von 0,2 ermittelt, so wurden 2 demyelinisierte und 10 myelinisierte Axone pro Detailaufnahme vermessen.

Gemessen wurde mit Lineal auf in DIN A4 ausgedruckten Schwarzweißaufnahmen, was sich als effizienteste Methode herausstellte. Maßeinheiten spielen hierbei keine Rolle, da die g-ratio einem Quotienten mit gleicher Einheit in Zähler und Nenner entspricht. Somit spielt es ebenfalls keine Rolle, welche Ausdruckgröße zum Vermessen benutzt wird. Pro Bild wurden mindestens 12 g-ratios bestimmt, je nach Übersichtsquotient auch mehr als 12. Da pro Tier mindestens 9 Detailaufnahmen ausgewertet wurden, kommt man bei jedem Tier auf über 100 g-ratio Messwerte.

3.7 Datenverarbeitung und statistische Analyse

3.7.1 Durchflusszytometrie

Die gemessenen FACS-Werte wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office 2007) übertragen. Für die statistische Analyse und die Erstellung der Graphiken erfolgte die Aufnahme der Daten in GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA). Nach Histogramm-Darstellung zur Überprüfung auf Normalverteilung wurden die stets nicht-normalverteilten Daten mithilfe des Kruskal-Wallis Test als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Test als post-hoc Test im Gruppenvergleich gegeneinander aufgetragen. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.7.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die manuell gemessenen g-ratio- und Axon-Durchmesser-Mediane wurden jeweils in Excel-Tabellen aufgelistet. Für die statistische Analyse erfolgte die Aufnahme der Daten in IBM SPSS statistics 23. Da pro Tier 9 Aufnahmen, die von drei Anschnitten eines optischen Nerven gemacht wurden, ausgewertet und so jeweils 9 Bildmediane bestimmt wurden, wurde eine Generalized Estimating Equation-Analyse (GEE) durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen Versuchsgruppen und g-ratio bzw. Axon-Durchmesser zu beschreiben. G-ratio bzw. Axon-Durchmesser wurde dabei jeweils als quantitative abhängige Variable und die Versuchsgruppe als kategoriale unabhängige Variable modelliert. Die Ergebnisse wurden als Regressionskoeffizienten mit 95%-Konfidenzintervallen angegeben. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die zugehörigen Abbildungen wurden mit GraphPad Prism 6 erstellt. Aus allen Bildmedianen der Tiere einer Gruppe wurde ein Median pro Gruppe mit zugehörigem Interquartilsrange bestimmt.

3.7.3 EAE-Score

Die bestimmten Score-Werte wurden in Excel-Tabellen aufgelistet und anschließend in GraphPad Prism 6 übertragen. Die Gruppenmittelwerte wurden in Abhängigkeit vom Tag nach Immunisierung bzw. Behandlungstag gegeneinander aufgetragen. Zusätzlich wurden für jeden Tag die nicht-normalverteilten Daten mithilfe des Kruskal-Wallis Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test im Gruppenvergleich gegeneinander aufgetragen. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des CPZ-Modells

4.1.1 Durchflusszytometrie

In der durchflusszytometrischen Messung wurden bei jedem Tier Leukozyten bzw. Leukozyten-Untergruppen pro 100µl Blut und pro Milz als absolute und prozentuale Zellzahlen quantifiziert und nach statistischer Analyse im Gruppenvergleich gegeneinander aufgetragen. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil].

In der Blutanalyse zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der absoluten Leukozyten-Zellzahl, wobei die Standardfutter-Gruppe mit $225,5 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$ [$147,5 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$; $360,8 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$] die größte mediane Anzahl an Leukozyten aufwies. Diese unterschied sich sowohl von der Leukozyten-Zellzahl der CPZ/CPZ-Gruppe ($43,6 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$ [$20,4 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$; $65,9 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$], $p < 0,05$), als auch von der der CPZ/PBN-Gruppe ($35,7 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$ [$28,1 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$; $81,8 \cdot 10^3/100 \mu\text{l}$], $p < 0,05$) signifikant, jedoch nicht von der der CPZ/solvent-Gruppe. Prozentual lag der Anteil an Lymphozyten an allen Leukozyten bei allen Gruppen ungefähr im selben Bereich. Der prozentuale Anteil der $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ Lymphozyten an allen Lymphozyten unterschied sich ebenfalls im Gruppenvergleich nicht signifikant. Beim Gruppenvergleich der $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Lymphozyten an allen $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ Lymphozyten konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen der Standardfutter-Gruppe und den Gruppen CPZ/CPZ (5,2% [4,4%; 5,6%], $p < 0,05$), CPZ/solvent (4,8% [4,4%; 5,5%], $p < 0,05$) und CPZ/PBN (4,7% [4,1%; 5,8%], $p < 0,01$) festgestellt werden. Die Standardfutter-Gruppe wies hier mit 7,9% [6,7%; 8,9%] den größten Anteil an $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Lymphozyten auf.

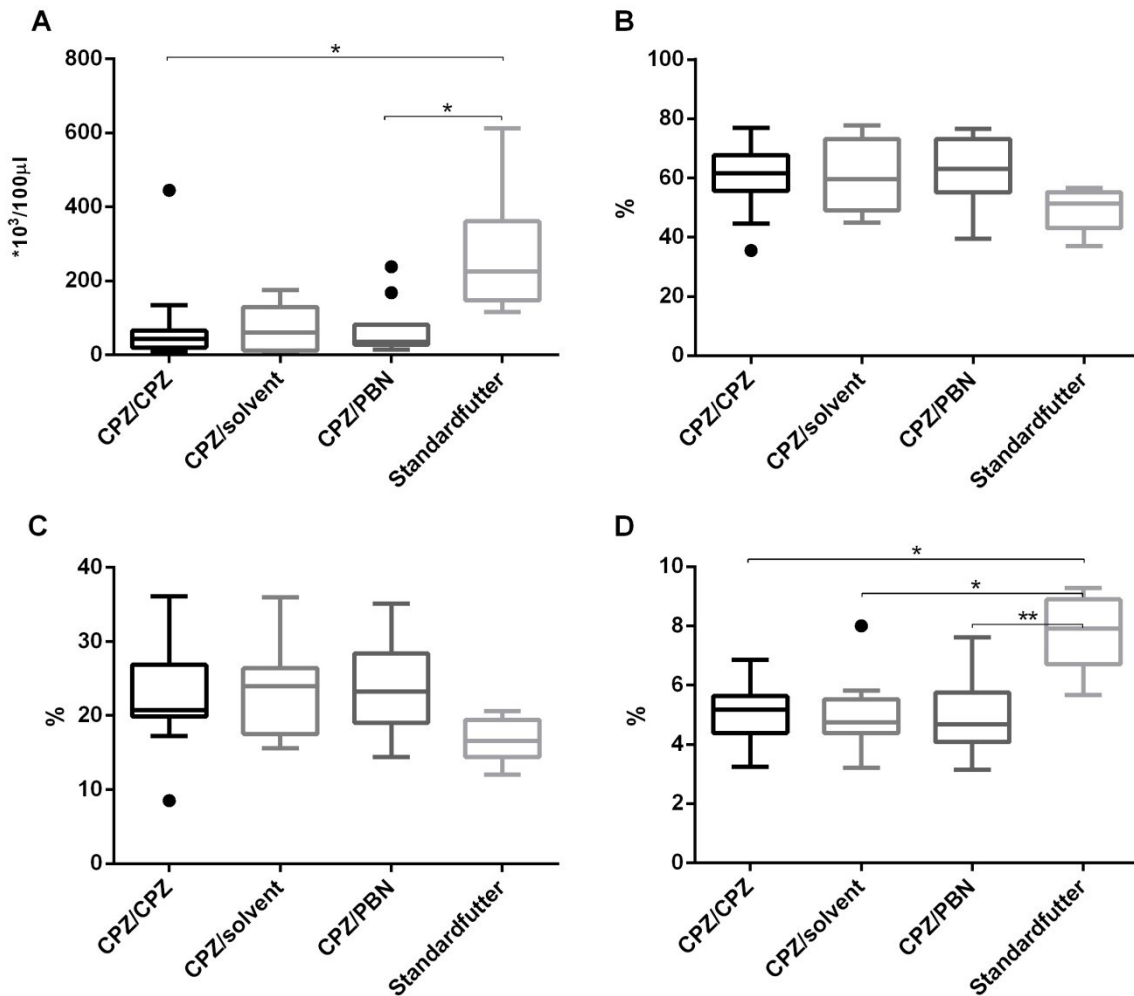


Abb. 4-1. Zellzahlen pro 100 µl Blut im CPZ-Versuch

Die Abbildung zeigt die Zellzahlen pro 100 µl Blut im Gruppenvergleich nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. In Graphik A wird die absolute Leukozyten-Zellzahl dargestellt. Die Standardfutter-Gruppe, die die größte Anzahl an Leukozyten aufwies, unterschied sich signifikant von der Leukozyten-Zellzahl der CPZ/CPZ-Gruppe und der der CPZ/PBN-Gruppe, nicht jedoch von der der CPZ/solvent-Gruppe. Die in Graphik B abgebildete prozentuale Anzahl an Lymphozyten wies keine Unterschiede im Gruppenvergleich auf. Auch im Gruppenvergleich der prozentualen CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten-Zellzahlen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Graphik C). Der Anteil der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten an allen CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten in der Standardfutter-Gruppe überstieg den prozentualen Anteil dieser Zellen in den anderen Gruppen (Graphik D).

Die Auswertung der absoluten Leukozyten-Zellzahlen der Milz zeigte keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich. Auch in den Gruppenvergleichen der prozentualen Lymphozyten-Zellzahlen pro Milz an allen Leukozyten und der prozentualen CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten-Zellzahlen an allen Lymphozyten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Standardfutter-Gruppe mit einem prozentualen Anteil der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten an allen CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten von 20,1% [16,7%; 22,6%] signifikant von der Gruppe CPZ/CPZ mit 9,6% ([8,7%; 10,5%], p<0,001), von der Gruppe CPZ/solvent mit 10,7% ([9,6%; 13,7%], p<0,05) und von der Gruppe CPZ/PBN mit 10,2% ([9,2%; 11,9], p<0,01).

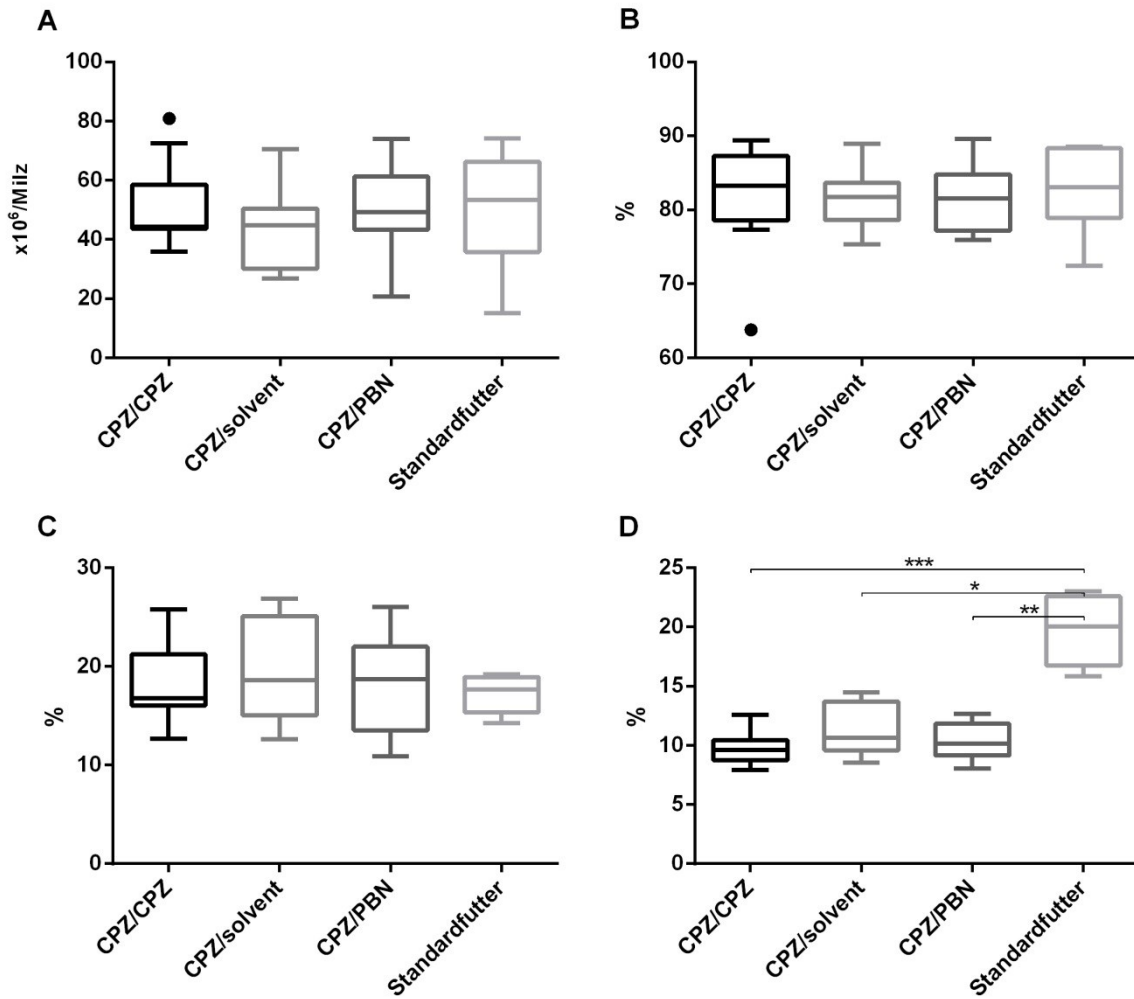


Abb. 4-2. Zellzahlen pro Milz im CPZ-Versuch

Die Abbildung zeigt die Zellzahlen pro Milz im Gruppenvergleich nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Graphik A stellt die absoluten Leukozyten-Zellzahlen dar, die im Gruppenvergleich keine Unterschiede zeigten. Die in Graphik B abgebildeten prozentualen Lymphozyten-Zellzahlen und in Graphik C veranschaulichten prozentualen CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten-Zellzahlen wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf. Bezogen auf den Anteil der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten an CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten war der Anteil der Standardfutter-Gruppe signifikant größer als der der übrigen Gruppen.

4.1.2 Lichtmikroskopie

Die in Paraffin eingebetteten histologischen Schnitte des Corpus callosum der Tiere wurden nach HE-, LFB-, MBP-, CNPase-Färbung unter dem Lichtmikroskop betrachtet, um in dieser Region Demyelinisierungsprozesse histologisch sichtbar zu machen. Hierzu wurden zunächst nur Schnitte von Tieren der Standardfutter- und CPZ/CPZ-Gruppe aufgelegt, um herauszufinden ob sich hierbei augenscheinliche Unterschiede zeigen, die anschließend quantifiziert und statistisch miteinander verglichen werden können. Als Demyelinisierungsprozess wurden im ersten Schritt eine subjektiv verminderte Anfärbung bzw. ausgesparte, nicht angefärbte Areale gewertet. Beim Betrachten der histologischen Schnitte konnten jedoch keine Tendenzen im Gruppenvergleich gesehen werden. Es wurde daher auf weitere Auswertung verzichtet und eine Auswertung von transmissionselektronischen Querschnittsaufnahmen optischer Nerven durchgeführt.

Eine HE-Färbung wurde angefertigt, um einen Überblick zu bekommen, da sich eine mögliche strukturelle Veränderung mit großer Wahrscheinlichkeit auch in den spezifischeren Färbungen gezeigt hätte. Jedoch wurden keine Unterschiede zwischen CPZ/CPZ- und Standardfutter-Gruppe gefunden. Auch in der LFB-Färbung, die Myelin blau färbt, und in der MBP-Färbung, die einen spezifischen Myelinbestandteil anfärbt und die sich somit zur Quantifizierung einer verringerten Myelindichte eignen müssten, konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die CNPase-Färbung hingegen, in der ein Enzymbestandteil des Myelins immunhistochemisch nachgewiesen wurde, zeigte bei einigen Aufnahmen der CPZ/CPZ-Gruppe eine verminderte Anfärbung gegenüber Aufnahmen der Standardfutter-Gruppe. Hier waren die Unterschiede jedoch zu inkonstant, um diese zu quantifizieren.

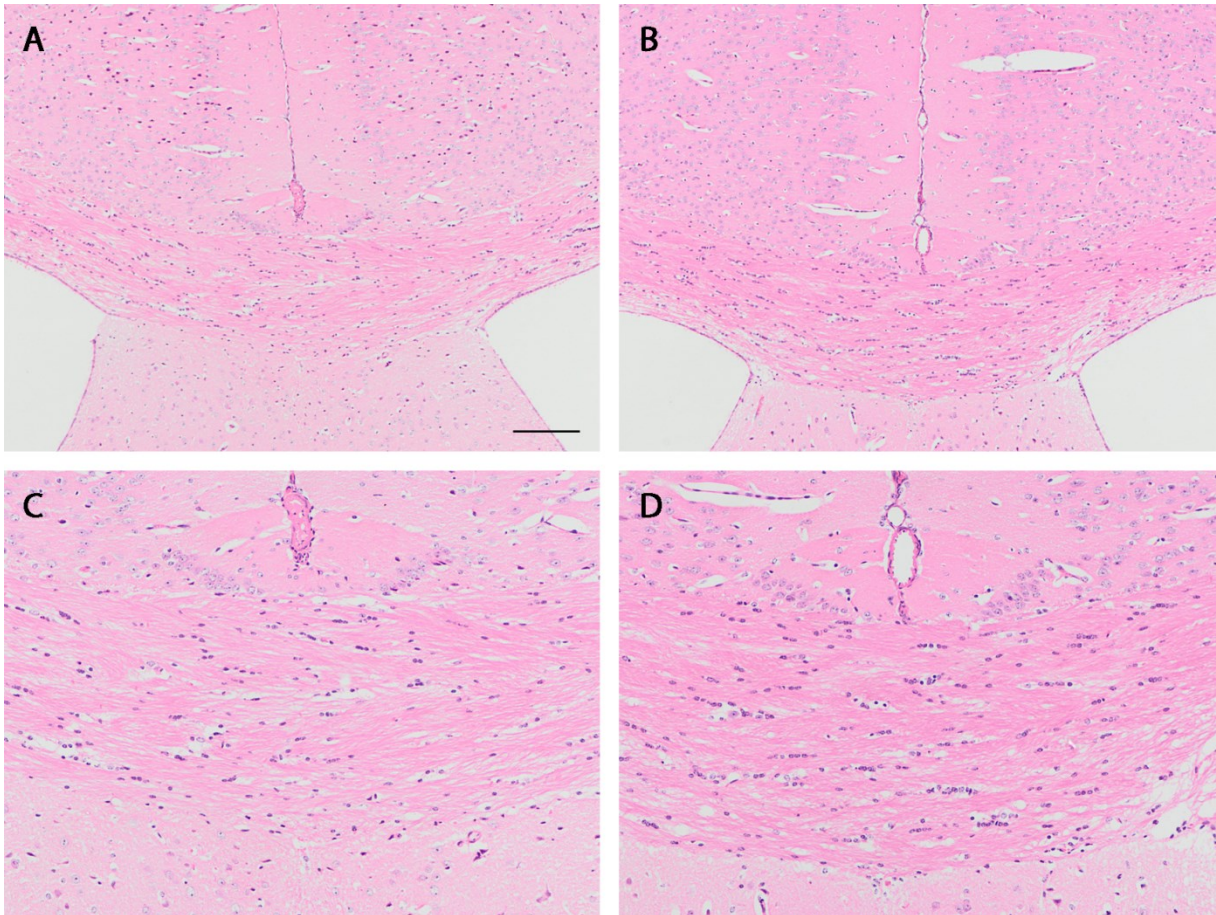


Abb. 4-3. Lichtmikroskopische Aufnahmen des Corpus callosum nach HE-Färbung
 Der Größenbalken in A, der für alle Aufnahmen gilt, steht in A und B für eine Länge von 200 µm, in C und D für eine Länge von 100 µm. Die Abbildung zeigt repräsentative Frontalschnitte des Corpus callosum nach HE-Färbung eines CPZ/CPZ-Tieres (A und C) und eines Standardfutter-Tieres (B und D).

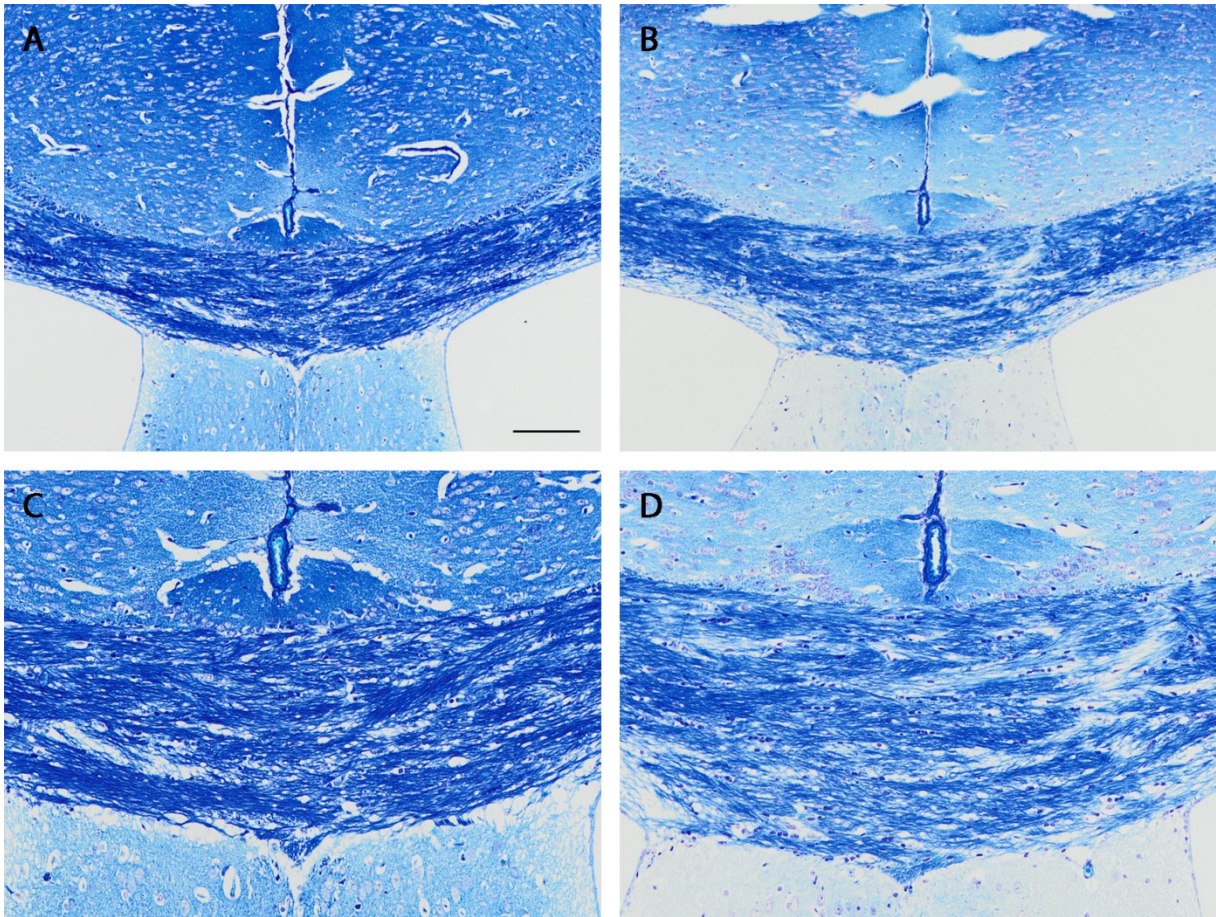


Abb. 4-4. Lichtmikroskopische Aufnahmen des Corpus callosum nach LFB-Färbung
Der Größenbalken in A, der für alle Aufnahmen gilt, steht in A und B für eine Länge von 200 µm, in C und D für eine Länge von 100 µm. Die Abbildung zeigt repräsentative Frontalschnitte des Corpus callosum nach LFB-Färbung eines CPZ/CPZ-Tieres (A und C) und eines Standardfutter-Tieres (B und D).

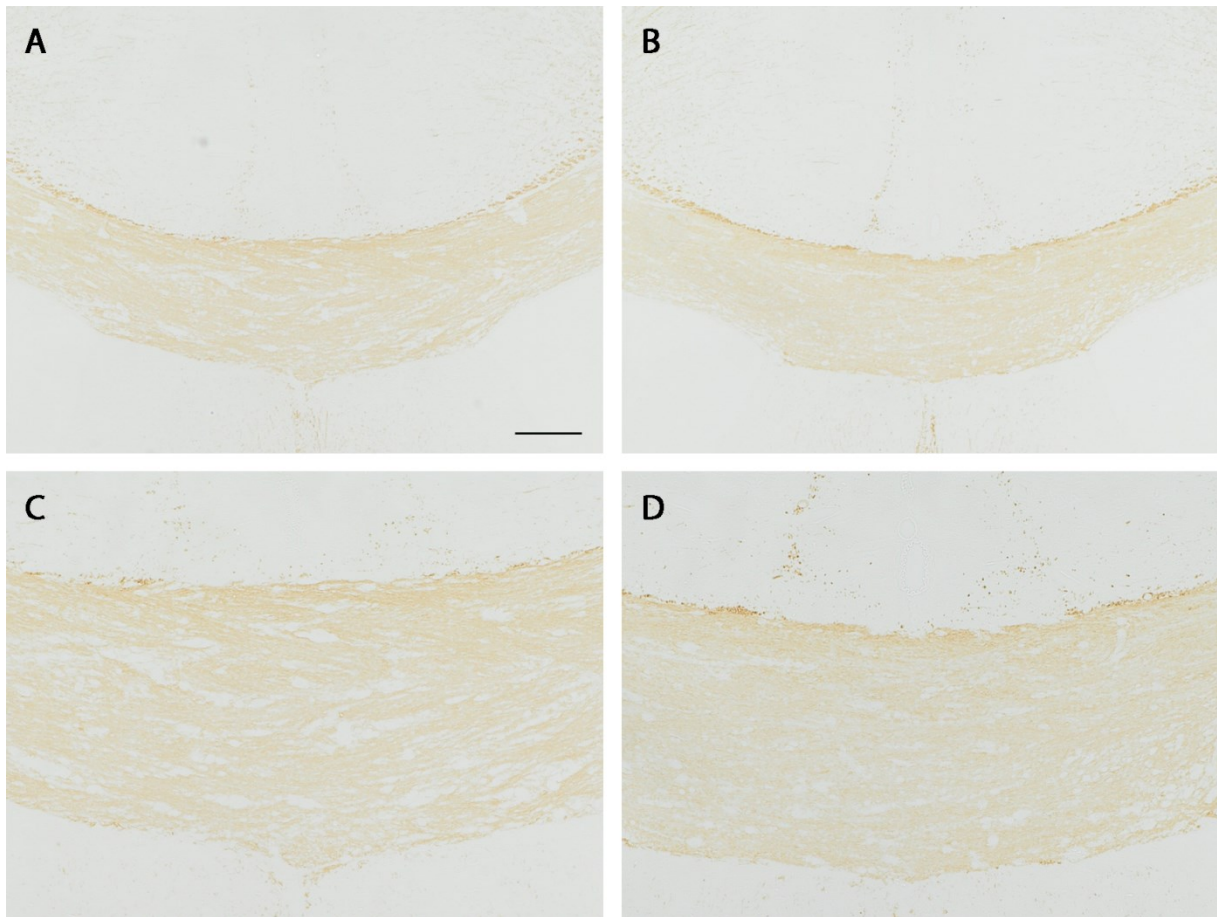


Abb. 4-5. Lichtmikroskopische Aufnahmen des Corpus callosum nach MBP-Immunhistochemie
Der Größenbalken in A, der für alle Aufnahmen gilt, steht in A und B für eine Länge von 200 µm, in C und D für eine Länge von 100 µm. Die Abbildung zeigt repräsentative Frontalschnitte des Corpus callosum nach MBP-Immunhistochemie eines CPZ/CPZ-Tieres (A und C) und eines Standardfutter-Tieres (B und D).

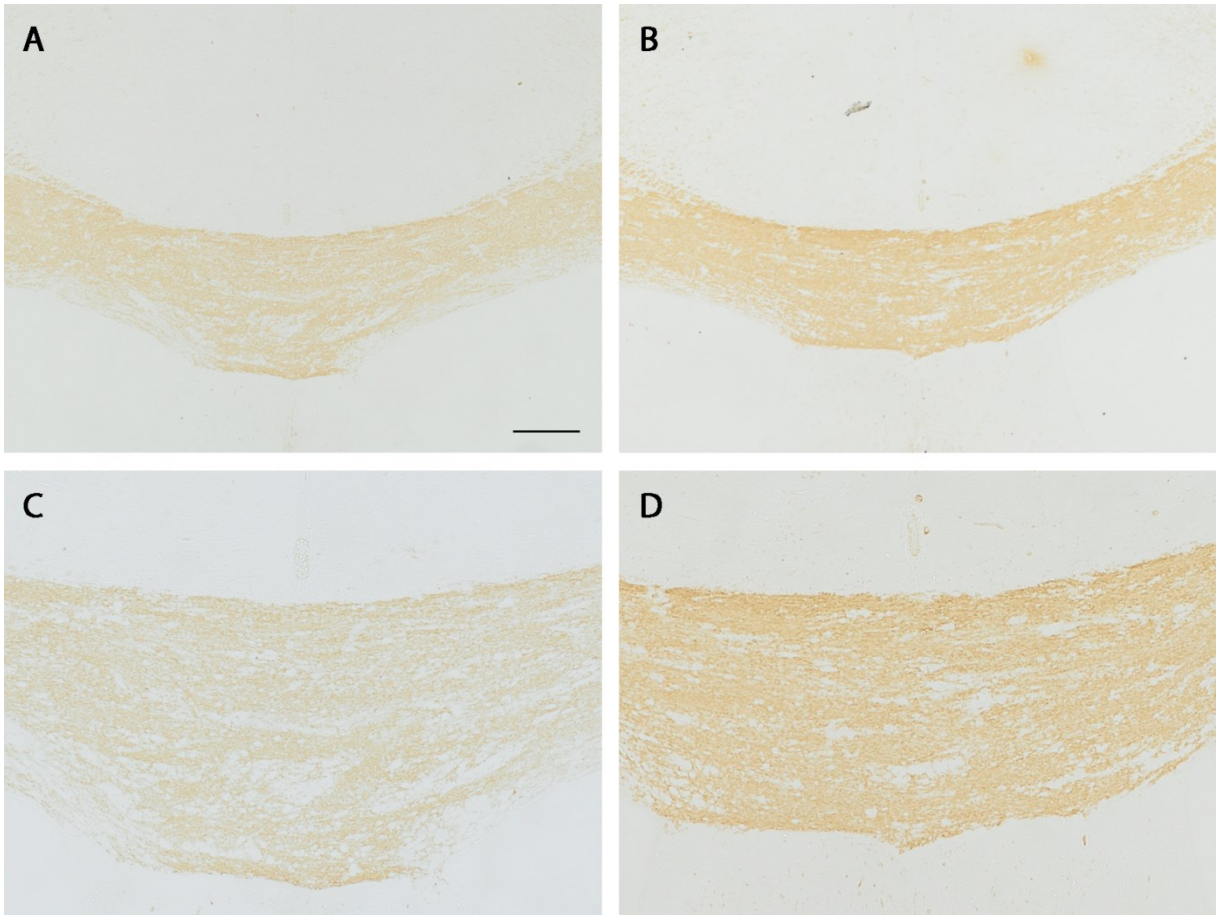


Abb. 4-6. Lichtmikroskopische Aufnahmen des Corpus callosum nach CNPase-Immunhistochemie. Der Größenbalken in A, der für alle Aufnahmen gilt, steht in A und B für eine Länge von 200 µm, in C und D für eine Länge von 100 µm. Die Abbildung zeigt repräsentative Frontalschnitte des Corpus callosum nach CNPase-Immunhistochemie eines CPZ/CPZ-Tieres (A und C) und eines Standardfutter-Tieres (B und D).

4.1.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Auf ultrastruktureller Ebene war nach 20 Tagen CPZ-Diät in der Gruppe CPZ/CPZ (A) eine starke Demyelinisierung zu erkennen, während diese in der Standardfutter-Gruppe, die die physiologische Situation zeigt, unterblieb. Zum Vergleich sind ebenfalls repräsentative Aufnahmen von der scheinbehandelten Gruppe CPZ/solvent (C, D) und der Probenecidtherapierten Gruppe CPZ/PBN gezeigt. Um die unterschiedlich starke Demyelinisierung zu quantifizieren, wurden Axon-Durchmesser- und g-ratio-Auswertungen angeschlossen.

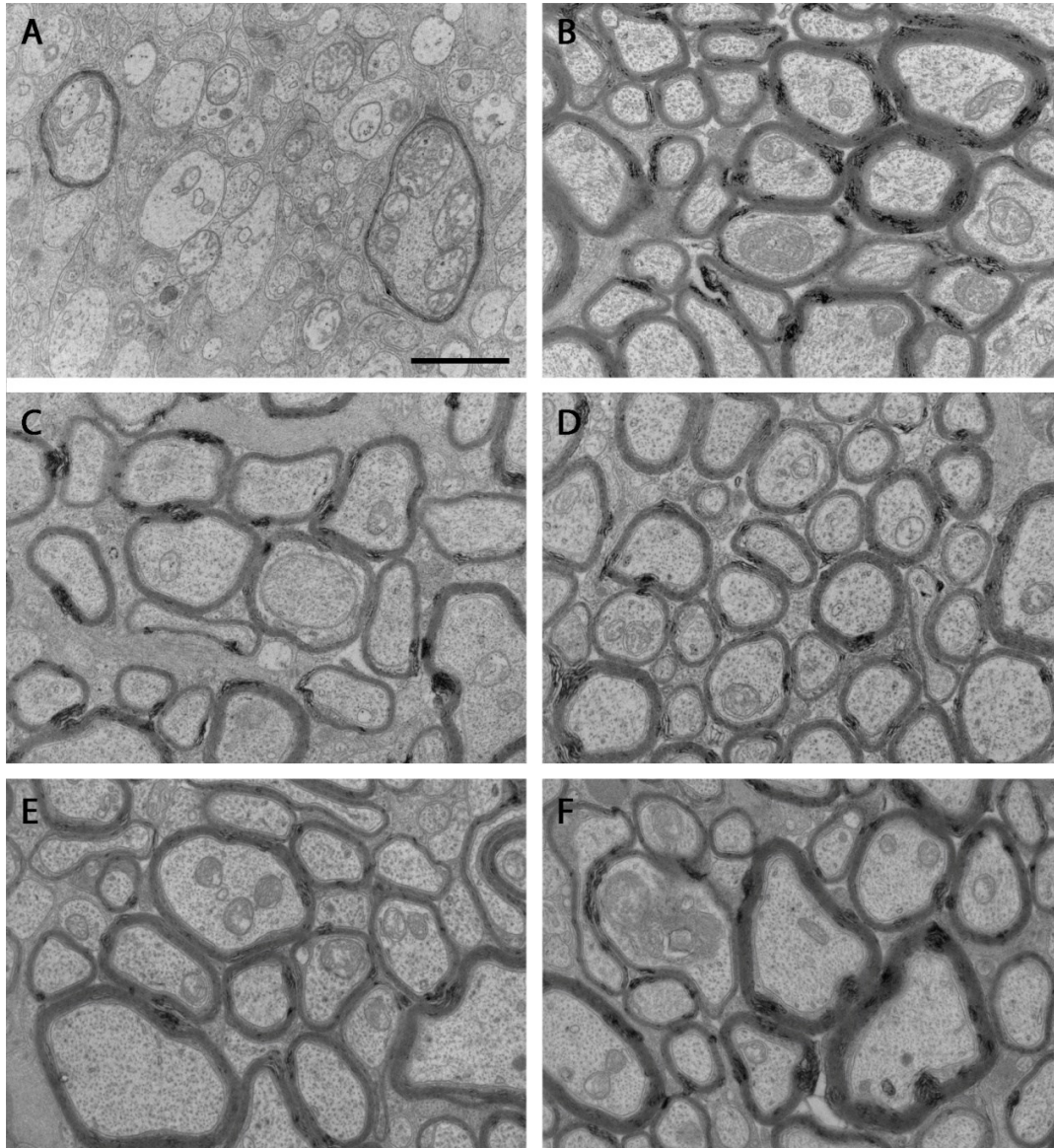


Abb. 4-7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des optischen Nerven

Der Größenbalken in A, der für alle Aufnahmen gilt, steht für eine Länge von 1 μm . In A steht eine repräsentative Aufnahme der Gruppe CPZ/CPZ, die eine starke Demyelinisierung zeigt, einer Aufnahme der Gruppe Standardfutter (B) ohne demyelinisierte Axone gegenüber. Die mittlere Reihe repräsentiert zwei Aufnahmen der Gruppe CPZ/solvent (C, D) und die unterste Reihe beinhaltet zwei Aufnahmen der Gruppe CPZ/PBN (E, F). Es sind deutliche Unterschiede zwischen den Aufnahmen zu sehen, die Quantifizierung dieser wird im Folgenden anhand des Axon-Durchmesser- und g-ratio-Vergleichs dargestellt.

Um erste morphologische Unterschiede in den verschiedenen Versuchsgruppen zu quantifizieren, wurden die Axon-Durchmesser auf transmissionselektronischen Aufnahmen des optischen Nervens gemessen. Die so bestimmten medianen Axon-Durchmesser wurden mithilfe der GEE miteinander verglichen, wobei die Gruppe CPZ/CPZ als Referenz-Gruppe definiert wurde. Hierbei zeigte sich, dass der Axon-Durchmesser der Standardfutter-Gruppe um $0,173 \mu\text{m}$ ($[0,125 \mu\text{m}; 0,221 \mu\text{m}]$, $p < 0,001$) größer und der Axon-Durchmesser der Gruppe CPZ/PBN um $0,133 \mu\text{m}$ ($[0,084 \mu\text{m}; 0,182 \mu\text{m}]$, $p < 0,001$) größer war, als der Axon-Durchmesser der CPZ/CPZ-Gruppe. Hingegen unterschied sich der Median der CPZ/solvent-Gruppe nicht signifikant von dem der CPZ/CPZ-Gruppe ($0,027 \mu\text{m}$ $[-0,028 \mu\text{m}; 0,081 \mu\text{m}]$, $p = 0,335$). Der größte mediane Axon-Durchmesser wurde mit $0,76 \mu\text{m}$ $[0,70 \mu\text{m}; 0,80 \mu\text{m}]$ in der Standardfutter-Gruppe festgestellt, die Gruppe CPZ/PBN wies einen Wert von $0,72 \mu\text{m}$ $[0,70 \mu\text{m}; 0,74 \mu\text{m}]$ auf, die Gruppe CPZ/solvent $0,63 \mu\text{m}$ $[0,60 \mu\text{m}; 0,66 \mu\text{m}]$ und die Gruppe CPZ/CPZ $0,59 \mu\text{m}$ $[0,55 \mu\text{m}; 0,64 \mu\text{m}]$.

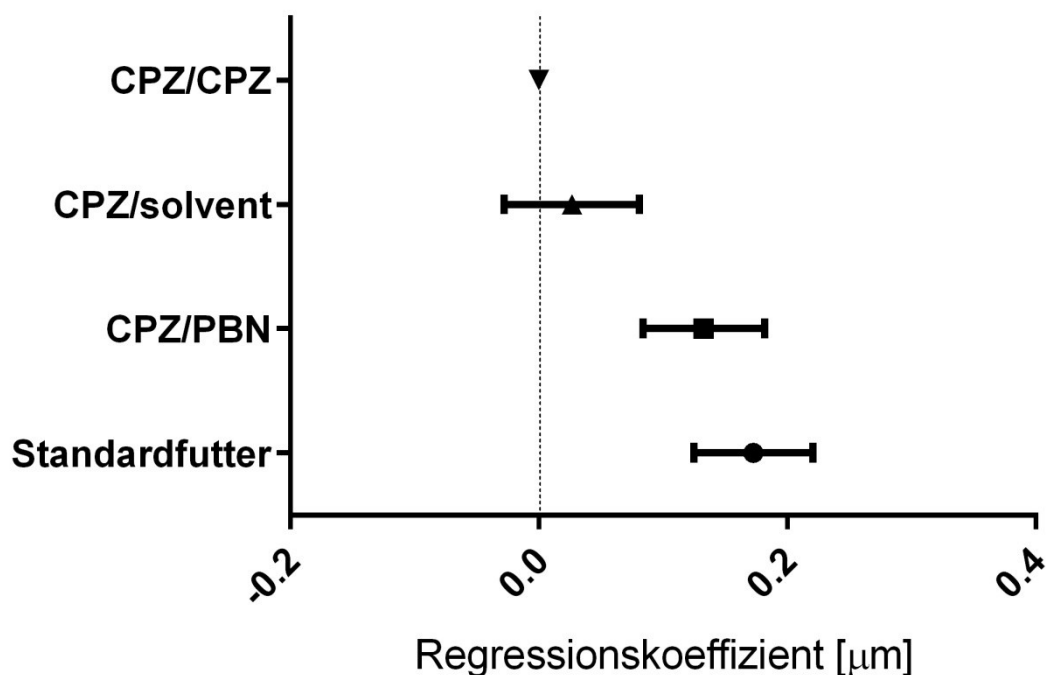


Abb. 4-8. GEE-Analyse der Axon-Durchmesser

Darstellung der Regressionskoeffizienten mit 95%-Konfidenzintervallen nach GEE-Analyse der medianen Axon-Durchmesser bezogen auf die Gruppe CPZ/CPZ. Es zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Gruppen CPZ/PBN und CPZ/CPZ, als auch zwischen Standardfutter und CPZ/CPZ, jedoch nicht zwischen CPZ/solvent und CPZ/CPZ.

Weiterhin wurden auf transmissionselektronischen Aufnahmen von optischen Nerven g-ratios der Axone berechnet, um über die Axon-Durchmesser-Auswertung hinaus die Breite der Myelinschicht beziehungsweise den Grad der Demyelinisierung objektiv zu bestimmen und diese Eigenschaft innerhalb der Versuchsgruppen zu vergleichen. Die bestimmten g-ratio Bildmediane wurden mithilfe der GEE im Gruppenvergleich gegeneinander aufgetragen. Hierbei wurde die Gruppe CPZ/CPZ als Referenz-Gruppe definiert. In dieser Auswertung zeigte sich die g-ratio der Standardfutter-Gruppe um den Wert 0,104 ([-0,160; -0,048], $p < 0,001$) kleiner als die g-ratio der Gruppe CPZ/CPZ. Auch die g-ratio, die in der CPZ/solvent-Gruppe bestimmt wurde, unterschied sich von der g-ratio der CPZ/CPZ-Gruppe um -0,063 ([-0,119; -0,007], $p = 0,028$). Die g-ratio der CPZ/PBN-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der medianen g-ratio der CPZ/CPZ-Gruppe (-0,012 [-0,102; 0,079], $p = 0,798$). Die kleinste mediane g-ratio wurde mit 0,75 [0,74; 0,77] in der Standardfutter-Gruppe festgestellt, die Gruppe CPZ/PBN wies einen Wert von 0,82 [0,80; 0,92] auf, die Gruppe CPZ/solvent 0,80 [0,79; 0,81] und die Gruppe CPZ/CPZ 0,84 [0,82; 0,92].

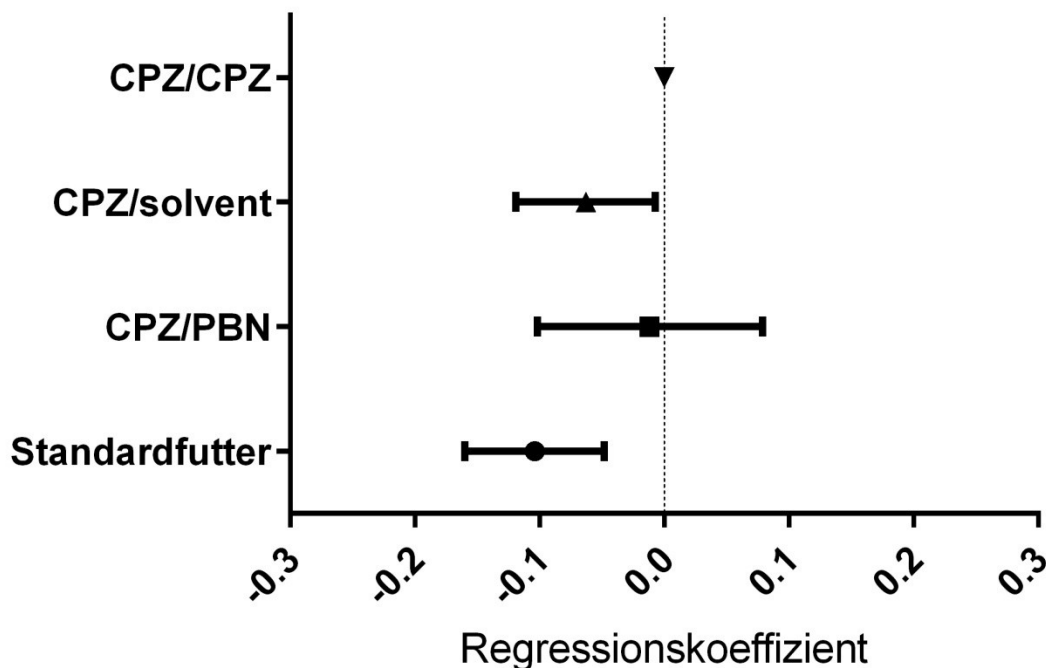


Abb. 4-9. GEE-Analyse der g-ratios

Darstellung der Regressionskoeffizienten mit 95%-Konfidenzintervallen nach GEE-Analyse der medianen g-ratios bezogen auf die Gruppe CPZ/CPZ. Es zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Gruppen CPZ/solvent und CPZ/CPZ, als auch zwischen Standardfutter und CPZ/CPZ, jedoch nicht zwischen CPZ/PBN und CPZ/CPZ.

4.2 Ergebnisse des EAE-Modells

4.2.1 EAE-Score

Die folgenden Auswertungen wurden mir von Frau Dr. rer. nat. Nadine Hainz zur Verfügung gestellt.

Nach Immunisierung der Tiere wurde deren klinische Symptomatik täglich gemäß des im Methodenteil angegebenen Scoring-Systems beurteilt. Bei Ausscheiden bzw. Euthanasie eines Tieres wurde dessen Score-Wert auf 5 gesetzt und das Tier bis Versuchsende unter diesem Wert weitergeführt. Die täglichen mittleren Score-Werte der Tiere einer Gruppe wurden bestimmt und im Gruppenvergleich als Verlaufskurve gegeneinander aufgetragen. Es war zu beobachten, dass sich bei den immunisierten Tieren ungefähr ab dem 12. Tag eine beginnende Symptomatik ausbildete, die im Verlauf zunahm. Klinisch erkennbare unerwünschte Wirkungen der Probenecid- oder Solvent-Therapie konnten nicht festgestellt werden.

Ergebnisse EAE 100 mg Probenecid Versuch

Im EAE 100 mg Probenecid Versuch nahmen die Tiere der Gruppe EAE die größten mittleren Score-Werte an. Ein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich konnte jedoch an keinem Tag festgestellt werden.

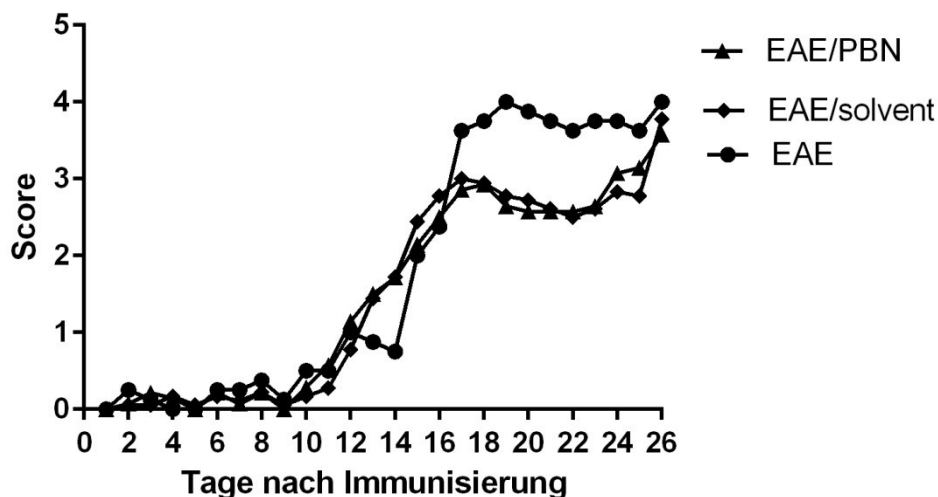


Abb. 4-10. Krankheitsverlauf der Tiere im EAE 100 mg Probenecid Versuch

Dargestellt ist der Krankheitsverlauf der Tiere des EAE 100 mg Probenecid Versuchs in Abhängigkeit vom Tag nach der Immunisierung. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied im Gruppenvergleich festgestellt werden. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Mittelwert pro Gruppe pro Tag.

Ergebnisse EAE 250 mg Probenecid Versuch

Im EAE 250 mg Probenecid Versuch wurde nach Erreichen eines Score-Wertes von 2,0 den entsprechenden Tieren jeweils Probenecid bzw. Solvent verabreicht. Die klinische Symptomatik der Gruppen EAE und EAE/solvent nahm im Gegensatz zur klinischen Symptomatik der Gruppe EAE/PBN weiter deutlich zu. Um hier Unterschiede zwischen den Gruppen auszumachen, wurden die täglichen Score-Werte der einzelnen Gruppen nach statistischer Auswertung mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test miteinander verglichen. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil].

Beispielhaft sind bestimmte Tage im Folgenden aufgeführt. Zu Beginn der Therapie (Tag 0) lag der mediane und zugleich minimale Score-Wert jeder Gruppe bei 2,0, sodass von einem gleichen Startpunkt ausgegangen werden konnte. Dabei konnte an Tag 5 ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe EAE/PBN mit einem medianen Score von 2,5 [1,5; 2,5] und Gruppe EAE mit 3,0 ([2,5; 3,0], $p < 0,05$) festgestellt werden. An Tag 7 unterschied sich die Gruppe EAE/PBN mit einem medianen Score von 2,0 [1,5; 2,25] sowohl von der Gruppe EAE mit 2,75 ([2,5; 3,5], $p < 0,01$), als auch von der Gruppe EAE/solvent mit 2,5 ([2,5; 2,5], $p < 0,05$). Diese Unterschiede blieben bis zum Versuchsende an Tag 20 bestehen. Während die Gruppen EAE (5,0 [4,375; 5,0], Tag 20) und EAE/solvent (5,0 [3,0; 5,0], Tag 20) bis zu einem medianen Score von 5,0 anstiegen, wies die Gruppe EAE/PBN am letzten Tag einen medianen Score-Wert von 2,0 [1,0; 2,75] auf. Interessanterweise konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die klinische Symptomatik einiger Tiere der Gruppe EAE/PBN rückläufig war.

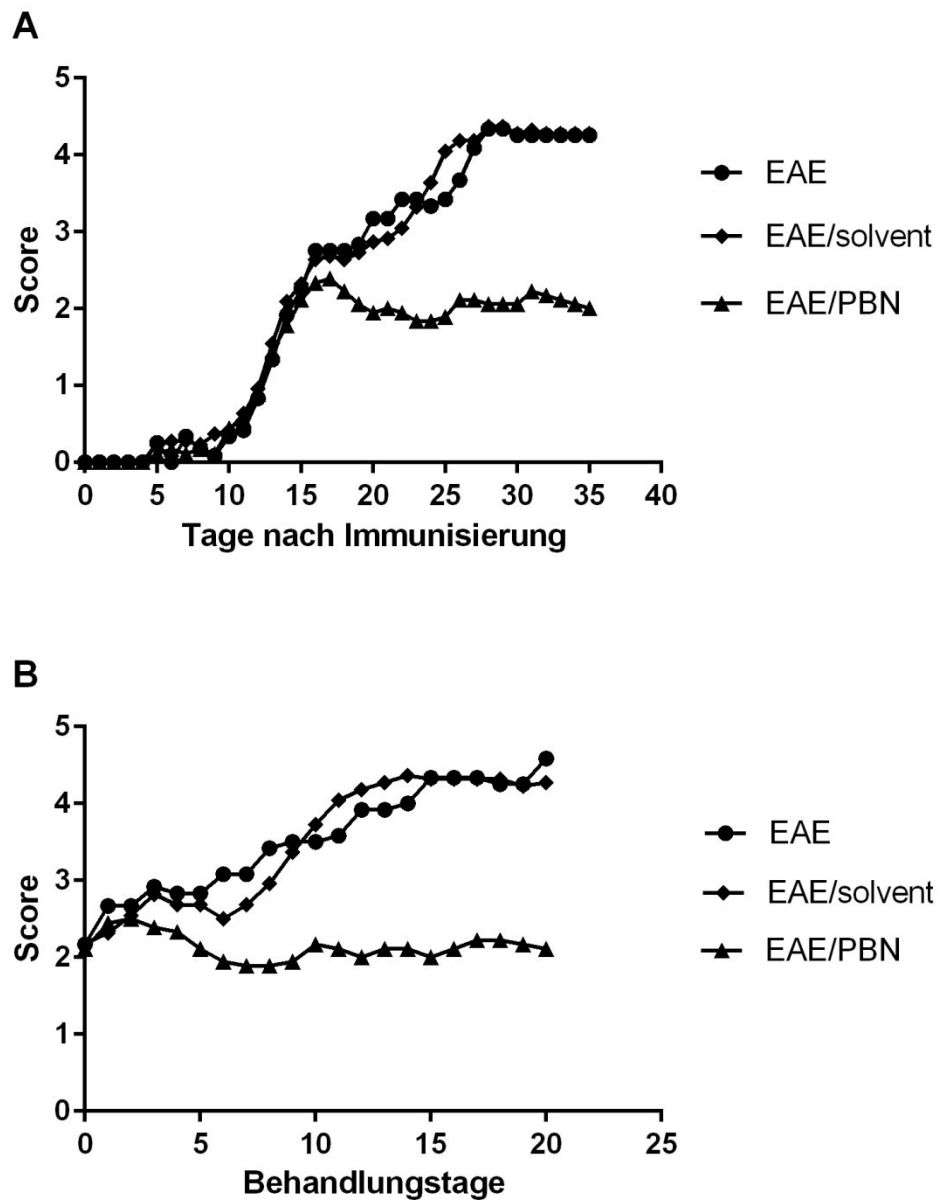


Abb. 4-11. Krankheitsverlauf der Tiere im EAE 250 mg Probenecid Versuch
 Dargestellt sind die Krankheitsverläufe der Tiere des 250 mg PBN Therapie-Versuchs in Abhängigkeit vom (A) Tag nach der Immunisierung und (B) Behandlungstag. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Mittelwert pro Gruppe pro Tag.

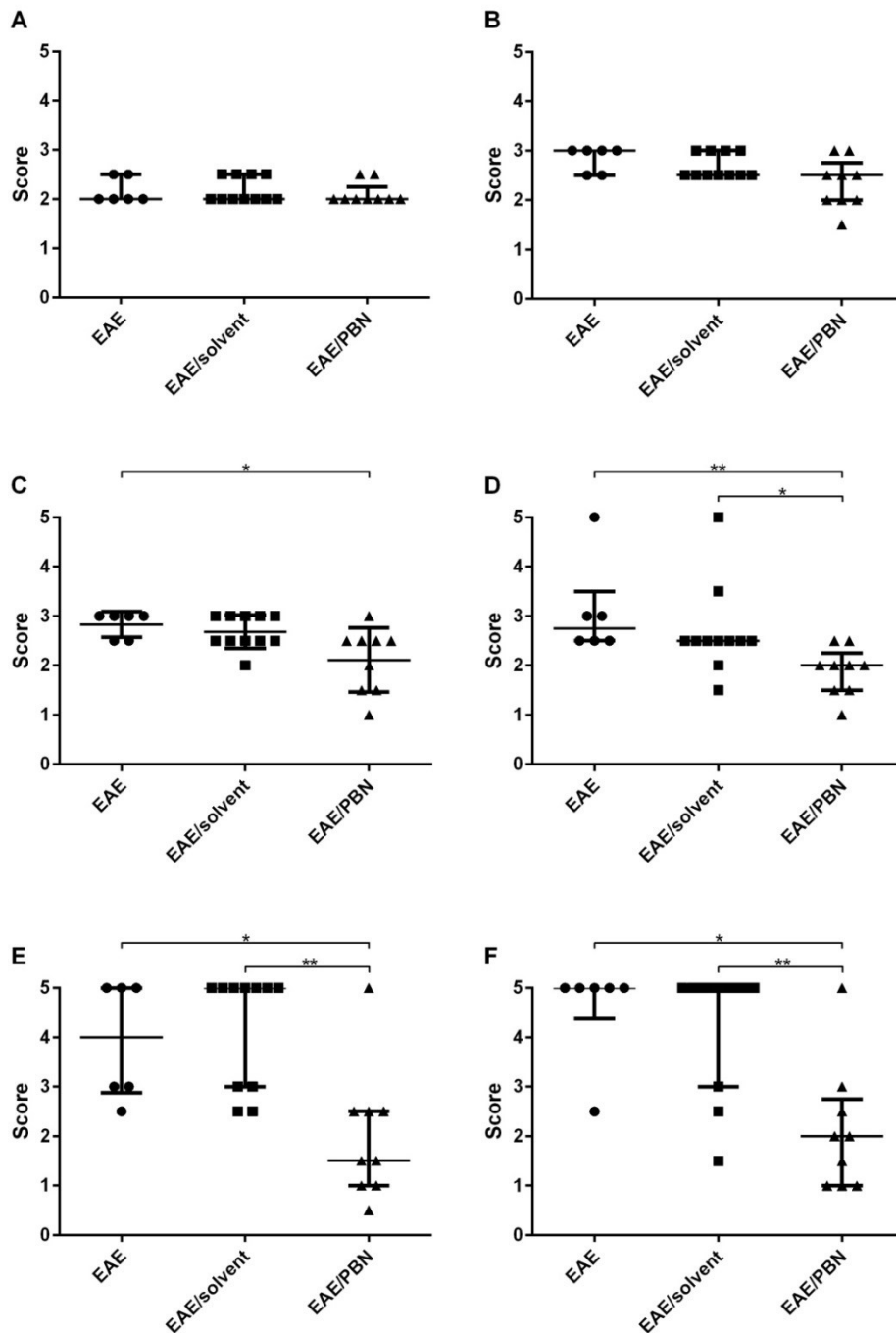


Abb. 4-12. Klinische Symptomatik an einzelnen Behandlungstagen im EAE 250 mg Probenecid Versuch
 Die Abbildung zeigt die klinische Symptomatik der Tiere an einzelnen Behandlungstagen im Gruppenvergleich nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Hierbei stellt Tag 0 (A) den Ausgangspunkt der klinischen Symptomatik zu Beginn der Therapie dar. Graphik B zeigt den Vergleich an Tag 4, Graphik C Tag 5, an dem ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen EAE/PBN und EAE beobachtet werden konnte. Ab Tag 7 (D) unterschied sich die Gruppe EAE/PBN signifikant von den beiden anderen Gruppen. Dieser Unterschied wurde bis zum Versuchsende noch deutlicher. Hierfür sind beispielhaft Tag 12 (E) und Tag 20 (F) dargestellt.

4.2.2 Durchflusszytometrie

Ergebnisse EAE 100 mg Probenecid Versuch

Die durchflusszytometrisch bestimmten absoluten und prozentualen Zellzahlen pro 100 μ l Blut und pro Milz wurden nach nicht-parametrischer Analyse mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test gegeneinander aufgetragen. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Sowohl in der Blutanalyse, als auch in der Analyse der Zellzahlen pro Milz zeigten sich in keiner Zellpopulation signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich.

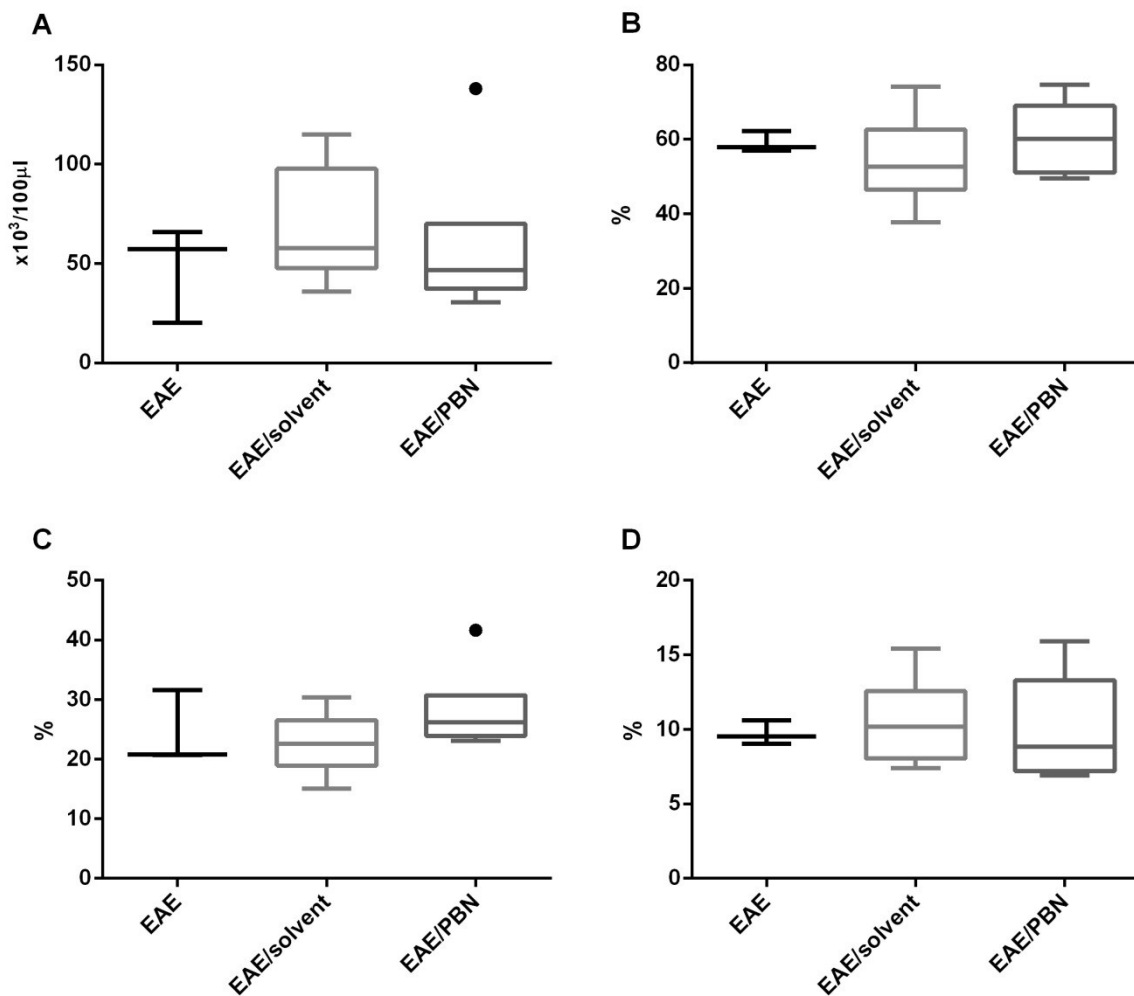


Abb. 4-13. Zellzahlen pro 100 μ l Blut im EAE 100 mg Probenecid Versuch

Die Abbildung stellt die Zellzahlen pro 100 μ l Blut der verschiedenen Zellpopulationen nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test dar. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Graphik A zeigt hierbei die absoluten Zellzahlen der Leukozyten pro 100 μ l Blut, Graphik B die prozentualen Anteile der Lymphozyten, Graphik C die prozentualen Anteile der CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten an allen Lymphozyten und Graphik D die prozentualen Anteile der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten an allen

CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten. Es wurden in keiner Zellpopulation signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich gefunden.

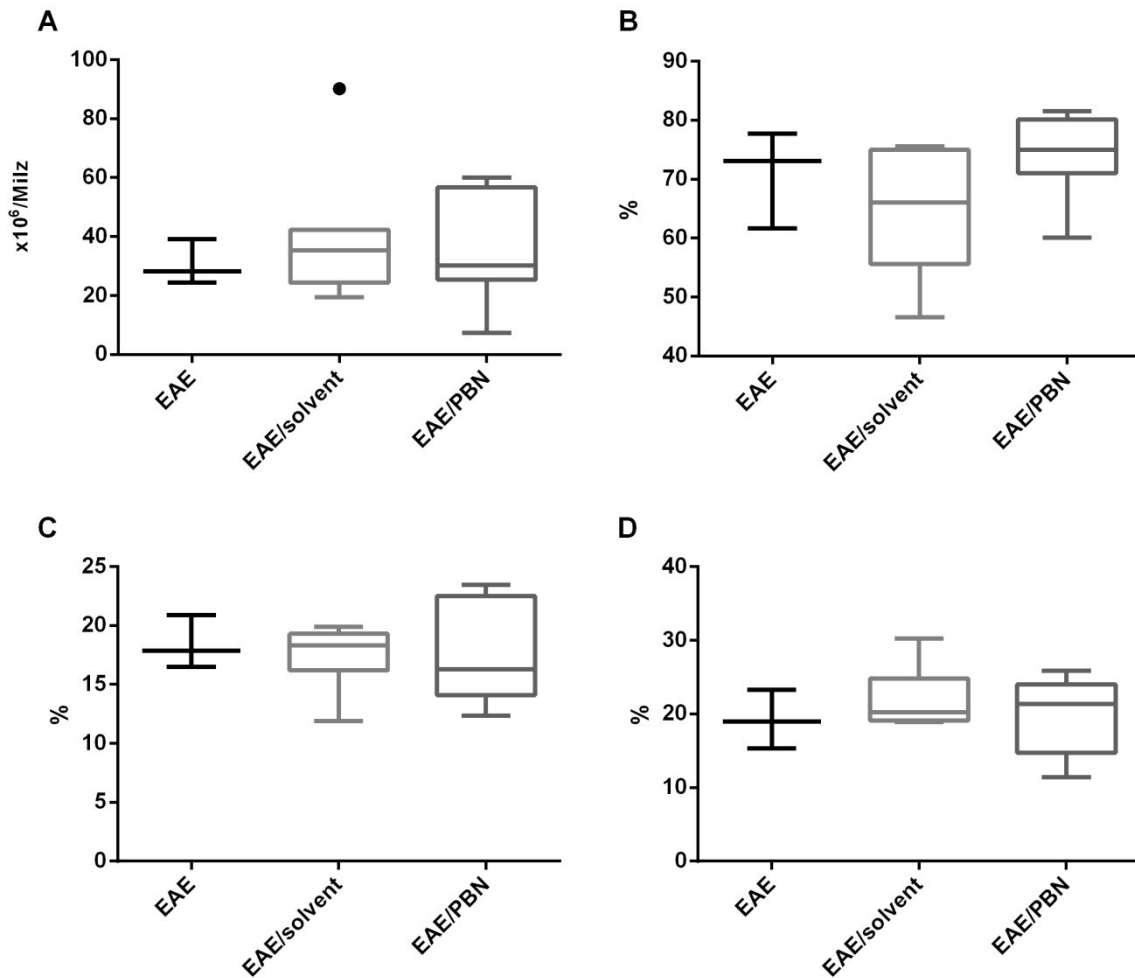


Abb. 4-14. Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch nach Oberflächenfärbung

Die Abbildung stellt die Zellzahlen pro Milz der verschiedenen Zellpopulationen nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test dar. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Graphik A zeigt hierbei die absoluten Zellzahlen der Leukozyten pro Milz, Graphik B die prozentualen Anteile der Lymphozyten, Graphik C die prozentualen Anteile der CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten an allen Lymphozyten und Graphik D die prozentualen Anteile der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten an allen CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten. Es wurden in keiner Zellpopulation signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich gefunden.

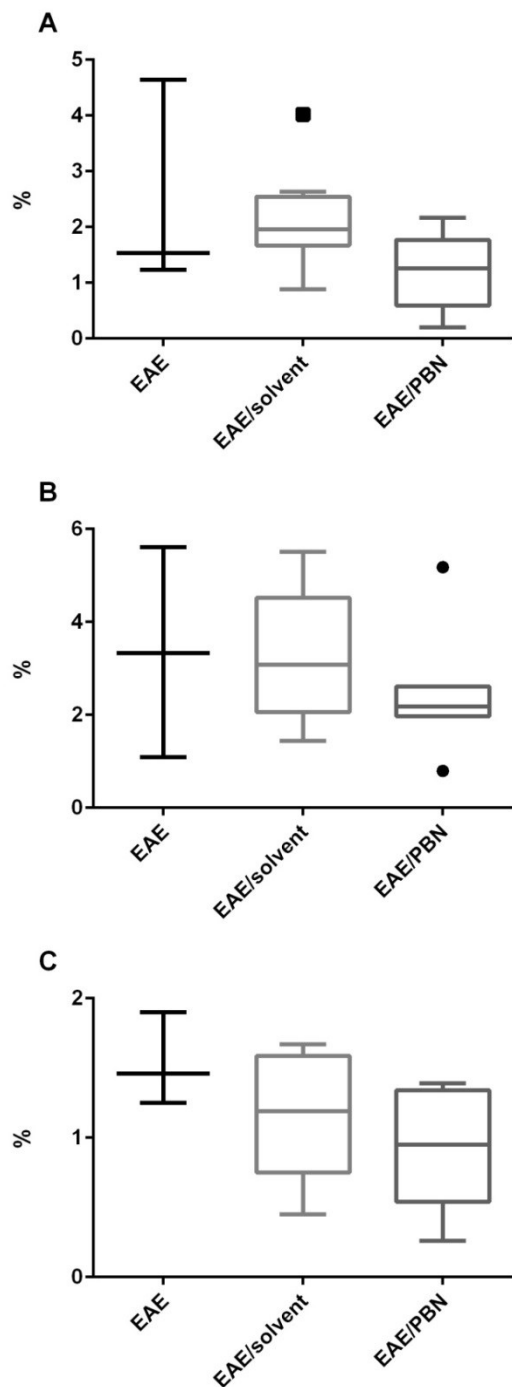


Abb. 4-15. Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch nach intrazellulärer Färbung
 Die Abbildung stellt Zellzahlen pro Milz der verschiedenen Zellpopulationen nach intrazellulärer Färbung und nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test dar. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Graphik A zeigt hierbei die prozentualen Zellzahlen der $\text{IFN-}\gamma^+$ Leukozyten pro Milz, Graphik B die prozentualen Anteile der FoxP3^+ Lymphozyten und Graphik C die prozentualen Anteile der IL-10^+ Lymphozyten an allen Lymphozyten. Es wurden in keiner Zellpopulation signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich gefunden.

Ergebnisse EAE 250 mg Probenecid Versuch

Um festzustellen, ob sich die unterschiedlichen Krankheitsverläufe im Auftreten von spezifischen Immunzellen widerspiegeln wurden auch in diesem Teilversuch durchflusszytometrisch bei jedem Tier Leukozyten bzw. Leukozyten-Untergruppen pro 100 μ l Blut und pro Milz als absolute und prozentuale Zellzahlen quantifiziert und nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test im Gruppenvergleich gegeneinander aufgetragen. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil].

In der Blutanalyse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der absoluten Leukozyten-Zellzahl. Im Gruppenvergleich der prozentualen Lymphozyten unterschied sich die Kontroll-Gruppe mit einem Median von 66,3% [62,7%; 73,5%] signifikant von der Gruppe EAE/solvent (44,0% [25,9%; 57,1%], $p < 0,01$), jedoch nicht von den Gruppen EAE (44,7% [40,2%; 62,3%], $p > 0,05$) und EAE/PBN (59,4% [51,5%; 67,2%], $p > 0,05$). Der prozentuale Anteil der $CD3^+CD4^+$ Lymphozyten an allen Lymphozyten war bei der Kontroll-Gruppe mit 17,7% [12,8%; 19,7%] am geringsten und signifikant kleiner als der Anteil der EAE-Gruppe (26,2% [23,3%; 31,1%], $p < 0,05$), er unterschied sich jedoch nicht vom prozentualen Anteil der EAE/PBN- (22,7% [17,3%; 26,7%], $p > 0,05$) und EAE/solvent-Gruppe (23,6% [20,8%; 27,4%], $p > 0,05$). Im Gruppenvergleich der $CD3^+CD4^+CD25^+$ Lymphozyten an $CD3^+CD4^+$ Lymphozyten traten keine Unterschiede auf.

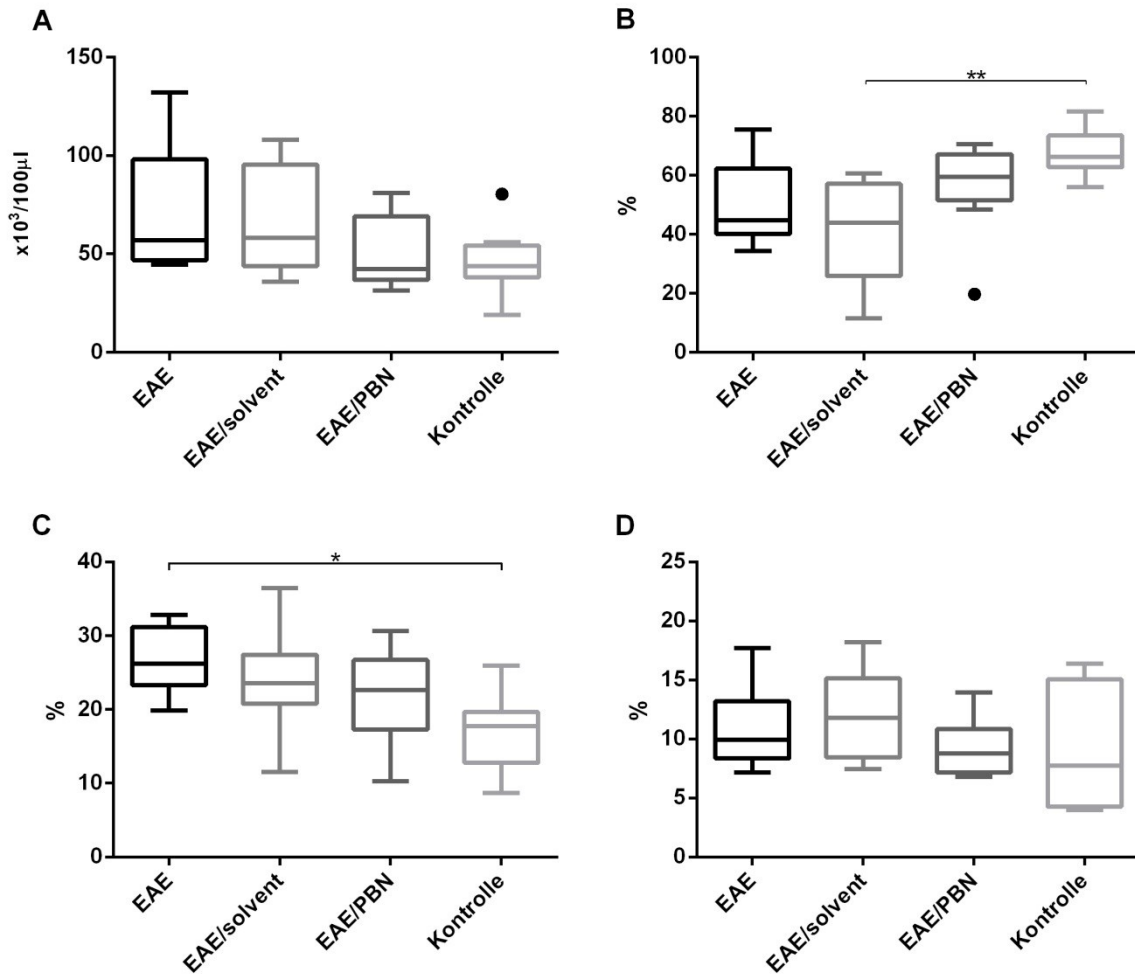


Abb. 4-16. Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 250 mg Probenecid Versuch

Die Abbildung zeigt die Zellzahlen pro 100 µl Blut im Gruppenvergleich nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Die in Graphik A dargestellte absolute Leukozyten-Zellzahl wies keine signifikanten Unterschiede auf. In Graphik B wird die prozentuale Lymphozyten-Zellzahl gezeigt. Die Kontroll-Gruppe, die den größten Anteil an Lymphozyten aufwies, unterschied sich signifikant von der Lymphozyten-Zellzahl der EAE/solvent-Gruppe, nicht jedoch von denen der EAE- und EAE/PBN-Gruppe. Der in Graphik C abgebildete prozentuale Anteil an CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten der Kontroll-Gruppe war signifikant kleiner als der der EAE-Gruppe, die den größten Anteil aufwies, unterschied sich jedoch nicht von EAE/PBN- und EAE/solvent-Gruppe. Im Gruppenvergleich der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten an CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten traten keine Unterschiede auf (D).

In der Zellanalyse der Milz wies die Kontroll-Gruppe mit $40,4 \cdot 10^6$ [$34,5 \cdot 10^6$; $61,0 \cdot 10^6$] Leukozyten pro Milz die größte Anzahl auf. Diese war signifikant größer als die der Gruppen EAE mit $17,8 \cdot 10^6$ ([$11,2 \cdot 10^6$; $36,4 \cdot 10^6$], $p < 0,01$), EAE/solvent mit $20,2 \cdot 10^6$ ([$17,6 \cdot 10^6$; $29,8 \cdot 10^6$], $p < 0,01$) und EAE/PBN mit $27,4 \cdot 10^6$ ([$21,2 \cdot 10^6$; $27,8 \cdot 10^6$], $p < 0,05$). Der prozentuale Anteil der Lymphozyten an allen Leukozyten war wiederum bei der Kontroll-Gruppe am größten (86,8% [75,1%; 87,5%]) und signifikant größer als der der EAE/solvent-Gruppe (71,3% [66,8%; 74,5%], $p < 0,01$), unterschied sich jedoch nicht von denen der EAE- (72,6% [61,3%; 81,7%], $p > 0,05$) und EAE/PBN-Gruppe (77,8% [75,5%; 78,8%], $p > 0,05$). Bezüglich der $CD3^+CD4^+$ Lymphozyten an allen Lymphozyten überstieg der prozentuale Anteil der EAE-Gruppe mit 24,0% [20,1%; 24,4%] signifikant die Anteile der EAE/PBN- mit 18,1% ([17,0%; 18,9%], $p < 0,05$) und der Kontroll-Gruppe mit 17,8% ([15,0%; 19,6%], $p < 0,05$), kein Unterschied hingegen wurde zwischen der EAE- und der EAE/solvent-Gruppe (20,9% [18,0%; 22,3%], $p > 0,05$) gefunden. Im Gruppenvergleich der prozentualen Anteile der $CD3^+CD4^+CD25^+$ Lymphozyten an $CD3^+CD4^+$ Lymphozyten traten keine Unterschiede auf. Bei der intrazellulären Färbung überstieg die Kontroll-Gruppe mit einem prozentualen Anteil von 3,3% [2,3%; 8,8%] $IFN-\gamma^+$ Leukozyten an allen Lymphozyten die Gruppe EAE mit 1,1% ([0,9%; 3,0%], $p < 0,05$) und die Gruppe EAE/PBN mit 1,3% ([1,0%; 1,6%], $p < 0,01$). Im Gruppenvergleich der $FoxP3^+$ Lymphozyten und $IL-10^+$ Lymphozyten wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

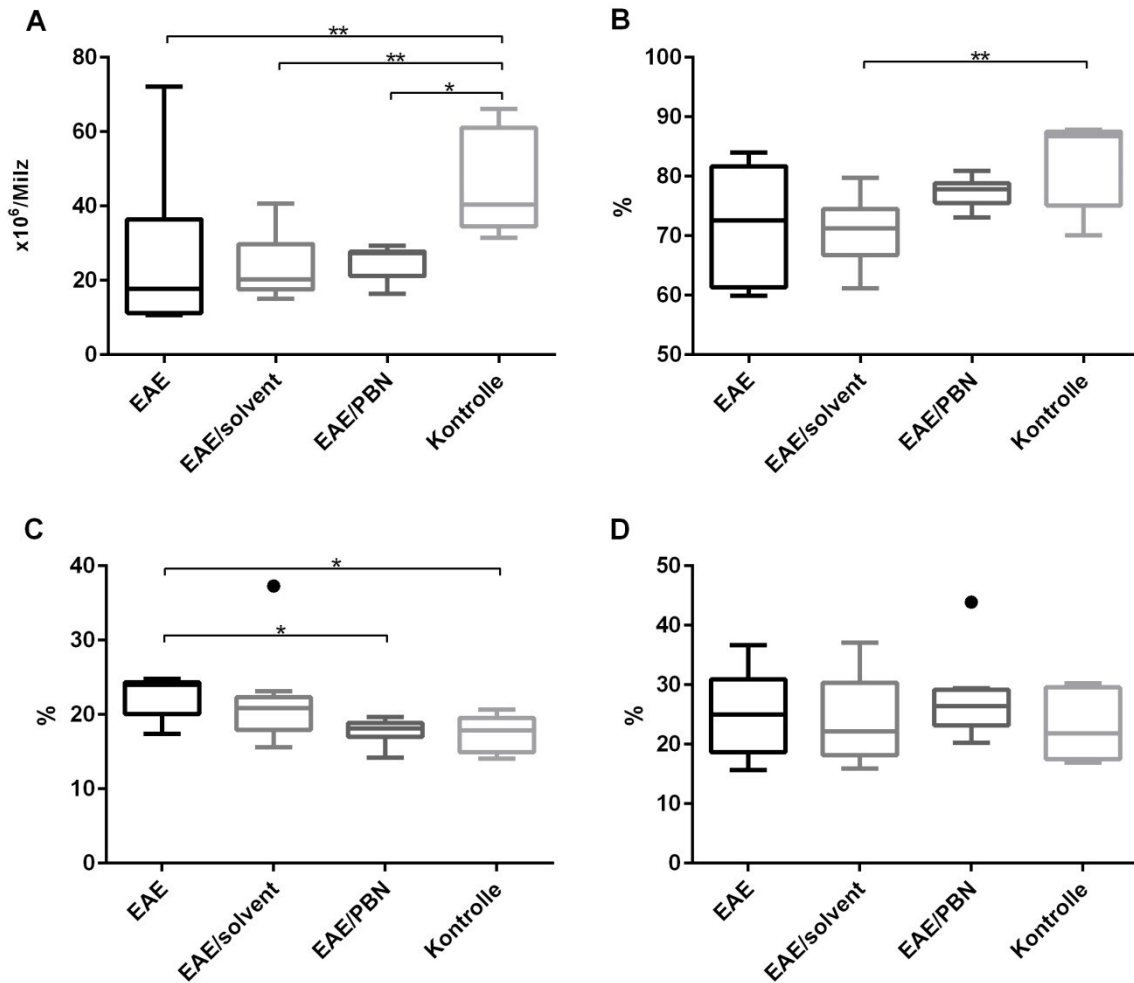


Abb. 4-17. Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch nach Oberflächenfärbung

Die Abbildung zeigt die Zellzahlen pro Milz im Gruppenvergleich nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. In Graphik A wird die absolute Leukozyten-Zellzahl dargestellt, hierbei wies die Kontroll-Gruppe die größte Anzahl an Leukozyten auf, die sich von allen übrigen Gruppen signifikant unterschied. In Graphik B wird die prozentuale Lymphozyten-Zellzahl gezeigt. Die Kontroll-Gruppe, die den größten Anteil an Lymphozyten aufwies, unterschied sich signifikant von der Lymphozyten-Zellzahl der EAE/solvent-Gruppe, nicht jedoch von denen der EAE- und EAE/PBN-Gruppe. Der in Graphik C abgebildete prozentuale Anteil an CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten der Kontroll-Gruppe war signifikant kleiner als der der EAE-Gruppe, die den größten Anteil aufwies. Dieser Wert der EAE-Gruppe war ebenfalls signifikant größer als der Anteil der EAE/PBN-Gruppe. Im Gruppenvergleich der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten an CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten traten keine Unterschiede auf (D).

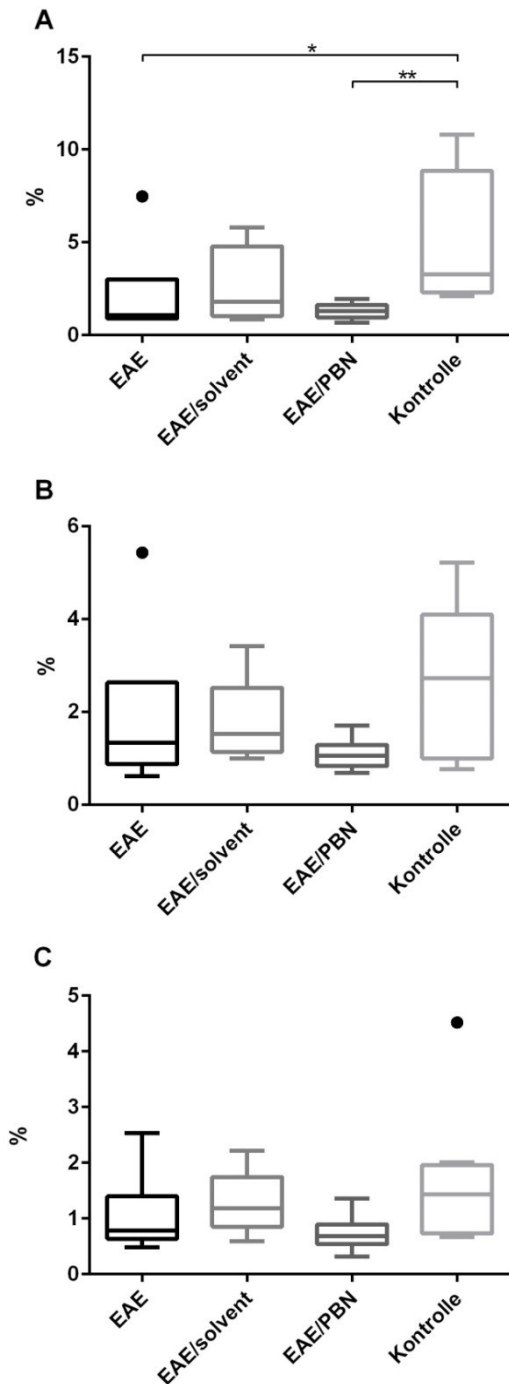


Abb. 4-18. Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch nach intrazellulärer Färbung
 Die Abbildung stellt Zellzahlen pro Milz der verschiedenen Zellpopulationen nach intrazellulärer Färbung und nach statistischer Analyse mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests als Globaltest und des Dunn's multiple comparisons-Tests als post-hoc Test dar. Die quantitativen Merkmale wurden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]. Graphik A zeigt hierbei die prozentualen Zellzahlen der $\text{IFN-}\gamma^+$ Leukozyten pro Milz, Graphik B die prozentualen Anteile der FoxP3^+ Lymphozyten und Graphik C die prozentualen Anteile der IL-10^+ Lymphozyten an allen Lymphozyten. Der Anteil der $\text{IFN-}\gamma^+$ Leukozyten der Gruppe Kontrolle war signifikant größer als die der Gruppen EAE und EAE/PBN. Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer Probenecid-Therapie in zwei Mausmodellen der Multiplen Sklerose zu untersuchen. Im CPZ-Modell sollte die Demyelinisierung im optischen Nerven untersucht und die Hypothese überprüft werden, ob Probenecid eine Demyelinisierung verringert. Im EAE-Modell stand die klinische Symptomatik der Versuchstiere im Mittelpunkt. In beiden Modellen sollten die zellulären Veränderungen in Blut und Milz durchflusszytometrisch festgehalten werden.

Probenecid ist ein bekanntes Medikament, das seit über 60 Jahren als Therapeutikum beim Menschen zugelassen ist (Talbot, 1953). Diese langjährige Erfahrung im Umgang mit dem Medikament in Verbindung mit einem geringen Nebenwirkungsprofil (Talbot, 1953) sprechen für einen Einsatz von Probenecid über die Gichttherapie hinaus. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass sich Probenecid im EAE-Mausmodell eignet, die EAE-Symptomatik zumindest hinauszuzögern (Hainz et al., 2016). Hierbei wurde die Substanz präventiv eingesetzt. Die präventive Applikation vor eigentlichem Krankheitsbeginn entspricht jedoch weniger den Therapieansätzen der menschlichen MS, bei der bisher keine primär- präventiven Maßnahmen im Vordergrund stehen. Daher wurde in weiteren Versuchen ein therapeutischer Ansatz gewählt, um der tatsächlichen MS-Situation zu entsprechen.

Im CPZ-Modell ist beschrieben, dass eine Demyelinisierung am deutlichsten im Corpus callosum detektiert werden kann (Matsushima and Morell, 2001; Steelman et al., 2012). Aus diesem Grund wurden zunächst Frontalschnitte des Gehirns im Bereich des Corpus callosum histologisch angefärbt, um diese unter dem Lichtmikroskop zu betrachten. Hierzu wurden vier verschiedene Färbungen durchgeführt, die alle nur inkonstante Unterschiede zeigten, die nicht zu quantifizieren waren. Eine mögliche Erklärung, warum sich in der Lichtmikroskopie keine Veränderungen zeigten, ist, dass die Demyelinisierung nach 20 Tagen CPZ-Diät zu gering und bei zu wenigen Axonen ausgeprägt war, um diese mit der zu wenig detaillierten Methode der Lichtmikroskopie zu identifizieren. Diese Annahme konnte später in der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung, die eine Differenz im Gruppenvergleich im Bereich von zehntel Mikrometern angab, verifiziert werden.

Aus diesen transmissionselektronenmikroskopischen ultrastrukturellen Querschnittsaufnahmen des optischen Nervens wurde zunächst eine Untersuchung der Axon-Durchmesser durchgeführt. Hier trat die größte Diskrepanz zwischen den Standardfüttertieren und der Gruppe CPZ/CPZ, also der nicht behandelten Gruppe, auf. Dies war zu erwarten, da durch die 20-tägige CPZ-Diät eine Demyelinisierung ausgelöst wurde, die durch eine Verminderung der

Myelinschicht auch eine Abnahme des Axon-Durchmessers mit sich zog. Eine Demyelinisierung gleicher Art ist ebenfalls in der CPZ/solvent-Gruppe nachgewiesen worden. Der mediane Axon-Durchmesser der CPZ/PBN-Gruppe unterschied sich jedoch signifikant von dem der CPZ/CPZ-Gruppe, aber nicht von dem der Standardfutter-Gruppe. Da sich die CPZ/PBN- und CPZ/solvent-Gruppe nur im Probenecid-Zusatz in der intraperitonealen Injektion unterschieden, ist anzunehmen, dass Probenecid eine Wirkung dahingehend zeigt, dass der Axon-Durchmesser im optischen Nerven während der CPZ-Diät nicht in dem Maße abnimmt, wie das in den Gruppen ohne PBN-Therapie der Fall war. Es könnte daher geschlussfolgert werden, dass Probenecid die Demyelinisierung verringert oder verzögert und somit die postulierte Hypothese zutrifft.

Ein Nachteil dieser Annahme stellt dar, dass der Axon-Durchmesser nicht direkt mit dem Ausmaß der Myelinscheide korreliert, da dieser auch noch den Durchmesser des Neuriten beinhaltet. Der Begriff „Neurit“ bezeichnet in dieser Arbeit einen efferenten Nervenzell-Fortsatz ohne Myelinscheide, der Begriff „Axon“ steht für einen Neuriten, der von einer Myelinscheide umgeben ist. Die CPZ-Diät wirkt sich jedoch in dieser Ausprägung auf die Oligodendrozyten, die die Myelinscheide im optischen Nerven bilden, aus und nicht auf die Neuronen, ein Teil derer der Neurit darstellt (Procaccini et al., 2015), was dafür spricht, dass der Axon-Durchmesser valide Informationen liefert, um Demyelinisierung zu quantifizieren. Trotzdem wurde zusätzlich, als weitere Auswertung, die g-ratio, ein objektiver Parameter für die Dicke der Myelinscheide, bestimmt, der unabhängig von Zu- oder Abnahmen des Neuriten-Durchmessers ist. Der hierbei festgestellte größte g-ratio-Median in der Gruppe CPZ/CPZ zeigt, dass in der CPZ/CPZ-Gruppe die am weitesten fortgeschrittene Demyelinisierung erfolgte. Geht man von der Axon-Durchmesser-Auswertung aus, wäre zu erwarten gewesen, dass eine kleinere g-ratio in der mit Probenecid therapierten Gruppe CPZ/PBN auftritt, die g-ratio der Gruppe CPZ/solvent jedoch im Bereich der der Gruppe CPZ/CPZ liegt. Im Gegenteil zu diesen Erwartungen unterschied sich die g-ratio der CPZ/PBN-Gruppe nicht signifikant, jedoch die g-ratio der CPZ/solvent-Gruppe signifikant von der der CPZ/CPZ-Gruppe. Beim Betrachten der Aufnahmen und der einzelnen Messwerte fiel auf, dass dies zustande gekommen sein kann, da sich ein Tier der Gruppe CPZ/PBN komplett von den anderen Tieren derselben Gruppe durch eine massive Demyelinisierung unterschied, was zu einer so großen Range der g-ratio der Gruppe CPZ/PBN führte. Es müsste in weiteren Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Tieren pro Gruppe überprüft werden, inwiefern dieses Ergebnis der kleinen Gruppengröße geschuldet ist, oder ob der Wert auch bei einer größeren Versuchstieranzahl konstant bleibt.

Man geht jedoch auch davon aus, dass größere g-ratio-Werte mit einer stärkeren Remyelinisierung einhergehen (Recks et al., 2013). Nachdem ein Neurit vollständig demyelinisiert ist, kann eine g-ratio von 1 angenommen werden. Im Durchschnitt verkleinert sich dieser Wert im Prozess der Remyelinisierung, was dazu führt, dass Axone im Anfangsstadium der Remyelinisierung ebenso hohe g-ratio-Werte annehmen, wie Axone im Endstadium der Demyelinisierung. Somit ist eine aussagekräftige Messung von Demyelinisierung schwierig, wenn De- und Remyelinisierung in einem auszuwertenden Bereich gleichsam ablaufen (Zendedel et al., 2013). Ein Vorteil des toxischen CPZ-Modells liegt darin, dass die CPZ-Diät zu einer kontinuierlichen Demyelinisierung führt, die nach 3 Wochen CPZ-Diät erstmals signifikant gemessen werden kann und nach 5-6 Wochen zu einer nahezu vollständigen Demyelinisierung fortgeschritten ist (Hiremath et al., 1998). Der Prozess der Remyelinisierung wird jedoch erst durch eine Futterumstellung auf Standardfutter ausgelöst (Blakemore, 1973; Gudi et al., 2014). Da eine Versuchsdauer von 20 Tagen vorlag und die Tiere während der gesamten Zeit CPZ-Futter bekamen, ist davon auszugehen, dass Remyelinisierungs-Prozesse in der Gruppe CPZ/CPZ eine eher untergeordnete Rolle spielen und sich Axone mit hohen g-ratio-Werten im Stadium der Demyelinisierung befinden. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse auch bestätigt. Beachtet werden muss hierbei, dass diese Zeitangaben aus Untersuchungen des Corpus callosum hervorgehen. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass unterschiedliche Hirnregionen unterschiedlich von der CPZ-induzierten Pathologie betroffen sind (Goldberg et al., 2015). In dieser Untersuchung wurde ebenfalls festgestellt, dass, im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen, im Tractus opticus keine Demyelinisierung selbst nach 5 Wochen CPZ-Diät abgelaufen war (Goldberg et al., 2015). Da der Tractus opticus jedoch eine Fortsetzung des optischen Nerven darstellt, in dem die Axone der gleichen retinalen Ganglienzellen wie im optischen Nerven verlaufen, wäre die logische Konsequenz, dass dieser durch die CPZ-induzierte Demyelinisierung in gleicher Weise betroffen wäre. Da dies jedoch nicht der Fall zu sein scheint, kommt die Frage auf, welche Unterschiede in diesen beiden Hirnregionen dazu führen, dass das gleiche Axon im optischen Nerv demyelinisiert, während es im Tractus opticus von einer CPZ-induzierten Myelinpathologie nicht betroffen ist. Goldberg et al. haben jedoch den Tractus opticus ausschließlich lichtmikroskopisch und nicht elektronenmikroskopisch untersucht. Möglich wäre also auch, dass nach 5 Wochen CPZ-Diät die Demyelinisierung im Tractus opticus noch zu gering ausgeprägt war, um diese lichtmikroskopisch zu detektieren. Wäre diese Annahme richtig und es gäbe keine Unterschiede zwischen Oligodendrozyten im Bereich des optischen Nerven und

Oligodendrozyten im Bereich des Tractus opticus, stellt sich jedoch auch die Frage, warum Oligodendrozyten im optischen Nerven bzw. im Tractus opticus weniger anfällig zu sein scheinen, als beispielsweise Oligodendrozyten im Corpus callosum.

Eine interessante Frage ist auch, warum eine Demyelinisierung bei einigen Axonen früher auftritt beziehungsweise schneller voranschreitet, während andere Axone in direkter Nachbarschaft davon weniger betroffen sind. Möglicherweise hängt die Anfälligkeit der Axone im toxischen CPZ-Modell auch vom der Ausgangsgröße der Axone ab, sodass anfänglich schwach myelinisierte zusätzlich noch stärker demyelinisieren. Xiu et al. haben beispielsweise gezeigt, dass eine Abnahme von myelinisierten Axonen im Corpus callosum während einer 6 wöchigen CPZ-Diät hauptsächlich bei dünneren Axonen auftrat und sich im Vergleich zur Standardfutter-Gruppe keine Unterschiede bei Axonen über 0,8 μm zeigten (Xiu et al., 2016).

Weiterhin muss die Morphologie der Myelinpathologie miteinbezogen werden. Beispielsweise muss bei der Lamellenstruktur der Umwicklungen beachtet werden, ob ein größerer Abstand zwischen einzelnen Lamellen vorliegt, oder ob diese dicht gepackt sind. Eine geschädigte Myelinscheide mit wenigen isolierenden Lamellen, die große Zwischenräume aufweisen, führt ebenso zu einer niedrigen g-ratio, wie eine nicht geschädigte Myelinscheide mit vielen isolierenden Lamellen ohne sichtbare Zwischenräume. Diese Tatsache schwächt natürlich die Aussagekraft der g-ratio, aber auch die der Axon-Durchmesser-Auswertung, was dazu führen muss, dass eine alleinige Angabe von g-ratio und Axon-Durchmesser nicht unbedingt ausreichen kann. Hier kann eine Beschreibung weiterer morphologischer Merkmale, wie die der Lamellenstruktur, eine im g-ratio- oder Axon-Durchmesser-Gruppenvergleich getroffene Aussage untermauern oder schwächen. Um eine solche Verfälschung zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit Bereiche der Axone mit einer sich auflösenden Lamellenstruktur nicht in die Messung einbezogen.

Nichtsdestotrotz wurde in der Axon-Durchmesser-Auswertung gezeigt, dass Probenecid einen Effekt auf Demyelinisierungs-Vorgänge hat, wenn auch nicht bei jedem Versuchstier, was aus der Beurteilung der g-ratio-Auswertung hervorgeht. Die Frage, die sich zwangsläufig stellt, ist, wie Probenecid auf den pathologischen Mechanismus der CPZ-induzierten Myelinpathologie einwirken kann. Es wird angenommen, dass die Verabreichung von CPZ eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch Mikroglia zur Folge hat (Pasquini et al., 2007). Diese inflammatorische Komponente kann ein möglicher Angriffspunkt von Probenecid sein. Über Pannexin-1 Kanäle wird das Inflammasom, ein Teil des angeborenen Immunsystems, aktiviert, was in der Freisetzung des proinflammatorischen

Zytokins IL-1 β mündet, wodurch ein Entzündungsgeschehen ausgelöst werden kann (Martinon et al., 2002). Die Blockade dieser Pannexin-1 Kanäle durch das Medikament Probenecid kann eine Möglichkeit darstellen inflammatorische Vorgänge therapeutisch zu mindern (Dahl and Keane, 2012). Der Mechanismus wird weiter unten genauer erläutert. Das Vorkommen von IL-1 β steht jedoch auf der anderen Seite mit einer besseren Remyelinisierung in Zusammenhang (Mason et al., 2001), was diese These schwächt. Eine Inflammation-hemmende Therapie durch Probenecid kann möglicherweise auch den Neuritenschaden, der nach Demyelinisierung aufgrund des nicht mehr vorhandenen Schutzes durch die Myelinscheide eintreten kann, positiv beeinflussen, da eine verminderte Inflammation wohl mit einer geringeren axonalen Schädigung einhergeht (Zendedel et al., 2013).

Neben der inflammatorischen Komponente wird davon ausgegangen, dass oxidativer Stress zur Cuprizin-induzierten Myelinpathologie beiträgt. In vitro wurde bereits gezeigt, dass Probenecid oxidativen Stress und neuronalen Zelltod vermindert (Du et al., 2016). Dies stärkt die Annahme, dass eine Reduktion des oxidativen Stresses in den Oligodendrozyten durch Probenecid eine weitere Möglichkeit darstellt, wie Probenecid eine Demyelinisierung verringert. Neben der direkten oxidativen Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies können diese möglicherweise auch zusätzlich zu einer Inflammation-Aktivierung führen (Zhou et al., 2010), was eine Verbindung zwischen beiden vermuteten Pathomechanismen herstellt. Somit kann auch diese sekundär durch reaktive Sauerstoffspezies entstandene Inflammation ebenfalls durch Probenecid vermindert werden.

Hinzu kommt, dass im CPZ-Modell massiv erhöhte p38-mitogenaktivierte Proteinkinase-Werte gefunden (p38 MAPK) wurden (Solti et al., 2015). Diese führen unter anderem zur Produktion von oxidativem Stress und induzieren Apoptose (Miloso et al., 2008). Gleichzeitig wird diese Signalkaskade im ZNS von IL-1 β aktiviert (Srinivasan et al., 2004), wodurch eine Inhibition von IL-1 β durch Probenecid eine Inhibition des p38 MAPK-Signalwegs und damit eine verminderte ROS-Produktion und herabgesetzte Apoptose-Rate zur Folge hätte. Ob dieser p38-Anstieg im CPZ-Modell auch im Zusammenhang mit IL-1 β steht, müsste noch geklärt werden.

Interessanterweise war der prozentuale Anteil der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten in der Standardfutter-Gruppe sowohl im Blut als auch in der Milz signifikant höher als in allen CPZ-Gruppen, während in den anderen Zellpopulationen keine Unterschiede im Gruppenvergleich auftraten. Möglicherweise hat hier eine geringe systemische Begleit-Inflammation durch die CPZ-Diät eine Endothelaktivierung mit nachfolgender Reduktion der Lymphozyten bewirkt

(Dimitrov et al., 2009; Nourshargh and Alon, 2014). Gegen diese Vermutung spricht, dass die Unterschiede fast ausschließlich in der Population der CD25⁺ Zellen gefunden wurden. Also kann die These aufkommen, dass diese Zellen im CPZ-Modell vermindert auftreten, ohne dass dies durch eine Probenecid- oder Solvent-Therapie beeinflusst wurde. Scheld et al. haben den relativen Anteil CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen in zervikalen Lymphknoten von CPZ- und Standardfutter-Tieren miteinander verglichen und herausgefunden, dass hierbei die CPZ-Diät Immunzellzahlen nicht beeinflusst. Der Anteil der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen war in deren CPZ-Gruppe sogar signifikant leicht erhöht, was ein abweichendes Ergebnis zu unserer Untersuchung darstellt (Scheld et al., 2016). Der Unterschied in diesen beiden Untersuchungen stellt der intrazelluläre Marker FoxP3⁺ dar, der spezifisch regulatorische T-Zellen nachweist. Diese sind zwar auch CD25⁺, es gibt aber auch CD25⁺ Zellen, die nicht zwangsläufig FoxP3⁺ sind, da CD25⁺ auch von aktivierten T-Helferzellen exprimiert wird (Plitas and Rudensky, 2016). Somit könnte die verminderte Zahl CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten daran liegen, dass eine verminderte Aktivierung der T-Helferzellen stattgefunden hatte. In jedem Fall müsste eine Unterscheidung der CD25⁺ T-Zellen mittels FoxP3⁺-Anfärbung durchgeführt werden, um eine sichere Aussage treffen zu können. Herder et al. haben eine verminderte FoxP3⁺-Expression im ZNS von Mäusen eines Virus-induzierten Mausmodells der Multiplen Sklerose nach Verabreichen von CPZ-Futter gefunden (Herder et al., 2012). Dies spricht in dem von uns durchgeführten Versuch für eine Erniedrigung der Tregs, die die Immunantwort herabsetzen (Plitas and Rudensky, 2016) und die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen erhöhen (Kleinewietfeld and Hafler, 2014), was zur Folge hätte, dass eine durch CPZ ausgelöster verminderter Schutzmechanismus im Anschluss zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine Autoimmunantwort im CPZ- Modell führt. Scheld et al. haben Tiere nach mehrwöchiger CPZ-Diät im Anschluss mit MOG-Peptid immunisiert bzw. autoreaktive MOG-spezifische Lymphozyten in diese transferiert. Sie haben herausgefunden, dass erst durch die vorausgehende CPZ-Diät ein Auftreten von Immunzellen in bestimmten Teilen des Gehirns erfolgte. Die Begründung war, dass erst eine neurodegenerative Vorschädigung eine Invasion von Immunzellen ermöglicht. Übertragen auf die MS könnte somit eine Neuroprotektion „neurodegenerative“ und „inflammatorische Aspekte“ verbessern (Scheld et al., 2016). Aus diesem Grund wäre es interessant zu sehen, ob eine Probenecid-Therapie eine positive Wirkung mit sich bringt. Unsere Untersuchungen zeigten, dass Probenecid möglicherweise neuroprotektiv wirken kann. Folglich wäre es möglich, dass durch eine Probenecid-Therapie die durch CPZ induzierten neurodegenerativen Prozesse positiv beeinflusst und so ein Auftreten von MOG-spezifischen Lymphozyten in

deren Modell vermindert oder sogar verhindert werden kann. Dies wurde im EAE-Modell auch bereits nachgewiesen. Untersuchungen des Rückenmarks von Mäusen haben gezeigt, dass eine Probenecid-Therapie die Anzahl von T-Lymphozyten signifikant verringert (Hainz et al., 2016).

Auch die CPZ/solvent-Gruppe zeigte eine Veränderung in der g-ratio im Vergleich zur CPZ/CPZ-Gruppe. Diese beiden Gruppen unterschieden sich jedoch nur durch den täglichen Umgang und die intraperitoneale Injektion, was die Möglichkeit offenlässt, dass auch damit in Verbindung stehende Ursachen auf Demyelinisierung einwirken. Eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse durch den Umgang mit den Tieren oder die täglichen Injektionen (Deutsch-Feldman et al., 2015) verzögert möglicherweise den Untergang von Oligodendrozyten und eine damit verbundene Demyelinisierung.

In weiterer Forschung könnte der Versuchsaufbau etwas abgeändert werden, beispielsweise durch Verlängerung der Versuchsdauer. Bei Betrachten der Aufnahmen fiel auf, dass bei einigen Tieren bereits eine große Anzahl an demyelinisierten Axonen vorlag, während bei Tieren der gleichen Gruppe nur geringe Veränderungen zu beobachten waren. Diese Veränderungen könnten sich möglicherweise über einen längeren Zeitraum mitteln, was einen noch besseren Vergleich der Gruppen ermöglicht. Da sich im CPZ-Modell ohne therapeutische Intervention erst nach 5-6 Wochen eine komplette Demyelinisierung zeigt (Kipp et al., 2009), wäre dieser Zeitraum anzustreben. Möglicherweise kann hier eine längere Probenecid-Therapie die Demyelinisierung verlangsamen.

Der Beginn der Therapie stellt ebenfalls einen wichtigen Punkt dar. Da ein Oligodendrozyten-Zelltod im CPZ-Modell bereits nach ca. 1 Woche beginnt (Gudi et al., 2014), liegt bei einer Probenecid-Therapie ab dem 10. Tag ein therapeutischer Ansatz vor, der die Situation der menschlichen Multiplen Sklerose am besten widerspiegelt.

Auch der Wechsel zu einem anderen Mausmodell der Multiplen Sklerose, wie beispielsweise der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, die eher auf die immunologische Komponente der MS-Pathologie abzielt, kann vielleicht die Hypothese, dass eine Therapie mit Probenecid eine günstige Wirkung auf Demyelinisierungsvorgänge hat, weiter untermauern. Hier wurde bereits gezeigt, dass die Wirkung von Probenecid dosisabhängig ist, da eine niedrige Dosis von 100 mg/kg KG pro Tag nicht ausgereichte, um den klinischen Score der Tiere signifikant zu verbessern. Eine Dosis von 250 mg/kg KG pro Tag konnte ein Fortschreiten der Symptomatik erfolgreich aufhalten.

Nichtsdestotrotz wurde in der Untersuchung gezeigt, dass Probenecid einen Einfluss auf Vorgänge, die in Zusammenhang mit Demyelinisierungs-Prozessen im CPZ-Modell stehen,

hat. Dieser erscheint zunächst gering, könnte sich jedoch bei einer Probenecid-Therapie über einen längeren Zeitraum, mit höherer Probenecid-Dosis oder in einem anderen Mausmodell stärker ausprägen.

Die tägliche Score-Untersuchung der Tiere in den EAE-Versuchen hat gezeigt, dass Probenecid im EAE-Modell den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann (Hainz et al., 2017). Schon in vorangegangenen Untersuchungen führte eine präventive Probenecid-Therapie, eine Verabreichung vor dem Auftreten erster Symptome, zu einer signifikanten Verbesserung der Klinik der Tiere (Hainz et al., 2016). Der protektive Ansatz ist nur bedingt übertragbar auf die Therapie der MS nach dem Auftreten von Symptomen (Constantinescu et al., 2011), lässt gegebenenfalls aber Rückschlüsse auf eine mögliche Schubprophylaxe durch Probenecid zu. Um den therapeutischen Effekt von Probenecid in der symptomatischen Phase der Erkrankung zu untersuchen, wurden die Probenecid- bzw. Solventgaben in einem zweiten Versuchsansatz erst bei Erreichen des Scores 1,0 (EAE 100 mg Probenecid Versuch) bzw. 2,0 (EAE 250 mg Probenecid Versuch) begonnen. Die Behandlung mit 100 mg Probenecid pro kg KG brachte keinen signifikanten Vorteil für Tiere der EAE/PBN- im Vergleich zur EAE- und EAE/Solvent-Gruppe. Auf der einen Seite könnte hier ein zu weit fortgeschrittenes Krankheitsstadium vorliegen, wodurch eine Probenecid-Therapie zu diesem Zeitpunkt nichts mehr nützte, um ein Voranschreiten der Symptomatik aufzuhalten bzw. diese sogar zu vermindern. Auf der anderen Seite zeigte die Gruppe EAE/PBN jedoch die geringsten Score-Werte, wenn sich diese auch nicht signifikant von den Score-Werten der anderen Gruppen unterschieden. Folglich konnte jetzt vermutet werden, dass Probenecid zwar eine Wirkung zeigt, die Dosis von 100 mg jedoch zu gering war, um diese Wirkung signifikant zu belegen. Diese These wird auch dadurch gestützt, dass in der durchflusszytometrischen Untersuchung des EAE 100 mg Probenecid Versuchs in keiner Lymphozyten-Population in der Milz oder im Blut Unterschiede durch eine Probenecid-Therapie festgestellt werden konnten. Zu beachten ist jedoch, dass eine nicht systemische aktive ZNS-Infektion nicht zwangsläufig Veränderungen im peripheren Blut oder in lymphatischen Organen hervorrufen muss. Obwohl die Immunisierung durch eine subkutane Injektion und somit das infektiöse Geschehen außerhalb des ZNS beginnt, könnte diese nach 20 Tagen hauptsächlich im ZNS ablaufen. Andererseits ist bekannt, dass sich im EAE-Modell nur ein verschwindend geringer Teil der autoreaktiven T-Zellen im ZNS aufhält, während die meisten im Blut und den peripheren lymphatischen Organen zirkulieren (Targoni et al., 2001).

Aus diesem Grund wurde ein zweiter therapeutischer Versuchsansatz durchgeführt, in dem die Probenecid-Dosis auf 250 mg/kg KG pro Tag erhöht und die Tiere erst ab einem Score-

Wert von 2,0 behandelt wurden. Dieser abgeänderte Versuch konnte deutlich zeigen, dass eine Probenecid-Therapie im Schnitt ein Voranschreiten der klinischen Symptomatik der Maus im EAE-Modell verhindert, da die mit Probenecid therapierten Gruppe EAE/PBN in ihrem Score während der Behandlung nicht weiter anstieg. Sieht man sich jedoch die einzelnen Score-Werte der Tiere dieser Gruppe am letzten Versuchstag an (s. Abb. 4-12), fällt auf, dass bei 4 von 9 Tieren die klinische Symptomatik sogar deutlich abgenommen hat. Dies spricht natürlich dafür, dass die Therapie nicht nur ein Voranschreiten aufhält, sondern auch eine Symptomverbesserung mit sich bringt. Auch dieser Teilversuch könnte nochmals durch eine Verlängerung des Behandlungszeitraums oder durch einen Behandlungsbeginn bei geringerer Klinik modifiziert werden.

Die Frage, die hier aufkommt, ist, welche Prozesse im EAE-Modell durch Probenecid beeinflusst werden, um den Vorteil der EAE/PBN-Gruppe gegenüber der EAE- und EAE/solvent-Gruppe zu verursachen. Man hat herausgefunden, dass Probenecid Pannexin-Kanäle und P2X7-Rezeptoren blockiert (Silverman et al., 2008). Daher kann davon ausgegangen werden, dass dieser Angriffspunkt an fast ubiquitär vorkommenden Pannexin-Kanälen und P2X7-Rezeptoren ein Ausgangspunkt mehrerer Prozesse mit unterschiedlichen und weitreichenden Folgen darstellt, von dem ausgehend verschiedene Mechanismen der Oligodendrozyten- und Neuronen-Schädigung ablaufen.

Diese ATP-abhängigen Panx1-Kanäle und P2X7-Rezeptoren sind an der Inflammasom-Aktivierung, die in einer Freisetzung des Zytokins IL-1 β münden, maßgeblich beteiligt. IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das pyrogen wirkt, verschiedene Arten von Leukozyten aktivieren kann (Dinarello, 2011) und schließlich in einer Entzündungsreaktion mit Zellzerstörung mündet. Im EAE-Modell ist IL-1 generell eines der entscheidenden Zytokine, ohne das eine EAE-Entstehung nicht möglich ist, da Mäuse, die den Interleukin-1-Rezeptor nicht exprimieren, keine EAE-Symptomatik entwickeln (Pare et al., 2017; Schiffenbauer et al., 2000). Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Therapie mit IL-1-Rezeptor-Antagonisten eine verminderte Symptomatik im EAE-Modell bewirkt (Martin and Near, 1995) und eine Probenecid-Behandlung in vitro aufgrund seiner Eigenschaft als Inhibitor von Pannexin-Kanälen und P2X7-Rezeptoren zu einer verminderten Expression und Ausschüttung von IL-1 β in bestimmten Zellen führt (Kanjamekanant et al., 2014). Aufgrund dieser Tatsachen kann also geschlussfolgert werden, dass in Folge einer verminderten Inflammasom-Aktivierung durch Probenecid, eine verminderte Ausschüttung von IL-1 β zu einer verminderten klinischen Symptomatik führt. Die Voraussetzung hierfür muss jedoch sein, dass Probenecid auf bestimmte Zellen wirkt, die direkt oder indirekt an einer Schädigung von

Oligodendrozyten im ZNS beteiligt sind. Diese Zellen sind also auf der einen Seite Zellen, die IL-1 β ausschütten, wie Makrophagen und Neutrophile Granulozyten, und auf der anderen Seite Zellen, die von IL-1 β aktiviert werden, wie Lymphozyten. Von Pare et al. wurde die Beteiligung von IL-1 β in der Pathogenese des EAE-Modells detailliert rezensiert: Nachdem aktivierte Leukozyten, Neutrophile Granulozyten und Monozyten ins ZNS eingewandert sind, schütten die Neutrophilen Granulozyten und die aus den Monozyten entstandene Makrophagen IL-1 β aus (Levesque et al., 2016). Das Zytokin wirkt einerseits auf Endothelzellen der BBB, wodurch es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der BBB kommt, was zu einer erleichterten und vermehrten Migration von weiteren Entzündungszellen führt. Diese Migration wird dadurch verstärkt, dass die Endothelzellen ebenfalls Zytokine ausschütten, die weitere Entzündungszellen auf der vaskulären Seite zur Migration anregen und auf der perivaskulären Seite als positiver Rückkopplungsmechanismus zu einer vermehrten IL-1 β -Produktion führen. Als weitere Eigenschaft bewirken die von Endothelzellen ausgehenden Zytokine eine Differenzierung der Makrophagen zu Antigenpräsentierenden Zellen, die ihrerseits eine Reaktivierung der eingewanderten autoreaktiven CD4⁺ Lymphozyten verursachen (Pare et al., 2017). Diese reaktivierten myelin-spezifischen T-Zellen setzen wiederum Zytokine, die Mikroglia und andere eingewanderte Immunzellen aktivieren, frei und schädigen mit diesen gemeinsam durch Ausschüttung von Enzymen, freien Radikalen und anderen zytotoxischen Stoffen die Myelinscheide und daraufhin auch die nicht mehr geschützten Neuriten (Fletcher et al., 2010).

Im Gegensatz zum CPZ-Versuch, bei dem Unterschiede im Gruppenvergleich der Zellzahlen nur in der Population der CD25⁺ Zellen auftraten, zeigten sich in den EAE-Versuchen in dieser Population keinerlei Differenzen. Vergleicht man hier die Zahlen der Standardfutter-Gruppe des CPZ-Modelles mit den EAE-Gruppen und der Kontroll-Gruppe beider EAE-Versuche, so liegen alle prozentualen Werte der CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten im Bereich um 20%, während alle Gruppen, die eine CPZ-Diät erhielten Werte um 10% zeigten. Diese Verminderung der prozentualen CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten-Anteile kann nicht außer Acht gelassen werden. Geschlussfolgert bedeutet dies, dass eine CPZ-Diät eine recht starke selektive Abnahme an CD25⁺ Zellen zur Folge hat.

Daneben können interessanterweise proinflammatorische Th17-Zellen, denen eine Autoimmunerkrankung-begünstigende Komponente und eine entscheidende Rolle an der EAE-Entstehung zugesprochen wird, aus immunsuppressiv wirkenden FoxP3⁺ Tregs entstehen (Koenen et al., 2008). Diese Differenzierung wird durch IL-1 β begünstigt und gesteigert. Hinzu kommt, dass IL-1-Rezeptorantagonisten die Anzahl IL-17-produzierender

Zellen vermindern (Koenen et al., 2008). Weiterhin vermindert IL-1 eine Expression von FoxP3 in bestimmten T-Lymphozyten, was möglicherweise entscheidend zur Differenzierung der regulatorischen T-Zelle zur Th17-Zelle beiträgt (Ikeda et al., 2014). Somit kann IL-1 das Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und immunsuppressiven T-Zellen hin zur Seite der proinflammatorischen T-Zellen verlagern, so dass autoreaktive T-Zellen einer Immunsuppression entgehen und ihre autoimmune Komponente entfalten können (Ikeda et al., 2014; Pare et al., 2017). Die Schlussfolgerung, die sich daraus ziehen ließe, ist, dass im Gegenzug durch eine Verminderung von IL-1 β , beispielsweise durch eine Probenecid-Therapie, ein vermindertes Auftreten von CD4⁺ Th17-Zellen und ein vermehrtes Auftreten von regulatorischen T-Zellen in den mit Probenecid therapierten Versuchsgruppen nachzuweisen ist. Ein Indiz für diese Vermutung gibt die prozentuale Zellzahl an CD3⁺CD4⁺ Lymphozyten in der Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch. Hier konnte eine signifikant niedrigere Zellzahl der Gruppe EAE/PBN im Vergleich zur Gruppe EAE festgestellt werden, während sich die Gruppe EAE/solvent von der Gruppe EAE nicht unterschied.

Interessant ist hier, dass der prozentuale Anteil der CD3⁺CD4⁺ Zellen der EAE-Gruppe die Anteile der Kontroll-Gruppe und der EAE/PBN in der Milz überstieg. Man könnte also davon ausgehen, dass bei zwar gleichgebliebener Treg-Anzahl die Anzahl der autoreaktiven CD4⁺ T-Helferzellen in der EAE-Gruppe am Ort der Antigenpräsentation im peripheren lymphatischen Organ zugenommen hat, während dies durch eine Probenecid-Therapie unterblieb. Das bedeutet, dass das Gleichgewicht zwischen autoreaktiven T-Helferzellen und hemmenden Tregs in der EAE-Gruppe zu Gunsten der T-Helferzellen verlagert wurde und somit eine verminderte Inhibition der Autoimmunreaktion stattfand. Dies könnte durch Probenecid vermindert werden, was sich aufgrund des ausgeglichenen Verhältnisses schädigender und inhibierender Zellen positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken könnte. Gestützt wird dieses Argument durch eine These der MS-Pathogenese, bei der vermutet wird, dass ein vermindertes Auftreten von Tregs eine Krankheitsentstehung begünstigt (Viglietta et al., 2004).

Hinzu kommt, dass die Aktivierung und Proliferation, aber auch die Differenzierung der naiven, im Thymus entstandenen, antigenspezifischen T-Zelle mit noch niedriger Affinität zu ihrem Antigen zur myelin-spezifischen Effektor-T-Zelle mit hoher Affinität in peripheren lymphatischen Organen, wie der Milz, abläuft. Dies geschieht durch die Präsentation des Selbstantigens durch die APC an die naive T-Zelle und muss in einer Umgebung von bestimmten Zytokinen, zu denen auch IL-1 β gehört, ablaufen, um erfolgreich zu sein (Kuerten and Lehmann, 2011). Die bisher beschriebenen Mechanismen beruhen auf der

Inflammasom-aktivierenden Komponente des Pannexin-1-Kanal/P2X7-Rezeptor-Komplexes mit anschließender Signalkaskade und vermehrter Freisetzung von IL-1 β , das über seinen Rezeptor an der Immunantwort beteiligt ist. Neben diesem indirekten Mechanismus über IL-1 β scheinen auch Pannexin-Kanäle auf der Zelloberfläche von CD4⁺ Lymphozyten direkt an der Pathogenese einer ZNS-Entzündung beteiligt zu sein.

An dieser Stelle rückt eine weitere Funktion der Pannexin-Kanäle, die auch direkt an der ATP- und Ca²⁺- abhängigen T-Zell-Aktivierung beteiligt sind, in den Vordergrund. Wöhrle et al haben herausgefunden, dass eine Inhibition von Pannexin-1 Kanälen, die ATP-Freisetzung, den Ca²⁺-Einstrom und die damit verbundene IL-2-Expression, ein für die T-Zellproliferation verantwortlichen Zytokin, unterdrücken (Woehrle et al., 2010). Folglich waren in den Milzuntersuchungen der EAE-Gruppen erhöhte CD4⁺ Zellzahlen zu erwarten. Da jedoch die EAE/PBN-Gruppe eine signifikant kleinere Zahl CD4⁺ Zellen aufwies, könnte hier eine verminderte Freisetzung von IL-1 β und eine direkte Hemmung der Kommunikation an der immunologischen Synapse, durch Probenecid die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der T-Zellen herabgesetzt und sich auch auf diesem Weg hemmend auf die Autoimmunreaktion auswirken. Hinzu kommt ein weiterer direkter Mechanismus von Pannexin-Kanälen als Bestandteil von T-Zellen. Es wurde herausgefunden, dass CD4⁺ Lymphozyten, die mit Probenecid vorbehandelt wurden, eine verminderte Transmigration im Vergleich zu nicht vorbehandelten CD4⁺ Lymphozyten *in vitro* zeigten (Velasquez et al., 2016). Dies deutet darauf hin, dass eine Öffnung von Pannexin-Kanälen benötigt wird, um aktive Zellbewegung von CD4⁺ Lymphozyten zu ermöglichen. Weiterhin wurde auch *in vivo* gezeigt, dass Pannexin1-Kanäle im EAE-Modell benötigt werden, um eine Migration von CD4⁺ Lymphozyten ins ZNS zu gewährleisten (Velasquez et al., 2016).

Eine Blockade der Pannexin-Kanäle durch Probenecid könnte daher einerseits durch eine direkte Wirkung auf autoreaktive Myelin-spezifische T-Zellen und andererseits indirekt durch eine Wirkung über den IL-1 β -Signalweg auf Zellen der BBB und unterstützende Zellen, wie Makrophagen und Neutrophile Granulozyten, die pathogenen T-Lymphozyten am Eindringen in ZNS hindert. Hier würde also die Wirkung von Probenecid als Medikament darauf beruhen, dass die schädigenden Zellen nicht zu ihrem Antigen gelangen und somit auch nicht ihre zellschädigende Wirkung entfalten können. Dieser Mechanismus erscheint auch für eine Verwendung in der MS-Therapie erfolgversprechend, da im EAE-Modell bereits gezeigt werden konnte, dass durch Hinderung der Leukozyten-Migration über die BBB eine EAE-Entstehung erfolgreich verhindert wird. Antikörper gegen das Integrinmolekül $\alpha 4\beta 1$ verhindern die Leukozyten-Adhäsion an Hirngefäßen und somit deren Übertritt ins

Hirnparenchym (Yednock et al., 1992). Dieser Wirkmechanismus wird im Medikament Natalizumab bereits beim Menschen in der MS-Therapie genutzt (van Pesch et al., 2016). Das Problem mit diesem Medikament und der Grund, warum es nur als Zweitlinientherapeutikum bei Patienten, deren Standardtherapie versagt, eingesetzt wird, sind unerwünschte Wirkungen (UAW), beispielsweise eine mögliche Entstehung einer schwerwiegenden Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (Fletcher et al., 2010). Hier wäre also ein Medikament, das einen ähnlichen Wirkmechanismus bei weniger unerwünschten Wirkungen zeigt, oder eine Kombination mit einem solchen, um die Dosis und damit die Rate dieser UAW zu reduzieren, wünschenswert.

Zusammengefasst kann Probenecid in seiner Eigenschaft als Inhibitor von Panx-1-Kanälen während der EAE-Pathogenese Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und Migration von Immunzellen beeinflussen.

In unseren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Probenecid in zwei unterschiedlichen Mausmodellen der Multiplen Sklerose konzentrationsabhängig positive Auswirkungen auf das Krankheitsgeschehen hatte. Vorgänge, die eine Probenecid-Therapie auf mikroskopischer und zellulärer Ebene verursacht, konnten durch die Versuche und durch Zuhilfenahme der Forschung anderer Arbeitsgruppen hinreichend erklärt werden. Es fehlt noch, die Frage zu beantworten, inwiefern sich diese Feststellungen und Schlussfolgerungen auf die menschliche Erkrankung, die Multiple Sklerose, übertragen lassen.

Der größte Vorteil, den Probenecid mit sich bringt und der von einer Vielzahl an Autoren bereits aufgeführt wurde, ist die langjährige Erfahrung mit dem Medikament. Es zeigt ein geringes Auftreten von unerwünschten Wirkungen und ist seit Jahrzehnten ein zur menschlichen Therapie zugelassenes Medikament (Dahl and Keane, 2012). Hier ist jedoch zu beachten, dass Probenecid in einer Dosis von höchstens 3 g pro Tag (Robbins et al., 2012), laut Fachinformation (Fachinformation Probenecid Biokanol®, 2014) von 2g pro Tag, angewendet wird. In der hier durchgeführten Untersuchung wurde mit einer Probenecid-Dosis von 250 mg/kg KG pro Tag erfolgreich therapiert, was bei einer 70 kg schweren Person 17,5 g pro Tag, also einer vielfach höheren Dosis entspricht. Bei dieser Menge könnten sich die zuvor beschriebenen geringen Nebenwirkungen stärker ausprägen oder sehr seltene UAW, wie beispielsweise eine Leberzellschädigung oder Blutbildveränderungen (Fachinformation Probenecid Biokanol®, 2014), häufiger auftreten. Als Anhaltspunkt hierfür wurde bereits gezeigt, dass die meisten UAW bei der höchsten Dosierung von 3 g auftraten (Boger and Strickland, 1955). Daneben müssen auch die Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln beachtet werden.

Die Übertragung des positiven Effektes des Probenecids vom EAE-Modell der Maus auf die Multiple Sklerose des Menschen ist möglicherweise nicht ganz so einfach, wie er erscheint. Dinarello beispielsweise unterscheidet sehr deutlich zwischen auto-inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen insofern, dass Autoimmunerkrankungen auf einer Dysregulation des erworbenen, hingegen auto-inflammatorischen Erkrankungen, bei denen dem Zytokin IL-1 β eine entscheidende Rolle zugespielt wird, auf einer Dysregulation der angeborenen Immunabwehr beruhen. Im Gegensatz zu auto-inflammatorischen Erkrankungen sind Autoimmunerkrankungen oft HLA-assoziiert, durch ein Vorkommen von autoreaktiven T-Zellen oder Autoantikörpern gekennzeichnet und zeigen ein Ansprechen auf Medikamente wie beispielsweise TNF- α Blocker, die bei auto-inflammatorischen Erkrankungen keine Wirkung zu zeigen scheinen (Dinarello, 2011). Diese Feststellung spricht natürlich zumindest teilweise gegen eine Wirksamkeit von Probenecid als anti-IL-1 β wirkende Substanz in der MS-Therapie, da die Hauptthese zur Pathogenese der Multiplen Sklerose einen T-Zell-vermittelten Mechanismus beinhaltet. Es gibt aber auch Ausnahmen, wie beispielsweise die Rheumatoide Arthritis (RA), eine mögliche Begleiterkrankung der MS (Marrie et al., 2015), bei der ebenfalls, wie bei der Multiplen Sklerose, die Pathogenese nicht vollständig geklärt ist und eine autoimmune Komponente angenommen wird (Derksen et al., 2017). Bei dieser Erkrankung sind sowohl der IL-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra, als auch TNF- α Blocker zur Therapie zugelassen. Hinzu kommt, dass sich eine Behandlung von RA-Patienten, die bisher keine demyelinisierende Erkrankung aufwiesen, mit Anakinra im Vergleich zur Anti-TNF- α -Therapie günstiger auf ein Auftreten von demyelinisierenden Vorgängen während einer RA-Therapie auswirkte (Bernatsky et al., 2010).

Es gibt Anhaltspunkte, die nahelegen, dass IL-1 β auch in einem Zusammenhang zur Multiplen Sklerose steht. Ein hohes Verhältnis von IL-1 β zu seinem natürlichen IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-RN) korreliert mit einem familiär erhöhten Krankheitsrisiko (de Jong et al., 2002). Weiterhin wurde in ZNS-Läsionen erkrankter Patienten IL-1 β nachgewiesen, das gemeinsam mit Makrophagen und Mikrogliazellen auftrat (Cannella and Raine, 1995) Zusätzlich senken zur MS-Therapie zugelassene Medikamente den IL-1 β -Spiegel im Blut bzw. gehen mit einer erhöhten Konzentration von IL-1-RN einher (Pare et al., 2017). T-Lymphozyten, sowohl im EAE-Modell als auch bei MS-Patienten, exprimieren IL-Rezeptoren, deren Stimulation durch IL-1 β zur Ausschüttung weiterer Zytokine führt. Die genauen Mechanismen der Beteiligung von IL-1 β an der Erkrankung sind noch nicht geklärt oder es sind nur indirekte Zusammenhänge bekannt (Pare et al., 2017). Es kommt hinzu, dass IL-1 auch positive Effekte bezogen auf Oligodendrozyten-Differenzierung und

Remyelinisierung im Mausmodell gezeigt hat, was bedeutet, dass eine Therapie, die gegen IL-1 gerichtet ist, auch gegen Remyelinisierung, mit einer geringer Remissionsrate assoziiert wäre. Trotzdem spricht die Evidenz einer Beteiligung von IL-1 β an der Pathogenese der Multiplen Sklerose zusammen mit den erfolgversprechenden Ergebnissen aus Tierversuchen für eine Therapie mit IL-1 β als Angriffspunkt auch bei autoimmunen Erkrankungen, was es noch klinisch zu untersuchen gilt (Dinarello and van der Meer, 2013).

Weitere Punkte, die eine Anwendung von Probenecid klar stützen und befürworten, sind seine direkten positiven Wirkungen in Bezug auf die Demyelinisierung, die unabhängig von inflammatorischen Geschehnissen sind, wie beispielsweise durch Verminderung von reaktiven Sauerstoffspezies. Aber auch die Beeinflussung der Migration über die BBB könnte erfolgversprechend sein.

6 Fazit

Abschließend ist zu sagen, dass Probenecid in zwei Mausmodellen der Multiplen Sklerose, die auf unterschiedlichen Pathomechanismen beruhen, eine günstige Wirkung zeigt.

Im CPZ-Modell konnten ultrastrukturell signifikante Vorteile einer Probenecid-Therapie ausgemacht werden. Aufgrund des toxischen Geschehens in diesem Modell gibt dieses Ergebnis einen starken Hinweis darauf, dass Probenecid direkt auf mit Demyelinisierung in Verbindung stehenden Vorgängen Einfluss nimmt. Da aber auch Veränderungen im Auftreten bestimmter Leukozyten ausgemacht werden konnten, sind Immunzellen möglicherweise nicht unbeteiligt an der CPZ-induzierten Myelin-Pathologie (Solti et al., 2015) und werden ebenfalls von Probenecid günstig beeinflusst. Somit konnte die signifikante Reduktion von Demyelinisierung wahrscheinlich durch eine Kombination aus Beeinflussung toxischer und immunologischer Vorgänge erreicht werden. Beachtet werden muss jedoch, dass die Unterschiede noch sehr gering ausgeprägt waren. Das größte Problem stellt die kurze Versuchsdauer von nur ca. 3 Wochen dar. Hier sollten die Versuche in ähnlicher Weise mit einer Dauer von mindestens 5 Wochen wiederholt werden, sinnvoll wäre in diesem Modell auch eine ultrastrukturelle Untersuchung des Corpus callosum.

Im EAE-Modell konnte die Hypothese, dass eine Therapie mit Probenecid die klinische Symptomatik der Tiere bessert, verifiziert werden. Dieses Ergebnis spricht sehr deutlich für den Einsatz einer Probenecid-Therapie beim Menschen, auch in Verbindung mit dem Aspekt, dass sowohl bei den CPZ- als auch bei den EAE-Tieren trotz der hohen Medikamentendosis keine klinisch auffälligen Nebenwirkungen auftraten.

Probenecid scheint über seine Inhibition von Pannexin-Kanälen und P2X7-Rezeptoren eine Vielzahl an unterschiedlichen Signalwegen anzustoßen, die möglicherweise nicht einzeln, sondern erst in ihrer Summe zu einem positiven neuroprotektiven und immunmodulierenden Effekt führen. Dabei wirkt sich Probenecid auf Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und Migration von schädigenden Immunzellen aus. Zwar konnte diese Arbeit durch Untersuchung von verschiedenen Leukozyten-Populationen erste Anhaltspunkte für diese Zusammenhänge gegeben, es müssen jedoch spezifischere Marker verwendet werden um die einzelnen Untergruppen besser unterscheiden zu können, um so die Beeinflussung dieser durch Probenecid genauer zu klären.

Es wäre in naher Zukunft wünschenswert, dieses bekannte Medikament im Rahmen von klinischen Studien unter Off-Label-Use unterstützend in der Therapie der Multiplen Sklerose einzusetzen, gerade bei Patienten, deren Krankheit in einem fortgeschrittenen Stadium

vorliegt oder deren Medikation starke Nebenwirkungen mit sich bringt. Denkbar wäre auch eine retrospektive Betrachtung von MS-Patienten, die aufgrund ihrer Gichtkrankung zusätzlich Probenecid in der Vergangenheit erhalten haben, um so einen möglichen Vorteil dieser Patienten, beziehungsweise auch unerwünschte Wirkungen in Bezug auf die MS-Symptomatik durch eine Probenecid-Co-Medikation herauszufinden (Adamson and Leitinger, 2014).

7 Literaturverzeichnis

1. Adamson, S.E., Leitinger, N., 2014. The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. *FEBS Lett.* 588, 1416-22.
2. Alberdi, E., Sanchez-Gomez, M.V., Marino, A., Matute, C., 2002. Ca(2+) influx through AMPA or kainate receptors alone is sufficient to initiate excitotoxicity in cultured oligodendrocytes. *Neurobiol Dis.* 9, 234-43.
3. Bao, L., Locovei, S., Dahl, G., 2004. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 572, 65-8.
4. Ben-Nun, A., Wekerle, H., Cohen, I.R., 1981. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature.* 292, 60-1.
5. Benninger, Y., Colognato, H., Thurnherr, T., Franklin, R.J., Leone, D.P., Atanasoski, S., Nave, K.A., Ffrench-Constant, C., Suter, U., Relvas, J.B., 2006. Beta1-integrin signaling mediates premyelinating oligodendrocyte survival but is not required for CNS myelination and remyelination. *J Neurosci.* 26, 7665-73.
6. Bernatsky, S., Renoux, C., Suissa, S., 2010. Demyelinating events in rheumatoid arthritis after drug exposures. *Ann Rheum Dis.* 69, 1691-3.
7. Bhaskaracharya, A., Dao-Ung, P., Jalilian, I., Spildrejorde, M., Skarratt, K.K., Fuller, S.J., Sluyter, R., Stokes, L., 2014. Probenecid blocks human P2X7 receptor-induced dye uptake via a pannexin-1 independent mechanism. *PLoS One.* 9, e93058.
8. Blakemore, W.F., 1973. Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci.* 20, 73-83.
9. Blakemore, W.F., Franklin, R.J., 2008. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 318, 193-212.
10. Boger, W.P., Strickland, S.C., 1955. Probenecid (benemid); its uses and side-effects in 2,502 patients. *AMA Arch Intern Med.* 95, 83-92.
11. Butts, B.D., Houde, C., Mehmet, H., 2008. Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease. *Cell Death Differ.* 15, 1178-86.
12. Cannella, B., Raine, C.S., 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 37, 424-35.
13. Carlton, W.W., 1966. Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 8, 512-21.
14. Chau, W.K., So, K.F., Tay, D., Dockery, P., 2000. A morphometric study of optic axons regenerated in a sciatic nerve graft of adult rats. *Restor Neurol Neurosci.* 16, 105-116.
15. Chomiak, T., Hu, B., 2009. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One.* 4, e7754.
16. Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet.* 372, 1502-17.
17. Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 164, 1079-106.
18. Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 421, 744-8.
19. Dahl, G., Locovei, S., 2006. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life.* 58, 409-19.

20. Dahl, G., Keane, R.W., 2012. Pannexin: from discovery to bedside in 11+/-4 years? *Brain Res.* 1487, 150-9.
21. de Jong, B.A., Huizinga, T.W., Bollen, E.L., Uitdehaag, B.M., Bosma, G.P., van Buchem, M.A., Remarque, E.J., Burgmans, A.C., Kalkers, N.F., Polman, C.H., Westendorp, R.G., 2002. Production of IL-1beta and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 126, 172-9.
22. Derksen, V., Huizinga, T.W.J., van der Woude, D., 2017. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.*
23. Deshmukh, V.A., Tardif, V., Lyssiotis, C.A., Green, C.C., Kerman, B., Kim, H.J., Padmanabhan, K., Swoboda, J.G., Ahmad, I., Kondo, T., Gage, F.H., Theofilopoulos, A.N., Lawson, B.R., Schultz, P.G., Lairson, L.L., 2013. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature.* 502, 327-32.
24. Deutsch-Feldman, M., Picetti, R., Seip-Cammack, K., Zhou, Y., Kreek, M.J., 2015. Effects of handling and vehicle injections on adrenocorticotropic and corticosterone concentrations in Sprague-Dawley compared with Lewis rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 54, 35-9.
25. Dimitrov, S., Benedict, C., Heutling, D., Westermann, J., Born, J., Lange, T., 2009. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood.* 113, 5134-43.
26. Dinarello, C.A., 1998. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci.* 856, 1-11.
27. Dinarello, C.A., 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 117, 3720-32.
28. Dinarello, C.A., van der Meer, J.W., 2013. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol.* 25, 469-84.
29. Du, L., Empey, P.E., Ji, J., Chao, H., Kochanek, P.M., Bayir, H., Clark, R.S., 2016. Probenecid and N-Acetylcysteine Prevent Loss of Intracellular Glutathione and Inhibit Neuronal Death after Mechanical Stretch Injury In Vitro. *J Neurotrauma.* 33, 1913-1917.
30. Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O.R., Di Virgilio, F., 1997. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol.* 159, 1451-8.
31. Filippi, M., Rocca, M.A., 2005. MRI evidence for multiple sclerosis as a diffuse disease of the central nervous system. *J Neurol.* 252 Suppl 5, v16-24.
32. Flatmark, T., Kryvi, H., Tangeras, A., 1980. Induction of megamitochondria by cuprizone(biscyclohexanone oxaldihydrazone). Evidence for an inhibition of the mitochondrial division process. *Eur J Cell Biol.* 23, 141-8.
33. Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., Mills, K.H., 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 162, 1-11.
34. Franklin, R.J., Ffrench-Constant, C., 2008. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci.* 9, 839-55.
35. Fujinami, R.S., Oldstone, M.B., 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science.* 230, 1043-5.
36. Fujinami, R.S., von Herrath, M.G., Christen, U., Whitton, J.L., 2006. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev.* 19, 80-94.

37. 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, 1953-71.
38. Goldberg, J., Daniel, M., van Heuvel, Y., Victor, M., Beyer, C., Clarner, T., Kipp, M., 2013. Short-term cuprizone feeding induces selective amino acid deprivation with concomitant activation of an integrated stress response in oligodendrocytes. *Cell Mol Neurobiol*. 33, 1087-98.
39. Goldberg, J., Clarner, T., Beyer, C., Kipp, M., 2015. Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice. *J Mol Neurosci*. 57, 166-75.
40. Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., Stangel, M., 2014. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci*. 8, 73.
41. Guy, J., Ellis, E.A., Kelley, K., Hope, G.M., 1989. Spectra of G ratio, myelin sheath thickness, and axon and fiber diameter in the guinea pig optic nerve. *J Comp Neurol*. 287, 446-54.
42. Guy, J., Ellis, E.A., Hope, G.M., Emerson, S., 1991. Maintenance of myelinated fibre g ratio in acute experimental allergic encephalomyelitis. *Brain*. 114 (Pt 1A), 281-94.
43. Hainz, N., Wolf, S., Tschernig, T., Meier, C., 2016. Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation*. 39, 123-8.
44. Hainz, N., Wolf, S., Beck, A., Wagenpfeil, S., Tschernig, T., Meier, C., 2017. The pannexin-1 inhibitor probenecid arrests the progression of pronounced clinical symptoms in a mouse model of multiple sclerosis. Vol., ed.^eds., submitted for publication.
45. Hauser, S.L., Oksenberg, J.R., 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 52, 61-76.
46. Hemm, R.D., Carlton, W.W., Welser, J.R., 1971. Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 18, 869-82.
47. Hemmer, B., Kerschensteiner, M., Korn, T., 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 14, 406-19.
48. Herder, V., Hansmann, F., Stangel, M., Schaudien, D., Rohn, K., Baumgartner, W., Beineke, A., 2012. Cuprizone inhibits demyelinating leukomyelitis by reducing immune responses without virus exacerbation in an infectious model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 244, 84-93.
49. Hiremath, M.M., Saito, Y., Knapp, G.W., Ting, J.P., Suzuki, K., Matsushima, G.K., 1998. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*. 92, 38-49.
50. Hiremath, M.M., Chen, V.S., Suzuki, K., Ting, J.P., Matsushima, G.K., 2008. MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. *J Neuroimmunol*. 203, 23-32.
51. Hofstetter, H.H., Karulin, A.Y., Forsthuber, T.G., Ott, P.A., Tary-Lehmann, M., Lehmann, P.V., 2005. The cytokine signature of MOG-specific CD4 cells in the EAE of C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*. 170, 105-14.
52. Hoppel, C.L., Tandler, B., 1973. Biochemical effects of cuprizone on mouse liver and heart mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 22, 2311-8.
53. Huseby, E.S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C., Goverman, J., 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med*. 194, 669-76.
54. Ikeda, S., Saijo, S., Murayama, M.A., Shimizu, K., Akitsu, A., Iwakura, Y., 2014. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *J Immunol*. 192, 1449-58.

55. Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., Hemmer, B., 2002. Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain*. 125, 538-50.
56. Kabat, E.A., Wolf, A., Bezer, A.E., Murray, J.P., 1951. Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med*. 93, 615-33.
57. Kanjanamekanant, K., Luckprom, P., Pavasant, P., 2014. P2X7 receptor-Pannexin1 interaction mediates stress-induced interleukin-1 beta expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 49, 595-602.
58. Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., Beyer, C., 2009. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*. 118, 723-36.
59. Kleinewietfeld, M., Hafler, D.A., 2014. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev*. 259, 231-44.
60. Koenen, H.J., Smeets, R.L., Vink, P.M., van Rijssen, E., Boots, A.M., Joosten, I., 2008. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*. 112, 2340-52.
61. Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., Miller, S.D., 2002. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 169, 4712-6.
62. Kuerten, S., Lehmann, P.V., 2011. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J Interferon Cytokine Res*. 31, 907-16.
63. Leppert, D., Lindberg, R.L., Kappos, L., Leib, S.L., 2001. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Brain Res Rev*. 36, 249-57.
64. Levesque, S.A., Pare, A., Mailhot, B., Bellver-Landete, V., Kebir, H., Lecuyer, M.A., Alvarez, J.I., Prat, A., de Rivero Vaccari, J.P., Keane, R.W., Lacroix, S., 2016. Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1beta-driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Exp Med*. 213, 929-49.
65. Levin, L.I., Munger, K.L., O'Reilly, E.J., Falk, K.I., Ascherio, A., 2010. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 67, 824-30.
66. Locovei, S., Bao, L., Dahl, G., 2006a. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 7655-9.
67. Locovei, S., Wang, J., Dahl, G., 2006b. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett*. 580, 239-44.
68. Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D.C., Dahl, G., 2007. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett*. 581, 483-8.
69. Mana, P., Fordham, S.A., Staykova, M.A., Correcha, M., Silva, D., Willenborg, D.O., Linares, D., 2009. Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation. *J Neuroimmunol*. 210, 13-21.
70. Marrie, R.A., Reider, N., Cohen, J., Stuve, O., Sorensen, P.S., Cutter, G., Reingold, S.C., Trojano, M., 2015. A systematic review of the incidence and prevalence of autoimmune disease in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 21, 282-93.
71. Martin, D., Near, S.L., 1995. Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol*. 61, 241-5.

72. Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 10, 417-26.
73. Mason, J.L., Suzuki, K., Chaplin, D.D., Matsushima, G.K., 2001. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci*. 21, 7046-52.
74. Matsushima, G.K., Morell, P., 2001. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*. 11, 107-16.
75. Matute, C., Torre, I., Perez-Cerda, F., Perez-Samartin, A., Alberdi, E., Etxebarria, E., Arranz, A.M., Ravid, R., Rodriguez-Antiguedad, A., Sanchez-Gomez, M., Domercq, M., 2007. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*. 27, 9525-33.
76. Mauter, A.E., Weinzierl, M.R., Donovan, F., Noble, L.J., 2000. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys Ther*. 80, 673-87.
77. McGeachy, M.J., Stephens, L.A., Anderson, S.M., 2005. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol*. 175, 3025-32.
78. Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., 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 beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*. 25, 1951-9.
79. Millet, V., Marder, M., Pasquini, L.A., 2012. Adult CNP::EGFP transgenic mouse shows pronounced hypomyelination and an increased vulnerability to cuprizone-induced demyelination. *Exp Neurol*. 233, 490-504.
80. Miloso, M., Scuteri, A., Foudah, D., Tredici, G., 2008. MAPKs as mediators of cell fate determination: an approach to neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem*. 15, 538-48.
81. Monteiro, J., Hingorani, R., Pergolizzi, R., Apatoff, B., Gregersen, P.K., 1995. Clonal dominance of CD8+ T-cell in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 756, 310-2.
82. Munoz, J.J., Mackay, I.R., 1984. Production of experimental allergic encephalomyelitis with the aid of pertussigen in mouse strains considered genetically resistant. *J Neuroimmunol*. 7, 91-6.
83. Murphy, K.M., Stockinger, B., 2010. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol*. 11, 674-80.
84. Na, S.Y., Cao, Y., Toben, C., Nitschke, L., Stadelmann, C., Gold, R., Schimpl, A., Hunig, T., 2008. Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system. *Brain*. 131, 2353-65.
85. Neumann, H., 2003. Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Curr Opin Neurol*. 16, 267-73.
86. Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 343, 938-52.
87. Nourshargh, S., Alon, R., 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 41, 694-707.
88. O'Connor, R.A., Anderson, S.M., 2008. Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol*. 193, 1-11.
89. Ortega, S.B., Kashi, V.P., Tyler, A.F., Cunnusamy, K., Mendoza, J.P., Karandikar, N.J., 2013. The disease-ameliorating function of autoregulatory CD8 T cells is mediated by targeting of encephalitogenic CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 191, 117-26.

90. Ortiz, G.G., Pacheco-Moises, F.P., Macias-Islas, M.A., Flores-Alvarado, L.J., Mireles-Ramirez, M.A., Gonzalez-Renovato, E.D., Hernandez-Navarro, V.E., Sanchez-Lopez, A.L., Alatorre-Jimenez, M.A., 2014. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res.* 45, 687-97.
91. Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., Lukyanov, S., 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol.* 10, R473-4.
92. Pare, A., Mailhot, B., Levesque, S.A., Lacroix, S., 2017. Involvement of the IL-1 system in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis: Breaking the vicious cycle between IL-1beta and GM-CSF. *Brain Behav Immun.* 62, 1-8.
93. Pasquini, L.A., Calatayud, C.A., Bertone Una, A.L., Millet, V., Pasquini, J.M., Soto, E.F., 2007. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res.* 32, 279-92.
94. Pelegrin, P., Surprenant, A., 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo j.* 25, 5071-82.
95. Plitas, G., Rudensky, A.Y., 2016. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res.* 4, 721-5.
96. Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 354, 899-910.
97. Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., Ponsaerts, P., 2014. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev.* 47, 485-505.
98. Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., Matarese, G., 2015. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 759, 182-91.
99. Qiu, F., Dahl, G., 2009. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296, C250-5.
100. Rangachari, M., Kuchroo, V.K., 2013. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun.* 45, 31-9.
101. Recks, M.S., Stormanns, E.R., Bader, J., Arnhold, S., Addicks, K., Kuerten, S., 2013. Early axonal damage and progressive myelin pathology define the kinetics of CNS histopathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 149, 32-45.
102. Reddy, J., Illes, Z., Zhang, X., Encinas, J., Pyrdol, J., Nicholson, L., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Kuchroo, V.K., 2004. Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 15434-9.
103. Reddy, J., Waldner, H., Zhang, X., Illes, Z., Wucherpfennig, K.W., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., 2005. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 175, 5591-5.
104. Redford, E.J., Kapoor, R., Smith, K.J., 1997. Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain.* 120 (Pt 12), 2149-57.
105. Rivers, T.M., Sprunt, D.H., Berry, G.P., 1933. OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med.* 58, 39-53.
106. Robbins, N., Koch, S.E., Tranter, M., Rubinstein, J., 2012. The history and future of probenecid. *Cardiovasc Toxicol.* 12, 1-9.
107. Roch-Ramel, F., Guisan, B., 1999. Renal Transport of Urate in Humans. *News Physiol Sci.* 14, 80-84.

108. Salou, M., Nicol, B., Garcia, A., Laplaud, D.A., 2015. Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 6, 604.
109. Sawcer, S., Hellenthal, G., 2011. The major histocompatibility complex and multiple sclerosis: a smoking gun? *Brain.* 134, 638-40.
110. Saxena, A., Bauer, J., Scheikl, T., Zappulla, J., Audebert, M., Desbois, S., Waisman, A., Lassmann, H., Liblau, R.S., Mars, L.T., 2008. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J Immunol.* 181, 1617-21.
111. Scheld, M., Ruther, B.J., Grosse-Veldmann, R., Ohl, K., Tenbrock, K., Dreytmuller, D., Fallier-Becker, P., Zendedel, A., Beyer, C., Clarner, T., Kipp, M., 2016. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci.* 36, 1410-5.
112. Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E., Grassi, F., 2008. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal.* 1, ra6.
113. Schiffenbauer, J., Streit, W.J., Butfiloski, E., LaBow, M., Edwards, C., 3rd, Moldawer, L.L., 2000. The induction of EAE is only partially dependent on TNF receptor signaling but requires the IL-1 type I receptor. *Clin Immunol.* 95, 117-23.
114. Shoji, K.F., Saez, P.J., Harcha, P.A., Aguila, H.L., Saez, J.C., 2014. Pannexin1 channels act downstream of P2X 7 receptors in ATP-induced murine T-cell death. *Channels (Austin).* 8, 142-56.
115. Silverman, W., Locovei, S., Dahl, G., 2008. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295, C761-7.
116. Silverman, W.R., de Rivero Vaccari, J.P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S.K., Scemes, E., Keane, R.W., Dahl, G., 2009. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem.* 284, 18143-51.
117. Solti, I., Kvell, K., Talaber, G., Veto, S., Acs, P., Gallyas, F., Jr., Illes, Z., Fekete, K., Zalan, P., Szanto, A., Bognar, Z., 2015. Thymic Atrophy and Apoptosis of CD4+CD8+ Thymocytes in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis. *PLoS One.* 10, e0129217.
118. Srinivasan, D., Yen, J.H., Joseph, D.J., Friedman, W., 2004. Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *J Neurosci.* 24, 6482-8.
119. Steelman, A.J., Thompson, J.P., Li, J., 2012. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. *Neurosci Res.* 72, 32-42.
120. Sun, D., Whitaker, J.N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H., Raine, C.S., 2001. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 166, 7579-87.
121. Suzuki, K., 1969. Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone. *Science.* 163, 81-2.
122. Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., Dustin, M.L., 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 203, 505-11.
123. Talbott, J.H., 1953. Diagnosis and treatment of gouty arthritis. *Calif Med.* 79, 220-6.
124. Targoni, O.S., Baus, J., Hofstetter, H.H., Hesse, M.D., Karulin, A.Y., Boehm, B.O., Forsthuber, T.G., Lehmann, P.V., 2001. Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 166, 4757-64.
125. Tofts, P.S., Kermode, A.G., 1989. Blood brain barrier permeability in multiple sclerosis using labelled DTPA with PET, CT and MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 52, 1019-20.

126. Torkildsen, O., Brunborg, L.A., Myhr, K.M., Bo, L., 2008. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl.* 188, 72-6.
127. Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 338, 278-85.
128. Tullman, M.J., 2013. Overview of the epidemiology, diagnosis, and disease progression associated with multiple sclerosis. *Am J Manag Care.* 19, S15-20.
129. van Pesch, V., Sindic, C.J., Fernandez, O., 2016. Effectiveness and safety of natalizumab in real-world clinical practice: Review of observational studies. *Clin Neurol Neurosurg.* 149, 55-63.
130. Velasquez, S., Malik, S., Lutz, S.E., Scemes, E., Eugenin, E.A., 2016. Pannexin1 Channels Are Required for Chemokine-Mediated Migration of CD4+ T Lymphocytes: Role in Inflammation and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 196, 4338-47.
131. Venturini, G., 1973. Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo. *J Neurochem.* 21, 1147-51.
132. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 199, 971-9.
133. Voss, E.V., Skuljec, J., Gudi, V., Skripuletz, T., Pul, R., Trebst, C., Stangel, M., 2012. Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis.* 45, 519-28.
134. Wagner, T., Rafael, J., 1977. Biochemical properties of liver megamitochondria induced by chloramphenicol or cuprizone. *Exp Cell Res.* 107, 1-13.
135. Whitham, R.H., Bourdette, D.N., Hashim, G.A., Herndon, R.M., Ilg, R.C., Vandenberg, 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. *J Immunol.* 146, 101-7.
136. Woehrle, T., Yip, L., Elkhali, A., Sumi, Y., Chen, Y., Yao, Y., Insel, P.A., Junger, W.G., 2010. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood.* 116, 3475-84.
137. Woodroffe, M.N., Bellamy, A.S., Feldmann, M., Davison, A.N., Cuzner, M.L., 1986. Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. Possible role for microglia in lesion growth. *J Neurol Sci.* 74, 135-52.
138. Wucherpfennig, K.W., Strominger, J.L., 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* 80, 695-705.
139. Xiu, Y., Cheng, G.H., Peng, C., Wang, Y., Li, Y.D., Chao, F.L., Tang, Y., 2016. Ultrastructural abnormalities and loss of myelinated fibers in the corpus callosum of demyelinated mice induced by cuprizone. *J Neurosci Res.*
140. Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., Karin, N., 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature.* 356, 63-6.
141. Yin, Y., Li, Y., Kerzic, M.C., Martin, R., Mariuzza, R.A., 2011. Structure of a TCR with high affinity for self-antigen reveals basis for escape from negative selection. *Embo j.* 30, 1137-48.
142. Yip, L., Woehrle, T., Corriden, R., Hirsh, M., Chen, Y., Inoue, Y., Ferrari, V., Insel, P.A., Junger, W.G., 2009. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *Faseb j.* 23, 1685-93.

143. York, N.R., Mendoza, J.P., Ortega, S.B., Benagh, A., Tyler, A.F., Firan, M., Karandikar, N.J., 2010. Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.* 35, 33-44.
144. Zendedel, A., Beyer, C., Kipp, M., 2013. Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection. *J Mol Neurosci.* 51, 567-72.
145. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., Tschopp, J., 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol.* 11, 136-40.
146. Zozulya, A.L., Wiendl, H., 2008. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 4, 384-98.

8 Anhang

8.1 Deskriptive Statistik des CPZ-Modells

Tab. 8-1: Absolute Zellzahlen pro 100 µl Blut im CPZ-Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (*10 ³)	CPZ/CPZ	CPZ/solvent	CPZ/PBN	Standardfutter	p
Leukozyten	43,6 [20,4; 65,9]	60,4 [12,1; 129,5]	35,7 [28,1; 81,8]	225,5 [147,5; 360,8]	0,0138
Lymphozyten	29,4 [12,4; 40,6]	40,4 [8,5; 68,5]	23,0 [14,8; 49,4]	108,0 [77,7; 165,5]	0,0143
CD3 ⁺ CD4 ⁺	4,5 [2,4; 8,5]	8,0 [2,2; 14,3]	6,1 [4,7; 7,8]	19,6 [9,8; 30,2]	0,0144
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,24 [0,12; 0,53]	0,38 [0,12; 0,62]	0,29 [0,20; 0,47]	1,5 [0,83; 2,5]	0,0132

Tab. 8-2: Prozentuale Zellzahlen pro 100 µl Blut im CPZ-Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (%)	CPZ/CPZ	CPZ/solvent	CPZ/PBN	Standardfutter	p
Lymphozyten	61,6 [55,7; 67,8]	59,7 [49,2; 73,1]	63,0 [55,1; 73,2]	51,4 [43,1; 55,2]	0,1572
CD3 ⁺ CD4 ⁺	20,8 [19,9; 26,9]	23,9 [17,5; 26,4]	23,2 [19,1; 28,4]	16,6 [14,4; 19,4]	0,0607
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	5,2 [4,4; 5,6]	4,8 [4,4; 5,5]	4,7 [4,1; 5,8]	7,9 [6,7; 8,9]	0,0069

Tab. 8-3: Absolute Zellzahlen pro Milz im CPZ-Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (*10 ⁶)	CPZ/CPZ	CPZ/solvent	CPZ/PBN	Standardfutter	p
Leukozyten	44,3 [43,6; 58,5]	44,8 [30,1; 50,5]	49,3 [43,4; 61,3]	53,4 [35,8; 66,2]	0,5898
Lymphozyten	37,7 [35,9; 47,9]	36,0 [23,3; 42,2]	41,4 [34,0; 47,8]	42,1 [29,1; 56,9]	0,6564
CD3 ⁺ CD4 ⁺	6,4 [6,0; 10,0]	6,4 [4,0; 10,8]	6,7 [5,0; 9,8]	7,3 [4,6; 9,7]	0,9084
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,65 [0,58; 1,03]	0,66 [0,55; 1,02]	0,65 [0,59; 0,88]	1,48 [0,89; 1,76]	0,1139

Tab. 8-4: Prozentuale Zellzahlen pro Milz im CPZ-Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (%)	CPZ/CPZ	CPZ/solvent	CPZ/PBN	Standardfutter	p
Lymphozyten	83,2 [78,6; 87,3]	81,8 [78,6; 83,7]	81,5 [77,2; 84,8]	83,1 [78,9; 88,3]	0,8304
CD3 ⁺ CD4 ⁺	16,8 [16,1; 21,2]	18,6 [15,1; 25,1]	18,7 [13,5; 22,0]	17,7 [15,4; 19,0]	0,9141
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,6 [8,7; 10,5]	10,7 [9,6; 13,7]	10,2 [9,2; 11,9]	20,1 [16,7; 22,6]	0,0008

Tab. 8-5: Regressionskoeffizienten mit zugehörigen 95% Konfidenzintervallen in μm im Axon-Durchmesser-Gruppenvergleich

Gruppe	Regressionskoeffizient [95% Konfidenzintervall] (μm)	p
Standardfutter	0,173 [0,125-0,221]	<0,001
CPZ/PBN	0,133 [0,084-0,182]	<0,001
CPZ/solvent	0,027 [-0,028-0,081]	0,335
CPZ/CPZ	Referenz	

Tab. 8-6: Regressionskoeffizienten mit zugehörigen 95% Konfidenzintervallen im g-ratio-Gruppenvergleich

Gruppe	Regressionskoeffizient [95% Konfidenzintervall]	p
Standardfutter	-0,104 [-0,160; -0,048]	<0,001
CPZ/PBN	-0,012 [-0,102; 0,079]	0,798
CPZ/solvent	-0,063 [-0,119; -0,007]	0,028
CPZ/CPZ	Referenz	

Tab. 8-7: Absolute Werte Axon-Durchmesser und g-ratio

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

	CPZ/CPZ	CPZ/solvent	CPZ/PBN	Standardfutter
Axon-Durchmesser (μm)	0,59 [0,55; 0,64]	0,63 [0,60; 0,66]	0,72 [0,70; 0,74]	0,76 [0,70; 0,80]
g-ratio	0,84 [0,82; 0,92]	0,80 [0,79; 0,81]	0,82 [0,80; 0,92]	0,75 [0,74; 0,77]

8.2 Deskriptive Statistik des EAE-Modells

Tab. 8-8: Klinische Symptomatik der EAE-Tiere an einzelnen Behandlungstagen im EAE 250 mg Probenecid Versuch

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

(Score-Werte)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	p
Tag 0	2,0 [2,0; 2,5]	2,0 [2,0; 2,5]	2,0 [2,0; 2,5]	0,7906
Tag 4	3,0 [2,5; 3,0]	2,5 [2,5; 3,0]	2,5 [2,0; 2,75]	0,0613
Tag 5	3,0 [2,5; 3,0]	2,5 [2,5; 3,0]	2,5 [1,5; 2,5]	0,0231
Tag 7	2,75 [2,5; 3,5]	2,5 [2,5; 2,5]	2,0 [1,5; 2,25]	0,0034
Tag 12	4,0 [2,875; 5,0]	5,0 [3,0; 5,0]	1,5 [1,0; 2,5]	0,0031
Tag 20	5,0 [4,375; 5,0]	5,0 [3,0; 5,0]	2,0 [1,0; 2,75]	0,0028

Tab. 8-9: Absolute Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 100 mg Probenecid Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (*10 ³)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	p
Leukozyten	57,2 [20,3; 65,9]	57,5 [47,7; 97,7]	46,8 [37,3; 70,0]	0,8329
Lymphozyten	32,6 [12,6; 38,2]	36,8 [23,8; 41,0]	28,1 [24,5; 35,8]	0,7072
CD3 ⁺ CD4 ⁺	6,8 [2,6; 12,1]	6,4 [5,3; 11,6]	8,4 [6,4; 8,6]	0,7677
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,64 [0,24; 1,28]	0,73 [0,44; 1,13]	0,74 [0,51; 1,12]	0,9240

Tab. 8-10: Prozentuale Zellzahlen pro 100 µl Blut im EAE 100 mg Probenecid Versuch.
Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (%)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	p
Lymphozyten	58,0 [57,0; 62,2]	52,7 [46,5; 62,6]	60,1 [51,1; 69,1]	0,2430
CD3 ⁺ CD4 ⁺	20,8 [20,7; 31,6]	22,6 [19,0; 26,5]	26,2 [23,9; 30,7]	0,2609
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,5 [9,0; 10,6]	10,2 [8,0; 12,6]	8,9 [7,2; 13,3]	0,9148

Tab. 8-11: Absolute Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch.
Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (*10 ⁶)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	p
Leukozyten	28,2 [24,4; 39,1]	35,3 [24,4; 42,3]	30,2 [25,4; 56,7]	0,8133
Lymphozyten	19,0 [17,4; 28,6]	23,1 [18,1; 30,7]	23,0 [18,3; 43,9]	0,7573
CD3 ⁺ CD4 ⁺	3,6 [3,4; 4,7]	4,3 [2,5; 5,7]	4,5 [2,7; 5,7]	0,9871
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,64 [0,56; 1,10]	0,85 [0,59; 1,13]	0,79 [0,65; 1,36]	0,8173

Tab. 8-12: Prozentuale Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch.
Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (%)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	p
Lymphozyten	73,1 [61,7; 77,7]	66,1 [55,6; 75,0]	75,0 [71,0; 80,1]	0,2781
CD3 ⁺ CD4 ⁺	17,9 [16,5; 20,9]	18,3 [16,2; 19,3]	16,3 [14,1; 22,5]	0,9870
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	19,0 [15,3; 23,3]	20,2 [19,1; 24,8]	21,4 [14,7; 24,0]	0,6640

Tab. 8-13: Absolute Zellzahlen pro Milz im EAE 100 mg Probenecid Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (%)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	p
FoxP3 ⁺	3,3 [1,1; 5,6]	3,1 [2,1; 4,5]	2,2 [2,0; 2,6]	0,5446
IL-10 ⁺	1,5 [1,3; 1,9]	1,2 [0,8; 1,6]	1,0 [0,5; 1,3]	0,2477
INF- γ ⁺	1,5 [1,2; 4,6]	2,0 [1,7; 2,5]	1,3 [0,6; 1,8]	0,1303

Tab. 8-14: Absolute Zellzahlen pro 100 μ l Blut im EAE 250 mg Probenecid Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (*10 ³)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	Kontrolle	p
Leukozyten	57,0 [46,9; 98,1]	58,2 [43,8; 95,4]	42,3 [36,9; 69,1]	43,9 [38,2; 54,3]	0,1832
Lymphozyten	27,8 [23,1; 49,4]	25,3 [17,4; 34,4]	23,3 [21,1; 37,0]	30,8 [25,9; 36,4]	0,5446
CD3 ⁺ CD4 ⁺	8,2 [6,1; 10,8]	5,2 [4,2; 10,6]	5,5 [4,0; 6,8]	4,8 [3,3; 7,1]	0,1720
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,75 [0,57; 1,66]	0,65 [0,48; 0,98]	0,47 [0,37; 0,69]	0,51 [0,29; 0,72]	0,2606

Tab. 8-15: Prozentuale Zellzahlen pro 100 μ l Blut im EAE 250 mg Probenecid Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (%)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	Kontrolle	p
Lymphozyten	44,7 [40,2; 62,3]	44,0 [25,9; 57,1]	59,4 [51,5; 67,2]	66,3 [62,7; 73,5]	0,0056
CD3 ⁺ CD4 ⁺	26,2 [23,3; 31,1]	23,6 [20,8; 27,4]	22,7 [17,3; 26,7]	17,7 [12,8; 19,7]	0,0281
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,9 [8,3; 13,2]	11,8 [8,4; 15,1]	8,8 [7,2; 10,8]	8,4 [4,9; 16,1]	0,3743

Tab. 8-16: Absolute Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (*10 ⁶)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	Kontrolle	p
Leukozyten	17,8 [11,2; 36,4]	20,2 [17,6; 29,8]	27,4 [21,2; 27,8]	40,4 [34,5; 61,0]	0,0027
Lymphozyten	12,9 [9,0; 23,1]	15,6 [12,8; 20,4]	20,9 [16,5; 21,7]	32,6 [29,7; 44,5]	0,0008
CD3 ⁺ CD4 ⁺	2,6 [2,2; 5,1]	3,2 [2,5; 4,2]	3,6 [2,7; 4,1]	6,2 [4,6; 8,3]	0,0040
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,61 [0,47; 1,53]	0,82 [0,55; 0,96]	0,92 [0,74; 1,05]	1,32 [1,16; 1,49]	0,0091

Tab. 8-17: Prozentuale Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (%)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	Kontrolle	p
Lymphozyten	72,6 [61,3; 81,7]	71,3 [66,8; 74,5]	77,8 [75,5; 78,8]	86,8 [75,1; 87,5]	0,0101
CD3 ⁺ CD4 ⁺	24,0 [20,1; 24,4]	20,9 [18,0; 22,3]	18,1 [17,0; 18,9]	17,8 [15,0; 19,6]	0,0117
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	25,0 [18,7; 30,9]	22,2 [18,2; 30,4]	26,4 [23,2; 29,2]	21,9 [17,5; 29,6]	0,6246

Tab. 8-18: Prozentuale Zellzahlen pro Milz im EAE 250 mg Probenecid Versuch.

Quantitative Merkmale werden beschrieben als Median [1. Quartil; 3. Quartil]

Zellen (%)	EAE	EAE/solvent	EAE/PBN	Kontrolle	p
FoxP3 ⁺	1,3 [0,9; 2,6]	1,5 [1,1; 2,5]	1,1 [0,8; 1,3]	2,7 [1,0; 4,1]	0,1344
IL-10 ⁺	0,8 [0,6; 1,4]	1,2 [0,9; 1,7]	0,7 [0,5; 0,9]	1,4 [0,7; 2,0]	0,0667
IFN- γ ⁺	1,1 [0,9; 3,0]	1,8 [1,0; 4,8]	1,3 [1,0; 1,6]	3,3 [2,3; 8,8]	0,0068

9 Publikation

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.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich noch bei allen Personen bedanken, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des Themas, die tatkräftige Unterstützung, die Hilfsbereitschaft, die zahlreichen bereichernden und kritischen Gespräche und das stets offene Ohr.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Nadine Hainz für die nette Betreuung, die Beantwortung meiner Fragen, die konstruktiven Unterhaltungen auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene und für die Durchführung der Versuche.

Ich danke Frau Prof. Dr. Carola Meier für die freundliche Aufnahme in ihre Abteilung, die fachliche Unterstützung, die Bereitstellung der Materialien, Geräte und Räumlichkeiten und die Diskussion der Daten.

Herrn Dekan Prof. Dr. Michael Menger und Herrn Prof. Dr. Markus Bischoff möchte ich gerne für die Nutzung der Tierhaltung danken.

Herrn Prof. Dr. Stefan Wagenpfeil und Herrn Daniel Rapp danke ich für die statistische Beratung.

Auch herzlich danken möchte ich Frau Andrea Rabung, Frau Belinda König, Frau Alina Mattheis, Frau Ingrid Lang, und Herrn Alexander Grijfmer für die technische Unterstützung und Durchführung der Versuche.

Der gesamten Abteilung Prof. Dr. Carola Meier möchte ich ein großes Dankeschön aussprechen. Die stets freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre hat mir die Bearbeitung der Dissertation um ein Vielfaches erleichtert.

Auch meinen Eltern Kerstin und Roland, meiner Schwester Laurin, meiner Freundin Jana und meinem gesamten Freundeskreis möchte ich herzlich danken. Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Großeltern Hiltrud, Marlene, Josef und Karl, denen ich diese Arbeit widme. Ohne euch wären mein Studium, meine Doktorarbeit und mein bisheriger Lebensweg nicht möglich gewesen. Vielen Dank für alles.

Eidesstattliche Erklärung

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

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Versuchsdurchführung - Frau Dr. Nadine Hainz, Frau Andrea Rabung, Frau Belinda König, Frau Alina Mattheis, Frau Ingrid Lang, Herr Alexander Gribmer

2. Statistische Beratung – Herr Prof. Dr. Stefan Wagenpfeil, Herr Daniel Rapp

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, 29.06.2017

Philipp Becker