

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

**Der Einfluss der
Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis
auf die Expression von Connexinen im Nervus opticus der Maus**

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

Vorgelegt von: Anna Maria Miesner
geboren am 21.11.1987 in Langenau

Tag der Promotion: 25.11.2020

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

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

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. F. Schmitz

Erklärung

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

Homburg, den 11.12.2019

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	iii
Abkürzungsverzeichnis.....	v
Zusammenfassung.....	viii
Summary.....	ix
1 Einleitung.....	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.2 Neuritis nervi optici (NNO).....	3
1.3 Tiermodelle der MS.....	4
1.4 Gliazellen.....	7
1.5 Connexine.....	8
1.6 Connexine und EAE/MS.....	11
1.7 Fragestellung und Hypothese.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Materialliste.....	13
2.1.1 Geräte.....	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3 Chemikalien.....	16
2.1.4 Antikörper.....	17
2.1.5 Primer.....	18
2.1.6 Software.....	19
2.2 Puffer und Lösungen.....	20
2.3 Tierexperimentelle Arbeiten.....	21
2.4 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).....	21
2.5 Organentnahme.....	22
2.6 Kryoschnitte.....	22
2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	23
2.8 Luxol-Fast-Blue-Färbung.....	23
2.9 Auswertung der histologischen Bilder.....	24
2.10 Immunfluoreszenz-Färbungen.....	25
2.10.1 Immunfluoreszenz-Färbung CD3-positiver T-Zellen.....	26
2.10.2 Immunfluoreszenz-Färbung des Cx43 Proteins.....	26
2.10.3 Immunfluoreszenz-Färbung des Cx29 Proteins.....	26
2.10.4 Immunfluoreszenz-Färbung des Cx30 Proteins.....	26
2.10.5 Immunfluoreszenz-Färbung des Cx47 Proteins.....	26

2.11	Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen	27
2.12	Molekularbiologische Methoden	27
2.12.1	Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung	27
2.12.2	Reverse Transkription.....	28
2.12.3	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	29
2.13	Auswertung der qRT-PCR	30
2.14	Statistik	30
3	Ergebnisse	32
3.1	HE-Färbung	33
3.2	LFB-Färbung.....	37
3.3	Anti-CD3-Immunfluoreszenz	40
3.4	Connexin-Expression in Nn. optici.....	44
3.4.1	Expression astrozytärer Connexine in den Nn. optici von EAE-Tieren	45
3.4.2	Expression oligodendrozytärer Connexine in Nn. optici von EAE-Tieren.....	54
3.4.3	Expression eines neuronalen Connexins in den Nn. optici von EAE-Tieren	62
4	Diskussion.....	63
4.1	Pathomechanismen der Multiplen Sklerose und der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis.....	63
4.2	Astrozytäre Connexine	65
4.3	Oligodendrozytäre Connexine.....	68
4.4	Neuronales Connexin	70
4.5	Gap Junctions	72
4.6	Connexin-bedingte Erkrankungen.....	74
4.7	Fazit	78
5	Literaturverzeichnis.....	79
6	Danksagung	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologische HE-Färbung des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren	33
Abbildung 2: Ausschnittsvergrößerungen der histologischen HE-Färbung des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren aus Abbildung 1	34
Abbildung 3: Die Anzahl der Zellkerne pro 1 mm ² im N. opticus der Kontrollgruppe (Kontrolle) und bei den EAE-induzierten Tieren (Mittelwert der drei Scoregruppen SG 1- SG 3)	35
Abbildung 4: Die Anzahl der Zellkerne pro 1 mm ² im N. opticus in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und bei den EAE-induzierten Tieren der drei Scoregruppen (Separate Darstellung der drei Scoregruppen)	35
Abbildung 5: Histologische LFB-Färbung des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren	37
Abbildung 6: Ausschnittsvergrößerungen der histologischen LFB-Färbung des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren aus Abbildung 5	38
Abbildung 7: Das Ausmaß der Demyelinisierung und die Verteilung der Zellkerne im N. opticus in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und bei den EAE-induzierten Tieren der drei Scoregruppen (Mittelwert der drei Scoregruppen SG 1- SG 3)	39
Abbildung 8: Das Ausmaß der Demyelinisierung und die Verteilung der Zellkerne im N. opticus in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und bei den EAE-induzierten Tieren der drei Scoregruppen (Separate Darstellung der drei Scoregruppen)	39
Abbildung 9: Anti-CD3-Immunfluoreszenz-Färbung in peripheren Arealen des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren	41
Abbildung 10: Anti-CD3-Immunfluoreszenz-Färbung in zentralen Arealen des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren	42
Abbildung 11: Anteil der CD3-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in den EAE-induzierten Tieren (Mittelwert der drei Scoregruppen SG 1- SG 3)	43
Abbildung 12: Anteil der CD3-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in den Tieren der drei EAE-Scoregruppen (Separate Darstellung der drei Scoregruppen)	43
Abbildung 13: Die relative mRNA-Expression von Cx43 im N. opticus in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE)	45
Abbildung 14: Cx43-Immunfluoreszenz des N. opticus (peripherer Bereich) von EAE- und Kontrolltieren	46
Abbildung 15: Cx43-Immunfluoreszenz des N. opticus (zentraler Bereich) von EAE- und Kontrolltieren	47
Abbildung 16: Der Anteil der Cx43-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und EAE-induzierten Tieren (Mittelwert der drei Scoregruppen SG 1- SG 3)	48
Abbildung 17: Der Anteil der Cx43-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (Separate Darstellung der drei Scoregruppen)	48
Abbildung 18: Die relative mRNA-Expression von Cx30 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE)	49
Abbildung 19: Cx30-Immunfluoreszenz des N. opticus (peripherer Bereich) von EAE- und Kontrolltieren	50
Abbildung 20: Cx30-Immunfluoreszenz des N. opticus (zentraler Bereich) von EAE- und Kontrolltieren	51
Abbildung 21: Der Anteil der Cx30-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (Mittelwert der drei Scoregruppen SG 1- SG 3)	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 22: Der Anteil der Cx30-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (Separate Darstellung der drei Scoregruppen).....	52
Abbildung 23: Die relative mRNA-Expression von Cx26 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE).....	53
Abbildung 24: Die relative mRNA-Expression von Cx47 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE).....	54
Abbildung 25: Cx47-Immunfluoreszenz des N. opticus (peripherer Bereich) von EAE- und Kontrolltieren	55
Abbildung 26: Cx47-Immunfluoreszenz des N. opticus (zentraler Bereich) von EAE- und Kontrolltieren	55
Abbildung 27: Der Anteil der Cx47-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (Mittelwert der drei Scoregruppen SG 1- SG 3).....	56
Abbildung 28: Der Anteil der Cx47-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (Separate Darstellung der drei Scoregruppen).....	56
Abbildung 29: Die relative mRNA-Expression von Cx29 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE).....	57
Abbildung 30: Cx29-Immunfluoreszenz aus dem peripheren Bereich des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren	58
Abbildung 31: Cx29-Immunfluoreszenz des N. opticus (zentraler Bereich) von EAE- und Kontrolltieren	59
Abbildung 32: Der Anteil der Cx29-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (Mittelwert der drei Scoregruppen SG 1- SG 3).....	60
Abbildung 33: Der Anteil der Cx29-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (Separate Darstellung der drei Scoregruppen).....	60
Abbildung 34: Die relative mRNA-Expression von Cx32 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE).....	61
Abbildung 35: Die relative mRNA-Expression von Cx36 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE).....	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AQP4	Aquaporin 4
BSA	Bovine Serum Albumin, bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD	Cluster of differentiation
CMT-X	Charcot-Marie-Tooth Erkrankung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cx	Connexin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
dl	Deziliter
dNTP	2'Desoxyribonuklease-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EtOH	Ethanol
fwd	forward
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acid protein, saures Gliafaserprotein
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
i.e.	id est, das heißt
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

LFB	Luxol-Fast-Blue
MBP	Myelin-basisches-Protein
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmeter
mM	Millimol
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
M-MuLV RT	Moloney-Mausleukämievirus Reverse Transkriptase
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumphosphat Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	Normal Goat Serum, normales Ziegen Serum
NMO	Neuromyelitis optica
NO	Stickstoffmonoxid
N. opticus	Nervus opticus
OCT	Optimum Cutting Temperature
ODDD	Oculodentodigitales Dysplasie Syndrom
OPC	Oligodendrocyte progenitor cell; Oligodendrozyten Vorläuferzelle
OS-MS	Opticospinale MS
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipidprotein
PMLD	Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
rev	reverse
RT Puffer	Reverse Transkriptase Puffer
s	Sekunde

Abkürzungsverzeichnis

s.u.	siehe unten
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
u.a.	unter anderem
x \times g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Erkrankung des Zentralen Nervensystems mit verschiedenen pathophysiologischen Merkmalen wie Demyelinisierung, Axonschädigung und Inflammation. Diese resultieren hauptsächlich in motorischen, sensiblen oder auch kognitiven Beeinträchtigungen. Viele Patienten berichten von Sehstörungen als erste Symptome der MS, noch bevor sie motorische Beeinträchtigungen wahrnehmen. Daher steht der Nervus opticus (N. opticus) im Fokus dieser Arbeit.

Zur Aufrechterhaltung der Funktion von Nervenzellen und deren umgebenden Gliazellen sind die Connexine von großer Bedeutung, deren Subtypen eine Zelltyp-spezifische Expression aufweisen. Connexine können Hemikanäle bilden und so die Kommunikation zwischen Zytoplasma und Extrazellularraum ermöglichen; sie können sich aber auch zu Gap Junctions zusammenlagern und somit den interzellulären Stoffaustausch ermöglichen. Für einige Erkrankungen des Nervensystems, wie z.B. der hypoxisch-ischämischen Hirnläsion, ist bekannt, dass sie Veränderungen in der Connexin-Expression nach sich ziehen. Daher wurde in dieser Arbeit postuliert, dass Connexine bei der MS bzw. im korrespondierenden Tiermodell bei der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) ebenfalls eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob im murinen EAE-Modell Veränderungen der Connexin-Expression im N. opticus zu beobachten sind. Mittels CD3-Immunfluoreszenz wurden T-Zellen in den Nerven gezeigt; mittels histologischer Färbungen das Myelin (Luxol-Fast-Blue) bzw. eine Zellinfiltration (Hämatoxylin-Eosin). Zur Analyse der mRNA-Expression wurde eine quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion für astrozytäre, oligodendrozytäre und neuronale Connexine durchgeführt. Die entsprechenden Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbungen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die EAE einen deutlichen Einfluss auf astrozytäre und oligodendrozytäre Gap Junction-Proteine hat: Insbesondere in der Phase der EAE-bedingten Demyelinisierung kam es zur Reduktion der Connexin 43-Expression im N. opticus. In dieser Phase der Erkrankung konnte ebenfalls eine Erhöhung der Connexin 47-Protein-Expression, bei verminderter mRNA-Expression, beobachtet werden. Auch die Gen-Expression von Connexin 29 und Connexin 36 war bei EAE vermindert. Somit wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer EAE auf Gliazellen des N. opticus bestätigt und erstmalig Änderungen der Connexin-Expression auf mRNA- und Proteinebene im N. opticus unter EAE nachgewiesen. Die pathophysiologischen Veränderungen beziehen somit auch die Kanalproteine der interzellulären Kommunikation via Gap Junctions mit ein.

Summary

Multiple sclerosis (MS) is a disease of the central nervous system with various pathophysiological features such as demyelination, axonal damage and inflammation. These mainly result in motor, sensory or cognitive impairments. Many patients report impaired vision as one of the first symptoms of MS even before they experience motor impairment. Therefore, this work focuses on the optic nerve.

In order to control the function of nerve cells and their surrounding glial cells, the connexins, whose sub-types present a cell type specific expression, are of great importance. Connexins can form hemichannels and thus enable communication between cytoplasm and extracellular space; they can also assemble into gap junctions and thus facilitate intercellular mass transfer. Some diseases of the nervous system, such as the hypoxic-ischemic brain lesion, are known to cause changes in connexin expression. Therefore, it was postulated that connexins also play a role in MS or in the corresponding animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

In this work, it was investigated whether changes in connexin expression in the optic nerve can be observed in the murine EAE model. By CD3 immunofluorescence, T-cells were shown in the nerves; with the use of histological staining with myelin (Luxol Fast Blue) or cell infiltration (Hematoxylin Eosin). To analyze mRNA expression, quantitative real-time polymerase chain reaction was performed for astrocytic, oligodendrocytic and neuronal connexins. The corresponding proteins were detected by immunofluorescence. It was shown that EAE has a distinct influence on astrocytic and oligodendrocyte gap junction proteins. Especially in the phase of EAE-induced demyelination, connexin 43-expression in the optic nerve was reduced. An increase in connexin 47-protein-expression, with reduced connexin 47-gene-expression, was also observed at this stage of the disease. Gene expression of connexin 29 and connexin 36 was also reduced in EAE. Thereby, the influence of an EAE on the glial cells of the optic nerve was confirmed and for the first time, changes in connexin expression on mRNA and protein level in the optic nerve under EAE were detected. The pathophysiological changes, therefore, also include the channel proteins of intercellular communication via gap junctions.

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, wobei diese Bezeichnung nicht alle Aspekte der MS widerspiegelt. Ihre pathophysiologischen Merkmale sind fokale Demyelinisierung, Inflammation und Axonschädigung. Diese Läsionen können prinzipiell überall im ZNS auftreten. Typische Läsionsstellen sind der Nervus opticus (N. opticus), das Rückenmark und der Hirnstamm. (Stadelmann et al. 2011).

Die MS tritt am häufigsten zwischen dem 20.-50. Lebensjahr auf. Frauen sind drei Mal so häufig betroffen wie Männer (Milo and Miller 2014). Weltweit sind ca. 2,5 Millionen Menschen an MS erkrankt, wobei die Verteilung über die einzelnen Kontinente und deren Länder ungleichmäßig ist. Zu den Gebieten mit niedrigem Erkrankungsrisiko zählen Afrika und Ostasien (Milo and Miller 2014). Gebiete mit hohem Risiko sind Nord- und Zentraleuropa sowie Nordamerika. Migranten, vor allem Menschen, die vor der Pubertät von einem Gebiet mit niedrigem Risiko in ein Gebiet mit hohem Risiko einwanderten, erreichen dieselbe Prävalenz wie die Einheimischen. Die Prävalenz variiert somit und beträgt in Ländern mit niedrigem Risiko weniger als 5 pro 100.000, in Ländern mit hohem Risiko jedoch mehr als 100 pro 100.000. Das spricht dafür, dass Umweltfaktoren eine Rolle in der Ätiologie spielen (Milo and Miller 2014). Der Median der weltweiten Inzidenz der MS beträgt 5,2 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Der Median der weltweiten Prävalenz der MS liegt bei 112,0 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Melcon et al. 2014).

Die Ursache der MS ist noch nicht vollständig bekannt. Neben den oben erwähnten Umweltfaktoren sind an der Entwicklung der MS genetische und immunologische Faktoren beteiligt (Milo and Miller 2014). Auch verschiedenen Risikofaktoren wird eine Bedeutung bei der Entstehung der MS zugesprochen. Dazu zählen zum Beispiel Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus, Vitamin D Mangel und das Zigarettenrauchen (Wingerchuk 2011).

Bei der Pathogenese der MS kommt es zur Bildung sogenannter Plaques, welche aus inflammatorischen Zellen, demyelinisierten oder geschädigten Axonen und geschädigten Oligodendrozyten bestehen. Zudem ist in den Plaques eine Proliferation von Astrozyten, welche zu einer Gliose führt, zu sehen (Milo and Miller 2014).

Die ersten klinischen Zeichen der MS sind häufig Sehstörungen, motorische Beeinträchtigungen und Sensibilitätsstörungen (Platten et al. 2013). Am häufigsten tritt hier die Neuritis des N. opticus mit visuellen Komplikationen auf (Danesh-Sani et al. 2013). Weitere klinische Manifestationen sind eine Schwäche und Kraftlosigkeit in den Extremitäten, eine Gangunsicherheit sowie eine Ataxie (Hunter 2016). Im orofazialen Bereich können neben der Neuritis des N. opticus temporomandibuläre Erkrankungen, Dysarthrie, Dysphagie, Fazialisparese und Trigeminusneuralgie auftreten (Danesh-Sani

et al. 2013). Zu den weiteren Symptomen zählen Darmfunktionsstörungen und neurogene Blasenentleerungsstörungen (Noseworthy et al. 2000). Es werden auch kognitive Beeinträchtigungen, Depressionen und Verhaltensänderungen beobachtet (Danesh-Sani et al. 2013, Noseworthy et al. 2000).

Bei der MS gibt es unterschiedliche Krankheitsverläufe, wie die schubförmig-remittierende MS, die sekundär-progressive MS und die primär-progressive MS (Kuhlmann 2013). Die häufigste Form ist die schubförmig-remittierende MS. Sie ist charakterisiert durch akute Exazerbationen mit anschließenden Erholungsphasen. Die primär-progrediente Form ist charakterisiert durch eine kontinuierliche klinische Verschlechterung. Wenn die schubförmige MS in eine kontinuierliche Form übergeht, wird sie als sekundär-progrediente Form bezeichnet (Kuhlmann 2013).

Bei der MS spielt das erworbene Immunsystem eine wichtige Rolle. Hierzu zählen die B-Zell vermittelte Antikörperbildung und die T-Zell Aktivierung (Friese and Fugger 2009, Kim et al. 2009, Rudolph et al. 2006). Die T-Zellen besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TCR) mit einer Untereinheit CD (Cluster of differentiation) 3 und einem Korezeptor CD4 oder CD8 (Friese and Fugger 2009, Kim et al. 2009, Rudolph et al. 2006). CD-Proteine sind spezifische Antigene auf den Zelloberflächen (Geenen et al. 2001, Zola 2001). Der TCR ist entscheidend bei der Antigenerkennung. Dem TCR der T-Zellen werden Antigenfragmente durch antigenpräsentierende Zellen präsentiert. Die Antigenfragmente werden dabei an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) gebunden, von denen es zwei Klassen gibt, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. Die T-Zellen unterteilen sich in T-Helferzellen, welche CD4-positiv (CD4+) sind, und zytotoxische T-Zellen, welche CD8-positiv (CD8+) sind. Die CD8+ T-Zellen erkennen Antigenfragmente, welche durch MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Dies führt zu einer zelltoxischen Reaktion. Dahingegen bilden CD4+ T-Zellen einen Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen, was zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten mit Antikörperbildung führt (Friese and Fugger 2009, Kim et al. 2009, Rudolph et al. 2006).

Neben der T-Zell-vermittelten Autoimmunantwort sind weitere verschiedene immunologische Faktoren beteiligt. Initial werden die autoreaktiven CD4+ T-Helferzellen aktiviert, welche Antigene bilden, die sich gegen ZNS-Bestandteile richten. Im weiteren Verlauf migrieren antigenpräsentierende Zellen (Mikroglia und dendritische Zellen) an die Läsionsorte. Diese induzieren eine T-Zell- und B-Zell-Antwort sowie eine Produktion von Zytokinen, welche schlussendlich zu einer Schädigung von Myelin, Axon und Oligodendrozyten führen. So sind in den Plaques die typischen Merkmal der MS zu sehen: Inflammation, Demyelinisierung und Neurodegeneration (Milo and Miller 2014).

Die klinische Diagnose MS wird anhand der McDonald Kriterien gestellt, die 2017 modifiziert wurden (Thompson et al. 2018). In die Kriterien fließen die klinische Symptomatik des Patienten, die Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) und der Liquorbefund mit ein (Klotz et al. 2011).

1.2 Neuritis nervi optici (NNO)

Der N. opticus ist eines der am häufigsten betroffenen Gewebe bei der MS, anhand dessen wichtige pathologische Merkmale untersucht werden können.

Zunächst ist es wichtig, die Entwicklung des Auges und des N. opticus näher zu betrachten. Aus dem Neuralrohr entwickeln sich das Gehirn und das Rückenmark (Greene and Copp 2009). Auch das Auge entsteht aus dem Neuralrohr (Sinn and Wittbrodt 2013). Die verschiedenen Anteile des Auges werden aus dem Neuroektoderm, dem Oberflächenektoderm und dem dazwischenliegenden Kopfmesenchym gebildet, welches selbst aus dem paraxialen Mesoderm und kranialen Neuralleistenzellen abstammt. Das Neuroektoderm differenziert sich in die Retina, die hinteren Schichten der Iris, die inneren oberflächlichen Schichten des Ziliarkörpers und den N. opticus. Aus dem Oberflächenektoderm entstehen die Linse und das Epithel der Kornea. Die extraokulären Augenmuskeln stammen von mesenchymalen Zellen des prächordalen Mesoderms ab. Der fibröse sowie vaskuläre Anteil des Auges kommen dagegen aus dem Kopfmesenchym. Die Zellen der Neuralleiste entwickeln sich zum Stroma und Endothel der Kornea (Harada et al. 2007). In der 4. Entwicklungswoche stülpen sich die Augenbläschen aus dem Neuralrohr im Bereich des Vorderhirns aus (Fuhrmann 2010). Die Augenbläschen werden zum Augenbecher umgewandelt. Der Augenbecherstiel wird zum N. opticus (Harada et al. 2007, Sinn and Wittbrodt 2013). Aus diesem embryonalen Ursprung ergibt sich, dass der N. opticus Oligodendrozyten als myelinisierende Zellen hat. Die Neuroglia entstammen dem Neuroektoderm des Augenbecherstieles. Die Gliogenese wurde an Ratten genauer untersucht. Aus kleinen Glioblasten werden große Gliavorläuferzellen, die sich dann entweder zu Astrozyten oder zu Oligodendrozyten differenzieren (Vaughn 1969). Die Astrozyten machen am ersten postnatalen Tag ca. 70% der Neurogliazellen aus. Oligodendrozyten erscheinen erst später und machen am 7.-9. Tag postnatal, dem Beginn der Myelinisierung, ca. 20% aus und ihre Anzahl steigt dann im weiteren Entwicklungsverlauf an (Vaughn 1969). Beim Menschen werden die ersten aktiven, myelinisierenden Oligodendrozyten in der 28.-40. Woche nach Befruchtung detektiert. Bis zum Kindes- bzw. Jugendalter sind die meisten Fasern im N. opticus myelinisiert, wobei die Myelinbildung bis in die 2. und 3. Lebensdekade andauern kann (Semple et al. 2013).

Eine Erkrankung mit Demyelinisierung und Inflammation des N. opticus ist die Neuritis des N. opticus. Sie ist typischerweise mit der MS assoziiert und häufig das initiale Symptom der MS. Die meisten Patienten mit einer Neuritis des N. opticus entwickeln vor allem in den ersten Jahren nach deren Auftreten eine MS (5-Jahres-Risiko von 23.8%). Es sind häufig Frauen (78.6%), jüngere Menschen (Durchschnittsalter von 29.6 Jahren) und Kaukasier von der Neuritis des N. opticus betroffen (Marques et al. 2014).

Die Diagnose der Neuritis des N. opticus ist primär eine klinische Diagnose. Es sollte dennoch ein MRT zur Feststellung von Läsionen im N. opticus bzw. in den anderen Bereichen des Gehirns und des Rückenmarks gemacht werden. Zu den Symptomen der Neuritis des N. opticus gehören Schmerzen,

die vor allem bei Augenbewegungen (>90%) auftreten, ein meist unilateraler Visusverlust, ein typischerweise zentraler Gesichtsfeldverlust und eine rasche Verschlechterung der Sehschärfe (Balcer 2006).

Die Neuritis des N. opticus ist ein Symptom bei der MS, der opticospinalen MS (OS-MS) und der Neuromyelitis optica (NMO). Bei der OS-MS bestehen begleitend zerebrale Läsionen. Dagegen ist die NMO als eine Erkrankung definiert, die eine Neuritis des N. opticus sowie Rückenmarksläsionen, die sich über drei oder mehrere vertebrale Segmente erstrecken, umfasst ohne zwingende zerebrale Läsionen. Die NMO ist eine eigenständige Erkrankung, die man von der MS unterscheiden muss (Kezuka et al. 2011). Sie hat einen aggressiveren Verlauf und führt zu starken Beeinträchtigungen (Jacob et al. 2013). Die Präsenz von NMO-spezifischen Immunglobulinen (Ig) ist ein spezielles Merkmal der NMO. Typischerweise sind diese IgGs gegen den Aquaporin 4 (AQP4) Kanal gerichtet. AQP4 wird von Astrozyten exprimiert und reguliert den Wasser-, Glutamat- und Kalium-Transport (Jacob et al. 2013). Die AQP4-Antikörper gelangen über das Blut ins ZNS und können dann an astrozytäre AQP4-Proteine binden. Durch die resultierende Autoimmunreaktion wird eine Inflammation induziert (Lana-Peixoto and Talim 2019). Eine wichtige Rolle in der weiteren Pathogenese der NMO spielen das Komplementsystem, Makrophagen sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten. Es kommt zu einer Demyelinisierung und einer Inflammation, die bevorzugt perivaskulär zu sehen sind (Asavapanumas et al. 2014, Lucchinetti et al. 2002). Dieser Pathomechanismus ist der entscheidende Unterschied zwischen der NMO und der MS bzw. EAE (Lana-Peixoto and Talim 2019).

1.3 Tiermodelle der MS

Die MS ist eine sehr heterogene Erkrankung mit verschiedenen pathophysiologischen Merkmalen (Diem et al. 2007). Zu diesen Merkmalen zählen Demyelinisierung und Inflammation. In Läsionsorten im Gehirn von MS-Patienten werden neben der Inflammation und der Demyelinisierung auch Axondegenerationen beobachtet. Alle drei Faktoren stehen in engem funktionellen Zusammenhang miteinander (Ferguson et al. 1997, Trapp et al. 1998). Aufgrund des dadurch bedingten apoptotischen Zelltods der neuronalen Zellen kommt es im späten Stadium der Erkrankung zu einer Atrophie der grauen und weißen Substanz des Gehirns. Im Folgenden werden zwei Tiermodelle vorgestellt, anhand derer die Merkmale der MS besonders gut untersucht werden können: das Modell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und das Cuprizin-induzierte toxische Modell. Es gibt kein einzelnes Tiermodell, welches alle Merkmale einer MS widerspiegelt. Auch die verschiedenen Tiermodelle der EAE repräsentieren die MS-Merkmale in unterschiedlicher Ausprägung (Diem et al. 2007).

Das Cuprizin-induzierte Modell ist wohl das bekannteste toxische Modell der MS. Hierbei wird den Tieren der Kupfer-Chelator Cuprizin, welcher im Futter beigemischt wird, verabreicht. Das Cuprizin

verursacht eine Demyelinisierung mit Schädigung der Oligodendrozyten, die sich nach Absetzen der Cuprizon-Diät zurückbildet. So lassen sich im Cuprizon-Modell Demyelinisierung und Remyelinisierung besonders gut untersuchen. Die inflammatorische Komponente tritt hier nicht in den Vordergrund (van der Star et al. 2012).

Das EAE-Modell imitiert sowohl die inflammatorische als auch die demyelinisierende Komponente der MS (Constantinescu et al. 2011). Eine EAE kann sowohl in Mäusen als auch in Ratten induziert werden. Zunächst erfolgt dazu eine Immunisierung mit einem Myelin-spezifischen Antigen, z.B. mit Peptiden des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG) oder des basischen Myelinproteins (MBP), sowie Adjuvantien, z. B. inaktivierten Pathogenen (z. B. Mycobacterium) und dem kompletten Freund'schen Adjuvans (van der Star et al. 2012). Es kommt zu einer T-Zell Aktivierung in den Lymphknoten und der Milz. Diese T-Zellen wandern ins ZNS, wo sie durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden und eine autoreaktive inflammatorische Reaktion auslösen. Die Inflammation führt zu Gewebeschäden. Durch Verwendung verschiedener Spezies und Stämme sowie durch Immunisierung mit unterschiedlichen Antigenen kommt es zu distinkten Verlaufsformen und spezifischen pathologischen Merkmalen in der EAE (Constantinescu et al. 2011).

Bei den Modellen der EAE wird meist eine monophasische Erkrankung abgebildet mit den bereits oben erwähnten speziesspezifischen Unterschieden (van der Star et al. 2012). Bei der Induktion von EAE in Lewis Ratten mittels MBP steht die inflammatorische Antwort im Vordergrund (Constantinescu et al. 2011). Durch die Induktion der EAE in Dark Agouti-Ratten mittels MOG kommt es zur Demyelinisierung, zu Rückenmarksläsionen, perivaskulären und subpialen inflammatorischen Infiltraten (Constantinescu et al. 2011). Typische Merkmale der MOG-induzierten EAE in Brown Norway Ratten sind Inflammation und Demyelinisierung, die typischerweise den N. opticus betreffen. Die humorale Immunantwort mit Anstieg des relativen Levels der anti-MOG-Antikörper konnte ab dem 10. Tag nach Immunisierung mit MOG beobachtet werden. Die Induktion der zellulären Immunantwort mit Anstieg der CD3⁺ T-Zellen pro mm² war zeitlich mit dem Beginn der klinischen Symptomatik assoziiert (Fairless et al. 2012). In diesem Modell ist insbesondere im N. opticus die Axondegeneration markantes Symptom, das die anschließende Apoptose der retinalen Ganglionzellen zur Folge hat (Diem et al. 2007). Mit der Neurodegeneration, die noch vor Beginn der klinischen Symptomatik auftritt (Hoffmann et al. 2013), wurde eine erhöhte Calcium-Konzentration assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Ungleichgewicht in der Calciumhomöostase und der vermehrte Einstrom von Calcium in die Zellen eine Störung des axonalen Transportes und eine Neurodegeneration zur Folge hat (Fairless et al. 2014).

Der retinale Ganglienzellverlust und die Axonschädigung traten schon im frühen Erkrankungsstadium noch vor den klinischen Symptomen auf (Fairless et al. 2012). Der lokale Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke im Bereich der Retina war zeitgleich zum Verlust der retinalen Ganglionzellen zu beobachten. Dies traf ebenfalls mit dem Beginn des Anstiegs der Anzahl saurer Gliafaserprotein (GFAP)-positiver Astrozyten und der CD68-positiven reaktiven Mikroglia zusammen. Diese

Aktivierung ist jedoch nur ein lokales Ereignis und mit Aktivierung ortsansässiger Mikroglia und Astrozyten assoziiert (Fairless et al. 2012).

Die Immunisierung von SJL/J Mäusen mit einem Peptid der Aminosäuren 139-151 des Proteolipid-Proteins (PLP₁₃₉₋₁₅₁) resultierte in einer schubförmig-remittierenden Verlaufsform der EAE. Es kam zu einer T-Zell-vermittelten Läsionsbildung bevorzugt im N. opticus, Hirnstamm, Rückenmark, Kleinhirn und cerebralen Cortex (Constantinescu et al. 2011). Bisher wurden verschiedene EAE-Modelle mit unterschiedlichen Tieren und unterschiedlichen Induktionen dargestellt. Nun wurde das in dieser Arbeit wichtige Tiermodell näher betrachtet, die MOG-induzierte EAE in C57BL/6 Mäusen. Durch Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit einem Peptid der Aminosäuren 35-55 des MOG (MOG₃₅₋₅₅) kam es zu einer monophasischen oder chronischen Verlaufsform. Hier waren die typischen Merkmale Makrophagen- und T-Zell-vermittelte Inflammation und Demyelinisierung in der weißen Substanz des Rückenmarks.

Sonobe et al. gingen näher auf die T-Zell-Aktivität im EAE-Modell der C57BL/6J Mäuse ein, welche mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert wurden. Das Maximum der CD4⁺ T-Zellen in der Milz wurde am 12. Tag nach Immunisierung vor Beginn der klinischen Symptome detektiert und im ZNS wurde das Maximum bei ausgeprägter Klinik erreicht. Die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen war sowohl in der Milz als auch im ZNS deutlich geringer als die der CD4⁺ T-Zellen. In der Milz kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der CD8⁺ T-Zellen und im ZNS war das Maximum wie bei den CD4⁺ T-Zellen bei maximal ausgeprägter Klinik erreicht (Sonobe et al. 2007).

Bei der Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ kam es bei Erkrankungsbeginn zu einem Anstieg der Immunzell-Zahlen im ZNS mit einer Akkumulation von dendritischen Zellen und MOG-spezifischen T-Zellen im Gehirn (Clarkson et al. 2014). Diese inflammatorischen Gebiete sah man bevorzugt in der perivaskulären und der subpialen weißen Substanz. Im Krankheitsverlauf verlagerte sich diese Akkumulation von dendritischen Zellen und T-Zellen. Sie war zwischen Tag 12 und Tag 16 nach Immunisierung vor allem im Rückenmark und nicht mehr im Gehirn zu sehen (Clarkson et al. 2014).

Die Astrozyten spielten bei der EAE ebenfalls eine wichtige Rolle. In einer Untersuchung des N. opticus in EAE Mäusen wurden u.a. C57BL/6 Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und vor allem die präklinische Phase genauer beleuchtet (Wang et al. 2005). Schon in einer frühen Phase, vor Beginn der klinischen Symptome, zeigten sich in beiden Mausstämmen Axonschädigungen und eine Astroglie. Zu diesem Zeitpunkt sah man aber noch keine oder nur eine geringe Anzahl an T-Zellen im Parenchym. Sowohl die Axonschädigungen als auch die Astroglie war bei den C57BL/6 Mäusen ausgeprägter wie bei den NOD/Lt-Mäusen (Wang et al. 2005).

Im Vergleich zu einem Mausstamm wie den CBA, welcher nur gering für autoimmune Erkrankungen anfällig ist, ist der C57BL/6 Stamm sehr anfällig für autoimmune Erkrankungen. Es zeigte sich eine Erhöhung des anti-MOG-Antikörpertiters bereits bei nicht-immunisierten C57BL/6 Mäusen (Bestimmung der anti-MOG Titer mittels ELISA: 0.023 relative Absorption bei 450 nm Wellenlänge).

Durch die MOG-Induktion der C57BL/6 Mäusen kam es innerhalb von 10 Tagen zu einem 3,9 fachen Anstieg der relativen Konzentration im ELISA. Bei CBA Mäusen sah man keine erhöhten Werte. Gesunde, unbehandelte Mäuse des C57BL/6 Stammes hatten demzufolge bereits physiologisch in geringer Anzahl Autoantikörper (Doronin et al. 2016). Dieser Mausstamm eignet sich daher sehr gut für eine EAE-Induktion, da er auf die Induktion gut reagiert. Im weiteren beobachtete Doronin in den mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten C57BL/6 Mäusen einen signifikanten Anstieg der anti-MOG-Antikörper und eine Proteinurie im Beobachtungszeitraum von 40 Tagen. Es kam in diesem EAE-Modell zu einem Anstieg der anti-MOG-Antikörper, der anti-DNA-Antikörper und der Aktivität der DNase und Proteasen, wie DNA-, MOG- und MBP hydrolysierende IgG. Dieser Anstieg war während der akuten Phase der EAE - mit seinem Maximum um ca. den 22. Tag nach Immunisierung - zu beobachten. Zum selben Zeitpunkt kam es auch zu einem Anstieg der Lymphozytenanzahl im Knochenmark, der Milz und Thymus und gleichzeitig zu einem Abfall der Zellapoptoserate (Doronin et al. 2016). In dieser Arbeit wurde EAE in C57BL/6 Mäusen mittels des MOG₃₅₋₅₅ Peptids induziert, da dieses Modell der menschlichen MS mit vielen Merkmalen sehr nahe kommt: Es lassen sich hier besonders zwei Hauptmerkmale, die Inflammation und Demyelinisierung, gut nachweisen und die dadurch bedingten zellulären Veränderungen weiter untersuchen.

1.4 Gliazellen

Zu den Gliazellen des ZNS zählen Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen.

Oligodendrozyten sind für die Myelinisierung der Axone im ZNS verantwortlich. Sie sind nicht nur für die Ausbildung des Myelins, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Myelinisierung zuständig (Gielen et al. 2006). Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs)) sind neuroepitheliale Zellen (Emery 2010) und wandern erst zum Zeitpunkt um die Geburt herum in das ZNS und differenzieren sich dann weiter. Damit beginnt auch erst zu diesem Zeitpunkt die Myelinisierung der Nervenfasern (de Hoz and Simons 2015, Emery 2010). Bei der MS und der EAE kommt es zur Apoptose der Oligodendrozyten und damit zu Defekten in Myelinisierung und Remyelinisierung (Cudrici et al. 2006).

Die Hauptaufgaben der Astrozyten sind die Aufrechterhaltung der Homöostase, des pH-Wertes und die Regulation der Kalium- und Glutamat-Konzentration (Nagy and Rash 2003, Sofroniew and Vinters 2010). Sie bilden ein astrozytäres gliales Synzytium, welches für die Aufnahme der Ionen nach einer neuronalen Aktivierung, den Weitertransport und die Abgabe der Ionen an die superfizialen kortikalen Schichten zuständig ist (Nagy and Rash 2003). Astrozyten sind ein wichtiger Bestandteil für die Aufrechterhaltung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke. Zudem bilden Astrozyten eine Komponente der sogenannten „dreiteiligen“ Synapse (engl. tripartite synapse) und sind somit mitverantwortlich für den korrekten Ablauf der Erregungsweiterleitung. Sie transportieren das im extrazellulären Raum angereicherte Kalium ab (Chaboub and Deneen 2013). Andererseits sezernieren

Astrozyten unter pathologischen Bedingungen z.B. pro-inflammatorische Zytokine, die in höherer Konzentration schädlich sind und an vielen Erkrankungen des ZNS beteiligt sind (Kielian 2008).

Mikroglia entwickeln sich aus myeloiden Vorläuferzellen und wandern während der frühen embryonalen Phase ins Gehirn ein. Eine ihrer Funktionen ist die Phagozytose toter Zellen und Zellbestandteile. In einem sich von Geburt an entwickelnden gesunden Gehirn kommt es ständig zur Apoptose und Zellneubildung (Schafer and Stevens 2015). Die Phagozytose durch Mikroglia spielt daher nicht nur bei Erkrankungen und Verletzungen eine Rolle, sondern auch im gesunden Gewebe, welches sich ständig erneuert. Eine weitere Aufgabe der Mikroglia ist die Bildung von Signalstoffen (z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Glutamat), welche u.a. neuronale Apoptose induzieren können (Schafer and Stevens 2015). Eine entgegengesetzte Funktion der Mikroglia ist, dass sie das Überleben und die Proliferation der Neurone und ihrer Vorläuferzellen unterstützen. Die Zusammenhänge zwischen Mikroglia-Aktivierung und EAE wurden in den letzten Jahren zunehmend aufgeschlüsselt. Bei der MS und der EAE kam es zu einer Aktivierung der Mikroglia. Dabei haben Mikroglia-Zellen anscheinend auch eine protektive Funktion, indem sie die bei der Demyelinisierung anfallenden Myelinbestandteile phagozytierten und damit die Remyelinisierung erleichterten. Mikroglia sezernierten sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Zytokine und Chemokine (Voet et al. 2019). An der Mediation ihrer Effekte scheint auch der von Mikroglia sezernierte Insulin-like growth Faktor (IGF)-1 eine Rolle zu spielen. Dabei soll IGF-1 an den entsprechenden Rezeptor neuronaler Vorläuferzellen binden, wodurch deren Zelltod verhindert wird (Schafer and Stevens 2015).

1.5 Connexine

Connexine sind die Proteinbestandteile von Gap Junction-Kanälen. Ein Hexamer aus Connexinen bildet einen Hemikanal, das sogenannte Connexon (Belousov et al. 2017, Goodenough et al. 1996, White and Paul 1999). Hemikanäle sind Membrankanäle, welche den extrazellulären Raum mit dem intrazellulären Raum verbinden (Belousov et al. 2017). Durch die Zusammenlagerung von zwei Connexonen der Zellmembranen benachbarter Zellen entsteht ein Gap Junction-Kanal (Goodenough et al. 1996, Sohl et al. 2005, White and Paul 1999). Diese interzellulären Kanäle sind wichtig für die direkte Diffusion von Ionen und kleineren Molekülen ($< 1,0$ kDa) zwischen zwei benachbarten Zellen (Goodenough et al. 1996, Sohl et al. 2005, White and Paul 1999). Bei Mäusen sind 20 Connexine und beim Menschen 21 Connexine bekannt (Sohl and Willecke 2004), welche generell eine Zelltyp-spezifische Verteilung aufweisen (Abrams and Scherer 2012, Rash et al. 2001b).

Die Bezeichnung der Connexine erfolgt nach ihrem ungefähren Molekulargewicht (Beyer and Berthoud 2018, Goodenough et al. 1996, White and Paul 1999). Ein Connexon kann aus den gleichen Connexin-Untereinheiten (Homomere) oder aus unterschiedlichen Connexin-Untereinheiten (Heteromere) bestehen. Ist ein Gap Junction-Kanal aus denselben Connexonen aufgebaut, wird er als

homotypisch bezeichnet. Ist er aus verschiedenen Connexonen aufgebaut, wird der Kanal als heterotypisch bezeichnet (Goodenough et al. 1996, White and Paul 1999).

Connexin-Proteine enthalten vier hydrophobe Transmembrandomänen (M1-M4), zwei extrazelluläre Schleifen (E1, E2) und eine zytoplasmatische Schleife (CL) (Goodenough et al. 1996). Der extrazelluläre Anteil ist für die Erkennung und Kopplung der beiden Connexone wichtig (Sosinsky 1996). Die zytoplasmatischen Anteile beeinflussen die physiologischen Eigenschaften des Kanals (Sosinsky 1996), beinhalten Phosphorylierungsstellen (Solan and Lampe 2009, 2018) sowie Bindungsstellen für zytoplasmatische Proteine (Giepmans 2004). In ihrer Funktion als interzelluläre Kanäle beeinflussen Gap Junctions die interzelluläre Kommunikation, das Überleben, die Differenzierung, den Metabolismus, die Morphogenese und die Mutagenese von Zellen (Sosinsky 1996).

Im ZNS bilden Astrozyten das größte über Gap Junction verbundene zelluläre Netzwerk. Die Connexine der Astrozyten sind Connexin (Cx) 26, Cx30 und Cx43 (Abrams and Scherer 2012, Rash et al. 2001b).

In den Gap Junctions zwischen den Astrozyten findet man hauptsächlich Cx43. Auch Cx26 und Cx30 finden sich im Bereich inter-astrozytärer Gap Junctions und kolokalisieren zumeist mit Cx43 (Nagy and Rash 2003). Die Expression der drei Connexine ist je nach Hirnregion verschieden. Bei einer neuronalen Aktivität kommt es zu einer durch das astrozytäre Gap Junction Netzwerk vermittelten gesteigerten interzellulären Kommunikation. Die Funktion der astrozytären Gap Junction beinhaltet u.a. die Aufnahme von Kalium und dessen Abtransport (Nagy and Rash 2003).

Astrozyten bilden sowohl untereinander als auch mit Oligodendrozyten Gap Junctions aus (Nagy and Rash 2003), wobei auf astrozytärer Seite insbesondere Cx26- und Cx43-Proteine an der Bildung der Gap Junctions zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten beteiligt sind (Nagy et al. 2011). Cx26 findet man gehäuft im ZNS in den Leptomeningen, wie sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte (Nagy et al. 2001). Das dritte astrozytäre Connexin, Cx30, wird bevorzugt in Astrozyten an den Orten exprimiert, an welchen Astrozyten mit den Blutgefäßen interagieren. Mit zunehmendem Alter steigt die Cx30-Expression (Mansour et al. 2013). Die Cx30-Immunfluoreszenz ist mit der astrozytären Cx43-Immunfluoreszenz colokalisiert und mit der oligodendrozytären Cx32-Immunfluoreszenz coassoziert (Nagy et al. 2003a).

Oligodendrozyten exprimieren drei Connexine: Cx29, Cx32 und Cx47 (Kleopa et al. 2004). In großen myelinisierten Axonen exprimieren die Oligodendrozyten vorwiegend Cx32, während in kleineren Fasern Cx29 vermehrt exprimiert ist (Abrams and Scherer 2012, Kleopa et al. 2004). Die vorwiegende Lokalisation des Cx29 sind die Myelinschichten kleinerer Nervenfasern und dort insbesondere die innerste, adaxonale Membran der Myelinscheide, vor allem im Bereich der juxtapanodalen Region (Li et al. 2002). Für Cx29 konnte die Bildung funktioneller Gap Junction-Kanäle bislang nicht nachgewiesen werden (Abrams and Scherer 2012). Eine mögliche Funktion wird jedoch im Zusammenhang mit Kalium-Kanälen diskutiert: Cx29 Connexone (Rosetten) der myelinisierenden

Zellen liegen den axonalen Kaliumkanälen Kv1.1 und Kv1.2 gegenüber, insbesondere in der juxtapanodalen Region und in geringerem Ausmaß auch in der internodalen Region (Rash et al. 2016). Somit könnten Kv1/Cx29 Kanäle eine axon-gliale Verbindung bilden, was zu einem schnellen Kalium-Transport und somit zu einer schnellen Repolarisation führen würde (Rash et al. 2016).

Cx32 findet man in Gap Junctions im Bereich der Zellkörper sowie in den proximalen Fortsätzen der Oligodendrozyten (Menichella et al. 2003). Im Perikaryon liegen Cx32 und Cx47 benachbart. Cx32 ist hauptsächlich an der äußeren Seite von größeren myelinisierten Nervenfasern lokalisiert. Cx32 und Cx29 sind nicht in räumlicher Nähe exprimiert und bilden keine gemeinsamen Gap Junction-Plaques oder funktionelle Gap Junctions aus (Altevogt et al. 2002, Kleopa et al. 2004).

Das Cx47-Protein ist bevorzugt in den Perikarya und den proximalen Fortsätzen zu finden (Kleopa et al. 2004). Die Expression des oligodendrozytären Cx47-Proteins wurde ab Tag 11.5 der Embryonalzeit beschrieben und stieg an bis zum Tag der Geburt. Anschließend fiel die Cx47-Proteinexpression wieder ab (Parenti et al. 2010). Bei Untersuchungen des ZNS und Rückenmarks bei Ratten und Mäusen sah man, dass Cx47 bevorzugt auf der oligodendrozytären Seite heterogener Gap Junctions zwischen Oligodendrozyten und Astrozyten lokalisiert ist. Cx32 dagegen bildet bevorzugt autologe oligodendrozytäre Gap Junctions im Bereich der Schmidt-Lanterman Inzisuren und zwischen den paranodalen Schleifen aus (Kamasawa et al. 2005).

Interessanterweise sind sowohl Cx29 als auch Cx32, nicht jedoch Cx47, auch in Schwannzellen, den myelinisierenden Zellen des Peripheren Nervensystems (PNS), exprimiert. Auch hier weisen beide Proteine eine distinkte subzelluläre Lokalisation auf (Li et al. 2002, Meier et al. 2004).

Oligodendrozyten bilden hauptsächlich mit Astrozyten Gap Junctions (Rash et al. 2001b). Funktionelle Gap Junctions wurden z.B. zwischen astrozytärem Cx43 und oligodendrozytärem Cx47 bzw. zwischen astrozytärem Cx30 und oligodendrozytärem Cx32 nachgewiesen (Kleopa et al. 2004, Nagy et al. 2003b). Ultrastrukturelle Untersuchungen legen nahe, dass keine Gap Junctions zwischen Oligodendrozyten oder zwischen Oligodendrozyten und Neuronen gebildet werden (Rash et al. 2001a).

In neuronalen Zellen wird keines der genannten glialen Connexine exprimiert. Lediglich für Cx43 wurde die Expression in Vorläuferzellen bzw. frühen neuronalen Entwicklungsstadien diskutiert (Liu and Yang 2015, Swayne and Bennett 2016). Neuronale Zellen exprimieren hingegen Zelltyp-spezifisch Cx36 (Condorelli et al. 1998, Rash et al. 2001b), das in interneuronalen Gap Junctions nachgewiesen wurde (Rash et al. 2001b). In einer *in vitro* Untersuchung von Kulturen primärer Neurone der Maus wurde der Einfluss des Cx36 auf die neuronale Differenzierung deutlich: Eine Cx36-Überexpression steigerte die Anzahl der überlebenden Neurone, während die Reduktion des Cx36 zu einer sinkenden Anzahl an Neuronen führte (Hartfield et al. 2011). Aus diesen Daten wurde postuliert, dass Cx36 einen direkten Einfluss auf die Regulation der Neurogenese hat (Hartfield et al. 2011). Eine funktionelle Bedeutung hat Cx36 insbesondere in Interneuronen, in denen ein Einfluss auf oszillatorische neuronale Aktivität gezeigt werden konnte (Hormuzdi et al. 2001). Auch

in retinalen Neuronen ist Cx36 exprimiert: Cx36-Immunreaktivität wurde in der inneren und äußeren plexiformen Schicht der Retina detektiert (Meier et al. 2002).

1.6 Connexine und EAE/MS

Insbesondere für die glialen Connexin-Proteine konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine EAE zu Veränderungen der Connexin-Expression, insbesondere in Gehirn und Rückenmark, führt (Brand-Schieber et al. 2005, Markoullis et al. 2012a, Roscoe et al. 2007a, Roscoe et al. 2007b).

Im Rückenmark von EAE-Mäusen war eine Reduktion von Cx43 in Arealen mit Demyelinisierung und Axonschädigung zu sehen (Brand-Schieber et al. 2005). Dabei wurde jedoch keine Reduktion der Astrozytenzahl festgestellt. Die Abnahme des Cx43 wurde auch nicht durch die Zunahme eines anderen Connexins, wie z. B. Cx30, kompensiert (Brand-Schieber et al. 2005). Auch in der Studie von Roscoe et. al. wurde gezeigt, dass eine Reduktion von Cx43-Protein in Läsionsherden im Rückenmark von EAE-Mäusen zu sehen ist (Roscoe et al. 2007a). Hingegen konnte in Meerschweinchen in der Phase der Remyelinisierung ein deutlicher Anstieg der Cx43-Expression beobachtet werden (Roscoe et al. 2007b).

Im toxisch-induzierten Cuprizone-Modell zeigte sich ca. 5 Wochen nach Cuprizongabe eine Reduktion der Cx47-Expression, die einherging mit einer Verminderung der Oligodendrozytenzahl und somit auch des Myelins (Parenti et al. 2010). Während der Phase der Remyelinisierung stieg die Cx47-Expression hingegen wieder an (Parenti et al. 2010).

Diese Veränderungen in der Expression glialer Connexine, die wichtige Funktionen in den Gliazellen innehaben, könnten funktionelle Veränderungen der Gliazelle zur Folge haben und damit indirekt auch die neuronale Aktivität beeinflussen. Ob die übrigen astrozytären und oligodendrozytären Connexine ebenfalls betroffen sind oder ihre Expression kompensatorisch hoch- oder herunterreguliert wird, ist noch nicht bekannt.

1.7 Fragestellung und Hypothese

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass es in verschiedenen Tiermodellen der MS zu einer Expressionsänderung glialer Connexine kam. Dies wurde für das astrozytäre Cx43 im Rückenmark (Brand-Schieber et al. 2005, Markoullis et al. 2012a, Roscoe et al. 2007a, Roscoe et al. 2007b) und für Cx47 in Rückenmark und Gehirn gezeigt (Markoullis et al. 2012a, Parenti et al. 2010).

Ein Symptom gerade in der frühen Phase der MS ist eine Neuritis des N. opticus. Die Expression der glialen Connexine soll daher in einem Tiermodell der MS, der EAE, im N. opticus analysiert werden. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass die Expression astro- und oligodendrozytärer Connexine in demyelinisierten Läsionen der EAE verändert ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Effekte der EAE im N. opticus mittels Histologie, Immunhistologie und quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Geräte

Gerät		Firma
Digitalkamera (Fluoreszenzmikroskop)	AxioCam MRm	Zeiss, Jena, Deutschland
Dispergiergerät	Dispergierantrieb T10 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Eismaschine	AF 100	Scotsman, Berlin, Deutschland
Feinwaage	PLE Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Observer Z.1	Zeiss, Jena, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Froster-Lab	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	HERAfreeze	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
Halogenlampe	HXP 120C	Zeiss, Jena, Deutschland
Kamera (Axiophot)	Color View II	Olympus corporation, Hamburg, Deutschland
Kamera (Fluoreszenzmikroskop)	AxioCam MRm	Zeiss, Jena, Deutschland
Kamera (Leica DM 2500)	Leica DFC 290 HD	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kryostat	Leica CM 1950 Kryostat	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank	Labex	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica DM 1000	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica DM 2500	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop	Axiophot	Zeiss, Jena, Deutschland

Material und Methoden

Magnetrührer mit Heizplatte	VMS-C7 Advanced	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer	neoMag Magnetrührer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Objektive (Fluoreszenzmikroskop)	EC Plan-Neofluar 10x, Plan-Apochromat 20x, Plan-APO 40x/1,3 Oil	Zeiss, Jena, Deutschland
Objektive (Axiophot)	Plan-Neofluar 5x/0,15 Plan-Neofluar 10/0,30 Plan-Neofluar 20x/0,50 Plan-Neofluar 40x/0,75 Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil	Zeiss, Jena, Deutschland
Objektive (Leica DM 2500)	1.25x/0.04 5x PH0, 10x/0.25 PH1, 20x/0.040 PH1, 40x/0.65 PH2, 100x/1.25 Oil PH3	Leica, Wetzlar, Deutschland
Pipetten		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	S20 - SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real-Time PCR-Cycler	Step One Plus Real-Time System	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler	Bioer LifeTouch Thermal Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Vortexer		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vortexer	Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Wärmeschrank		Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Material und Methoden

Zentrifuge	himac CT 6 EL	VWR by Hitachi Koki Co.,Ltd, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Dako Pen	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Deckgläser 24x50 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Kryo Aufbewahrungsbox	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger 76x26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Objektträgerkasten	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
RNeasy Mini Spin Column	Qiagen, Hilden, Deutschland
Safeseal Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Streckblättchen	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
96 Well PCR Platte	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin	PAA, Pasching, Österreich
Chloroform (>99% puriss.)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cresylviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	VWR, Darmstadt, Deutschland
dNTP mix (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Eosin G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig 100%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, 99% vergällt m. 1% MEK	Biesterfeld Chemiedistribution, Friedrichsthal, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Normales Ziegen Serum (NGS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immersionsöl NF 50cc	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Immersol™ 518F	Zeiss, Jena, Deutschland
Kaliumchlorid	Grüssing, Filsum, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Luxol-Fast-Blue (LFB)-Pulver	Acros Organics, New Jersey, USA
Lithium-Carbonat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Material und Methoden

Moloney-Mausleukämievirus (M-MuLV)	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Reverse Transkriptase	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
10x MuLV reverse Transkriptase Buffer	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Oligo dT (Desoxythymidin) ₁₈ Primer	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Ribonuklease (RNase) Inhibitor	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
RNase Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti Histokitt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti Histol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Mount Aqua	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Takyon Rox SYBR MasterMix dTTP Blue	Eurogentec, Köln, Deutschland
Tissue Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek Europe, Staufen, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol, Isomerenmischung	VWR, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Bestellnummer	Firma
Rat anti-mouse CD3	MAB4841	R&D Systems, Darmstadt, Deutschland
Rabbit anti-Connexin 29	34-4200	Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Rabbit anti-Connexin 30	71-2200	Zymed Laboratories Inc., South San Fransisco, USA
Rabbit anti-Connexin 43	71-0700	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Rabbit anti-Connexin 47	36-4700	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Sekundärantikörper	Bestellnummer	Firma
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit	A11034	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit	A11011	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG	A-11007	Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Primer

Name	Spezies	Sequenz 5'-3'	Produkt- größe [bp]	Sequenz- Referenz
18S fwd	Maus, human	AAACGGCTACCACATCCAAG	155	(Raslan et al. 2016)
18S rev	Maus, human	CCTCCAATGGATCCTCGTTA		
Cx26 fwd	Maus	TCACAGAGCTGTGCTATTTG	58	(Ortolano et al. 2008)
Cx26 rev	Maus	ACTGGTCTTTTGGACTTTCC		
Cx 29 fwd	Maus	CAAGCTTCTCTGGGCCTATG	167	*
Cx 29 rev	Maus	CAGAGGGGTGAGACTGGAAA		
Cx30 fwd	Maus	GGCCGAGTTGTGTTACCTGCT	95	(Ortolano et al. 2008)
Cx30 rev	Maus	TCTCTTTCAGGGCATGGTTGG		
Cx32 fwd	Maus	CCTGCAGCTTATCTTGGTTTCC	147	*

Material und Methoden

Cx32 rev	Maus	ATGTGCACCTTGTGTCTCTTTACC		
Cx36 fwd	Maus	TTAAAGAGCTGACTCCACATCCATC	82	*
Cx36 rev	Maus	AAGCGGGAGATACCTTCCTGTC		
Cx 43 fwd	Maus	TGGAGTAGGCTTGGACCTTG	123	(Chu et al. 2018)
Cx 43 rev	Maus	CTCCAAGGAGTTCCACCACT		
Cx47 fwd	Maus	TCCAAGTTCACCTGCAACACG	111	*
Cx47 rev	Maus	GGAGATGACCACTATCTGGAAGACC		

Die mit * markierten Primersequenzen wurden mittels der Software Primer-BLAST (Ye et al. 2012) entwickelt.

2.1.6 Software

Software	Firma
Axio Vision SE64 Rel. 4.8	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
CellSens Standard 1.8.1	Olympus corporation, Hamburg, Deutschland
Endnote X6.0.1	Thomson Reuters, Frankfurt am Main, Deutschland
GIMP 2	Freie Software, https://www.gimp.org
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA
ImageJ	(Schneider et al. 2012)
LAS V4.2.0	Leica, Wetzlar, Deutschland
StepOne Software v2.3	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.2 Puffer und Lösungen

10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, engl.: phosphate buffered saline), pH 7,4:

Es wurden 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄·2H₂O und 2,4 g KH₂PO₄ in 1l dest. H₂O unter Rühren gelöst.

1x PBS:

Das 10x PBS wurde im Verhältnis 1:10 mit dest. H₂O verdünnt.

1x PBS + 0,005% Tween 20 (1l):

Es wurde zunächst 1l einer 1x PBS Lösung hergestellt. Zu dieser Lösung wurden 50 µl Tween 20 hinzu pipettiert.

Normales Ziegen Serum (Normal Goat Serum; NGS)-Blockierungslösung (10%):

Für die Herstellung von 100 ml 10% iger NGS-Blockierungslösung wurden 10 ml des NGS und 100 µl Triton X-100 in 90 ml 1xPBS gelöst.

Bovines Serumalbumin (Bovine Serum Albumin; BSA)-Blockierungslösung (0,2%):

Für die Herstellung von 100 ml 0,2%iger BSA-Blockierungslösung wurde 0,57 ml BSA (35% Lösung; 34,4 g/dl) in 90 ml 1xPBS gelöst.

Eosin (0,1%ig):

Es wurden 100 mg Eosin G in 100 ml dest. H₂O gelöst.

Lithium-Carbonat-Lösung (0,05%ig):

Es wurde 0,1 g Lithium-Carbonat in 200 ml dest. H₂O gelöst.

Luxol-Fast-Blue (LFB)-Lösung (0,1%ig):

Es wurde 0,2 g LFB-Pulver in 200 ml 96%iges EtOH gelöst. Anschließend wurde 1 ml 10%iger Eisessig hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt unter Rühren bei 40°C auf der Heizplatte.

2.3 Tierexperimentelle Arbeiten

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden von Frau Prof. Dr. R. Diem (Klinik für Neurologie; Universitätsklinikum des Saarlandes; jetzt: Neurologische Klinik, Universität Heidelberg) und Frau Dr. S. Williams (Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes; jetzt: Neurologische Klinik, Universität Heidelberg) bzw. von Frau Dr. N. Hainz (Fachrichtung Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Frau Prof. Dr. C. Meier, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Die Gewebeaufarbeitung wurde von Frau Dr. B. Schäfer und Frau Dr. N. Hainz (Fachrichtung Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Frau Prof. Dr. C. Meier, Universität des Saarlandes) übernommen.

2.4 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die Induktion der EAE in den Mäusen haben Frau Prof. Dr. R. Diem und Frau Dr. S. Williams vorgenommen. Dafür wurden 6-8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse mit Isofluran in eine Kurznarkose versetzt. Anschließend wurden ihnen folgende Substanzen appliziert: 200 µl einer Emulsion aus Freund'schem Adjuvans (10 mg/ml) und des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) 35-55 Peptids, welche im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Die Endkonzentration des MOG betrug 300 µg MOG pro 200 µl fertiger Emulsion. Diese Emulsion wurde subkutan verteilt, in die axillären und inguinalen Lymphknotenregionen, appliziert. Direkt anschließend und 48 h später wurde eine Pertussistoxin-Lösung (300 ng Pertussistoxin) intraperitoneal injiziert. Das Pertussistoxin sollte die Immunantwort verstärken. Erste klinische Symptome traten ca. 13 Tage nach der Injektion auf. Der höchste Scorewert wurde zwischen Tag 28 und Tag 30 erreicht (Williams et al. 2011, Williams et al. 2014). Die klinischen Symptome der Tiere wurden wie folgt bestimmten Scores zugeordnet:

Score 0:	keine Symptome
Score 0,5:	Parese der Schwanzspitze
Score 1:	Parese des gesamten Schwanzes oder leichte Ataxie
Score 1,5:	Schwanzparese und leichte Schwäche der Hinterbeine
Score 2,0:	einseitige schwere Hinterbeinparese oder mittelgradige Ataxie mit Gangunsicherheit
Score 2,5:	beidseitige schwere Hinterbeinparese
Score 3,0:	komplette beidseitige Hinterbeinparalyse
Score 3,5:	komplette beidseitige Hinterbeinparalyse und Schwäche eines Vorderbeins oder schwere Ataxie mit dem Unvermögen zu laufen
Score 4:	Hinterbeinparalyse und Vorderbeinparese
Score 4,5:	Paralyse aller vier Extremitäten (Tetraplegie)
Score 5:	Tod der Tiere

Bei manchen Tieren kam es durch Gleichgewichtsstörungen und Koordinationsstörungen zu Gangunsicherheiten. Täglich wurden die klinischen Symptome der Tiere dokumentiert.

In dieser Arbeit wurden die Scores zu drei Scoregruppen zusammengefasst. Mäuse mit den Scores 0,5 und 1 bildeten die Scoregruppe 1; Mäuse mit den Scores 1,5 und 2 wurden zu der Scoregruppe 2 zusammengefasst und die Scores 2,5 und 3 bildeten die Scoregruppe 3. In unserer Untersuchung wurden je drei Mäuse aus jeder Scoregruppe sowie drei Kontrollmäuse, i.e. gesunde Mäuse ohne EAE-Induktion, untersucht (n = 3). Die drei Mäuse der Scoregruppe 1 hatten alle Score 1. Die drei Mäuse in der 2. Scoregruppe hatten einmal Score 1,5 und zweimal Score 2. Die Tiere der Scoregruppe 3 hatten zweimal Score 2,5 und einmal Score 3.

2.5 Organentnahme

Die Organe der Tiere wurden von Frau Dr. S. Williams (Klinik für Neurologie; Universitätsklinikum des Saarlandes; jetzt: Neurologische Klinik, Universität Heidelberg) bzw. Frau Dr. B. Schäfer und Frau Dr. N. Hainz (Fachrichtung Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Frau Prof. Dr. C. Meier, Universität des Saarlandes) entnommen.

Nach dem Töten der Mäuse wurden Milz und Gehirn sowie die Nn. optici entnommen. Milz und Gehirn dienten als Positivkontrollen für die Antikörper. Das Gewebe für die Histologie und Immunfluoreszenz wurde dann in OCT-Eindeckmedium in sogenannten „moulds“ eingebettet, in der Gasphase des Flüssigstickstoffs eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die qRT-PCR wurde das Gewebe der Nn. optici in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.6 Kryoschnitte

Kryoschnitte der in OCT eingebetteten Organe wurden am Kryostaten (Leica CM 1950) erstellt. Von den Nn. optici wurden Querschnitte mit einer Dicke von 12 µm angefertigt. Auf den Objektträgern befanden sich jeweils drei Anschnitte. Es wurden zunächst 10er Serien, also 10 Objektträger mit je drei Anschnitten, hergestellt. Exemplarisch dargestellt für den ersten Objektträger waren auf diesem die Schnitte 1, 11 und 21.

2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung dient als histologische Übersichtsfärbung. Das Zytoplasma erscheint bei dieser Färbung rosé-rot, während sich die Zellkerne blau-violett färben.

Im ersten Schritt wurden die Schnitte für 5 min bei -20°C in 100%igem Ethanol (EtOH) fixiert. Nach dem Waschen in destilliertem Wasser für 2 min kamen die Schnitte für 2 min in die Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser erneut kurz gespült. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Es schloss sich ein weiterer Waschvorgang in destilliertem Wasser für 1 min an. Danach wurden die Schnitte 3-mal in 0,1%iges Eosin eingetaucht. Es folgte erneut ein 2- bis 3-maliges Eintauchen in destilliertem Wasser. Zum Schluss durchliefen die Schnitte noch die aufsteigende Alkoholreihe, i.e. zunächst kurz in 70%igem Alkohol, dann jeweils 1 min in 80%igem Alkohol und dann in 90%igem Alkohol. Nach 2-mal 4 min in 100%igem Ethanol (EtOH), kamen die Schnitte noch 3-mal 4 min in eine Roti-Histol-Lösung. Anschließend erfolgte das Eindecken mit Roti-Histokitt.

2.8 Luxol-Fast-Blue-Färbung

Mit der Luxol-Fast-Blue (LFB)-Färbung wird die Myelinschicht dargestellt. Die Kerne sind bei dieser Färbung dunkelblau und die Myelinschicht ist hellblau-türkis angefärbt.

Am ersten Tag wurden die Schnitte in 100%igem Ethanol bei -20°C für 10 min fixiert und anschließend für 5 min in 96%igem Ethanol bei Raumtemperatur inkubiert. Danach kamen sie in eine Küvette mit 0,1%iger LFB-Lösung. Die Küvette wurde mit einem Deckel und Parafilm abgedichtet und so für 24 h bei Raumtemperatur belassen.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte 2-mal bis 3-mal zum Abspülen der Farblösung in destilliertes Wasser getaucht. Zur Differenzierung kamen die Schnitte dann nacheinander zunächst für 3 s in Lithium-Carbonat, wurden dann für 10 s in 70%igem Ethanol geschwenkt und zum Schluss in destilliertem Wasser abgewaschen. Nun wurden die Schnitte für 1 min und 20 s in der Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich inkubiert und dann mit destilliertem Wasser ab gespült, bevor sie für 5 min zum Bläuen in fließendes Leitungswasser gebracht wurden. Anschließend durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe: 2-mal 96%iges EtOH für jeweils 2 min, dann 2-mal 100%iges EtOH für jeweils 2 min. Danach folgen 3-mal 2 min Inkubation in 100%igem Xylol. Abschließend erfolgte das Eindecken mit Roti-Histokitt.

2.9 Auswertung der histologischen Bilder

Fotografien der HE-gefärbten Schnitte wurden am Lichtmikroskop (Leica DM 2.500) mit den Objektiven 20x und 40x gemacht. Das Lichtmikroskop war mit einer Kamera (Leica DFC 290 HD, Leica) und der Leica Application Software (LAS V4.2.0) sowie fünf Objektiven (1.25x/0.04 5x PH0; 10x/0.25 PH1; 20x/0.040 PH1; 40x/0.65 PH2; 100x/1.25 Oil PH3) ausgestattet (Leica, Wetzlar, Deutschland). Diese lichtmikroskopischen Fotos wurden zur Auswertung mittels ImageJ (s.u.) herangezogen. Zur Zusammenstellung der Abbildungen dieser Arbeit wurden weitere Fotografien der HE-gefärbten Schnitte an einem zweiten Lichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena) mit der Software CellSens Standard 1.8.1 (Olympus corporation, Hamburg, Deutschland) mit den Objektiven 10x, 20x und 40x angefertigt. Das Lichtmikroskop war mit einer Kamera (Color view II, Olympus corporation, Hamburg, Deutschland) und Objektiven (Plan-Neofluar 5x/0,15, Plan-Neofluar 10x/0,30, Plan-Neofluar 20x/0,50, Plan-Neofluar 40x/0,75, Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil, Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgestattet.

Die zur Auswertung herangezogenen Abbildungen wurden mit den Objektiven 20x und 40x aufgenommen und im JPEG Format gespeichert. Die Helligkeit und der Kontrast der Fotografien wurden über die gesamte Bildfläche mittels Photoshop angepasst. Die Auswertung der HE-Färbungen erfolgte wie folgt: Mit Hilfe des ImageJ Programmes (Schneider et al. 2012) wurde zunächst die Fläche des N. opticus-Anschnittes berechnet und anschließend jeder Zellkern im Anschnitt des N. opticus gezählt. So wurde die Anzahl der Kerne pro Fläche (Kernzahl/mm²) im Anschnitt des N. opticus berechnet.

Die Fotografien der LFB-gefärbten Schnitte sowohl für die Abbildungen als auch für die Auswertungen wurden am Lichtmikroskop (Leica DM 2.500) mit den Objektiven 20x und 40x angefertigt. Das Lichtmikroskop war mit einer Kamera (Leica DFC 290 HD, Leica) und der Leica Application Software (LAS V4.2.0) sowie fünf Objektiven (1.25x/0.04 5x PH0; 10x/0.25 PH1; 20x/0.040 PH1; 40x/0.65 PH2; 100x/1.25 Oil PH3) ausgestattet (Leica, Wetzlar, Deutschland). Die zur Auswertung herangezogenen Bilder wurden im JPEG Format gespeichert. Die Helligkeit und der Kontrast der Fotografien wurden über die gesamte Bildfläche mittels Photoshop angepasst.

Bei der LFB-Färbung konnte über ImageJ kein quantitativer Nachweis erfolgen aufgrund der schwachen Intensitätsdifferenz. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung. Dazu wurde zum einen das Ausmaß der Demyelinisierung herangezogen. Das Myelin war türkis gefärbt. Die Demyelinisierung zeigte sich in der Abnahme der Türkisfärbung. Das Ausmaß der Demyelinisierung wurde in vier Grade eingeteilt:

Grad 0 keine Demyelinisierung

Grad 1 geringe Demyelinisierung von ca. <30% der Fläche

Grad 2 Demyelinisierung von ca. 30-50% der Fläche

Grad 3 Demyelinisierung von >50% der Fläche

Zudem wurde die Verteilung der Zellkerne als Indikator für eine Inflammation betrachtet. Die Verteilung der Zellkerne wurde ebenfalls in vier Grade eingeteilt:

Grad 0 normale Zellkernverteilung

Grad 1 vereinzelte Stellen mit vermehrter Zellkernansammlung (Infiltrationsherde:
Zunahme von Zellkernen an einer Stelle; Zunahme der Anzahl der Kerne im
gesamten Querschnitt des N. opticus)

Grad 2 ca. 50% der Fläche weist vermehrt Zellkerne auf

Grad 3 >50% der Fläche weist vermehrt Zellkerne auf

2.10 Immunfluoreszenz-Färbungen

Die Immunfluoreszenz-Färbung dient dem Nachweis spezifischer Antigene im Gewebe. Bei der hier durchgeführten indirekten Färbung ist der Primärantikörper gegen das Antigen gerichtet, welches man nachweisen will. Der Sekundärantikörper ist fluoreszenzmarkiert und bindet an den Primärantikörper. Die Kryoschnitte wurden für 20 min in -20°C kaltem Ethanol (100%) fixiert (CD3, Cx43) bzw. für 10 min in -20°C kaltem Aceton (100%) (Cx29, Cx30, Cx47). Danach wurden die EtOH-fixierten Schnitte 3-mal 10 min in 1xPBS gewaschen. Die Aceton-fixierten Schnitte wurden 2-mal 10 min in PBS und dann noch einmal in PBS + 0,005% Tween 20 gewaschen; Ausnahme ist die Cx47-Immunfluoreszenz-Färbung, welche 3-mal 10 min in 1x PBS gewaschen wurde.

Die weiteren Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Schnitte wurden für 1 h mit der NGS-Blockierungslösung inkubiert, um freie Bindungsstellen zu besetzen. Anschließend wurden sie mit dem für die jeweilige Färbung spezifischen Primärantikörper bei +4°C für 16 h inkubiert. Bei jeder Färbung wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle der CD3-Immunfluoreszenz wurde die Immunfluoreszenz an Milzgewebe durchgeführt; als Positivkontrolle für Connexin-Antikörper wurde die Immunfluoreszenz an Gehirn (Cx43, Cx29, Cx30) bzw. Rückenmark (Cx47) durchgeführt. In der Negativkontrolle wurden die Schnitte statt mit Primärantikörper-Lösung mit der NSG-Blockierungslösung inkubiert.

Dann wurden die EtOH-fixierten Schnitte 3-mal 10 min in 1xPBS gewaschen, danach für 30 min mit der BSA-Blockierungslösung inkubiert. Die Aceton-fixierten Schnitte wurden zuerst 2-mal 10 min in PBS und dann in PBS + 0,005% Tween 20 gewaschen, mit Ausnahme der Cx47-Immunfluoreszenz, welche 3-mal 10 min in 1x PBS gewaschen und dann für 30 min mit der BSA-Blockierungslösung inkubiert wurde. Anschließend wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde, bzw. bei der Cx47-Immunfluoreszenz für 45 min, bei 18°C inkubiert. Die Schnitte wurden abschließend 2-mal 10 min in 1x PBS gewaschen und anschließend mit DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech) eingedeckt.

2.10.1 Immunfluoreszenz-Färbung CD3-positiver T-Zellen

Als Primärantikörper wurde bei der CD3-Färbung der Ratte-anti-Maus CD3-Antikörper (R&D Systems) in einer Verdünnung von 1:3.000 in NGS-Blockierungslösung benutzt.

Als Sekundärantikörper wurde der Alexa Fluor 594-konjugierte Ziege-anti-Ratte Antikörper (Thermo Scientific) in einer Verdünnung von 1:3.000 in BSA-Blockierungslösung verwendet.

2.10.2 Immunfluoreszenz-Färbung des Cx43 Proteins

Als Primärantikörper wurde der Kaninchen-anti-Connexin 43-Antikörper (Invitrogen) benutzt und in einer Verdünnung von 1:800 in NGS-Blockierungslösung eingesetzt.

Als Sekundärantikörper wurde der Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen (Invitrogen) verwendet (Verdünnung 1:4.000 in BSA-Blockierungslösung).

2.10.3 Immunfluoreszenz-Färbung des Cx29 Proteins

Als Primärantikörper wurde der Kaninchen-anti-Connexin 29-Antikörper (Invitrogen, in einer Verdünnung von 1:100 in NGS-Blockierungslösung) benutzt.

Als Sekundärantikörper wurde der Alexa Fluor 568 Ziege-anti-Kaninchen (Invitrogen) verwendet (Verdünnung von 1:3.000 in BSA-Blockierungslösung).

2.10.4 Immunfluoreszenz-Färbung des Cx30 Proteins

Als Primärantikörper wurde der Kaninchen-anti-Connexin 30-Antikörper (Zymed Laboratories; jetzt Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:100 in NGS-Blockierungslösung benutzt.

Als Sekundärantikörper wurde der Alexa Fluor 568 Ziege-anti-Kaninchen (Invitrogen) verwendet in einer Verdünnung von 1:3.000 in BSA-Blockierungslösung.

2.10.5 Immunfluoreszenz-Färbung des Cx47 Proteins

Als Primärantikörper wurde der Kaninchen-anti-Connexin 47-Antikörper (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:100 in NGS-Blockierungslösung benutzt.

Als Sekundärantikörper wurde der Alexa Fluor 568 Ziege-anti-Kaninchen (Invitrogen) benutzt in einer Verdünnung von 1:3.000 in BSA-Blockierungslösung.

2.11 Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen

Die Bilder der Immunfluoreszenz-Färbungen wurden am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Observer.Z1; PC Programm: AxioVision Rel.4.8, Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit den Objektiven 20x und 40x gemacht. In der Übersicht (20x) konnten die ganzen Nn. optici abgebildet werden. In der Vergrößerung (40x) wurden periphere und zentrale Abschnitte der Nn. optici fotografiert. Das Fluoreszenzmikroskop ist mit einer Digitalkamera (AxioCam MRm, Zeiss), einer Halogenlampe (HXP 120 C, Zeiss), einem Filterset (43 HE für rot (Anregungswellenlänge 550 nm), 38 HE für grün (Anregungswellenlänge 470 nm) und 49 für blau (Anregungswellenlänge 365 nm) sowie den Objektiven EC Plan-Neofluar 10x, Plan Apochromat 20x und Plan-APO 40x/1,3 Oil ausgestattet. Zur Auswertung der Immunfluoreszenz wurden die Bilder mit dem Objektiv 40x herangezogen. Zunächst erfolgte die Bildbearbeitung mit der Anpassung des Kontrastes über das gesamte Bild mit dem Programm GIMP. Die Bilder wurden dann mit dem ImageJ Programm (Schneider et al. 2012) ausgewertet. Das Programm berechnete den prozentualen Anteil der immunpositiven Fläche an der zuvor umfahrenen Fläche des N. opticus. Dazu wurde das Foto zunächst in ein 8 bit Bild umgewandelt. Anschließend wurde ein Schwellenwert festgelegt, der für alle Bilder gleich blieb. Der Schwellenwert betrug bei CD3 36 von 255, bei Cx43 35 von 255, bei Cx29 60 von 255, bei Cx30 63 von 255 und Cx47 44 von 255. Das vorher farbige Signal wurde nun schwarz dargestellt, die Umgebung wurde weiß dargestellt. Nach Umrandung der Fläche des Nervenanschnittes wurde der prozentuale Anteil der Fläche des Signales (schwarz) zur Gesamtfläche des Nervenanschnittes (weiß) berechnet. Dieselben Bearbeitungsschritte erfolgten für alle Immunfluoreszenzen.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden die gefrorenen N. optici auf Eis aufgetaut. Die weiteren Schritte der RNA-Isolierung erfolgten mit den Reagenzien des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des RNeasy Lipid Tissue Handbuches. Zur Lyse des Gewebes gab man zunächst 200 µl QIAzol Lyse Reagenz zum Gewebe und anschließend wurde das Gewebe mit einem Dispergiergerät zerkleinert. Dann wurden nochmals 800 µl QIAzol Lyse Reagenz dazugegeben und das Gemisch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 200 µl Chloroform dazugegeben und die Mischung 15 s kräftig geschüttelt. Nun wurde die Probe bei 12.000-facher Erdbeschleunigung (g) für 15 min zentrifugiert (Fresco 21 Zentrifuge, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland). Es wurde mit dem klaren Überstand, welcher die RNA enthält, weitergearbeitet. Dieser Überstand wurde vorsichtig in ein neues

Eppendorfgesäß überführt und es wurden 600 µl des 70%igen Ethanol dazugegeben. Dieses Gemisch wurde nun auf eine Säule (RNeasy Mini Spin Column, Qiagen) gegeben. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8.000xg für 15 s an. Der Durchfluss wurde verworfen.

Um eine eventuelle Verunreinigung mit endogener Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu vermeiden, wurde ein Desoxyribonuklease (DNase) Verdau durchgeführt mit den Reagenzien des RNase-Free DNase Set (Qiagen). Dazu gab man zunächst 350 µl "RW1 buffer" auf die Säule. Es schloß sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8.000xg für 15 s an. Der Durchfluss wurde verworfen. Die weiteren Schritte erfolgten mit den Reagenzien des RNase Free DNase Set. Nun wurden 80 µl des Mastermix, welcher sich aus 10 µl DNase I Stock Lösung und 70 µl "RDD buffer" zusammensetzt, auf die Säule gegeben. Es schloß sich wieder ein Zentrifugationsschritt an bei 8.000xg für 15 min. Als letzten Schritt des DNase Verdaus wurden 350 µl "RW1 buffer" auf die Säule pipettiert und anschließend bei 8.000xg für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Nun schlossen sich zwei Waschschrte an. Es kamen jeweils 500 µl "RPE buffer" dazu mit anschließender Zentrifugation: Nach dem ersten Waschen bei 8.000xg für 15 s, nach dem zweiten Waschen bei 8.000xg für 2 min. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Die Säule wurde nun in ein frisches 2 ml Mikroreaktionsgefäß gestellt und nochmals bei 1.200xg für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Zum Eluieren wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gestellt und es wurden 30 µl Ribonuklease (RNase)-freies Wasser dazugegeben. Das Ganze wurde wieder bei 8.000xg für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun die gewünschte RNA. Diese wurde zur Aufkonzentrierung erneut auf eine Säule gegeben und nochmals bei 8.000xg für 1 min zentrifugiert. Nun wurde die RNA-Konzentration im Eluat mit einem Photometer (Bio Photometer; Eppendorf) bestimmt. Es erfolgte die Adsorptionsmessung bei Wellenlängen von 260 nm, 230 nm und 280 nm. Zur Bestimmung der Reinheit der Proben wurden zudem die Adsorptionsquotienten $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ errechnet. Die Proben sollten für beide Quotienten einen Wert >2.0 haben, der eine optimale Reinheit indiziert. Die RNA wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.12.2 Reverse Transkription

Die RNA wurde nun mithilfe der reversen Transkription in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Es wurden jeweils 0,2 µg RNA umgeschrieben. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Protokoll "First Strand cDNA Synthesis (Standard Protocol)" (NEB #M0253) von New England BioLabs: 0,2 µg RNA wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser auf ein Ausgangsvolumen von 13 µl eingestellt.

Die Negativkontrolle ohne Template diente dem Ausschluss von verunreinigender RNA bzw. DNA im DEPC Wasser sowie den Enzymen. Die Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase diente dem Ausschluss von endogener DNA im Template. Bei der Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase

wurde der Mastermix durch DEPC Wasser ersetzt und bei der Negativkontrolle ohne Template wurde die RNA mit DEPC Wasser ersetzt.

Dann wurden 2 µl Oligo (dt)₁₈ Primer (Thermo Scientific) und 1 µl dNTP-Mix 10 mM (Thermo Scientific) zu jeder Probe dazugegeben. Das Gemisch wurde im Thermocycler bei 65°C für 5 min inkubiert. Als nächstes wurden 2 µl RT Puffer (New England BioLabs), 1 µl RNase Inhibitor (Thermo Scientific) sowie 1 µl Mastermix M-Mulv Reverse Transkriptase (New England BioLabs) dazugegeben.

Die Umschreibung der RNA erfolgte bei 42°C für eine Stunde im Thermocycler. Darauf folgte eine abschließende Denaturierungsphase der reversen Transkriptase bei 90°C für 10 min. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.12.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die eigentliche Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels der qRT-PCR. Bei der relativen Quantifizierung wurde die Expression des zu bestimmenden Zielgens auf ein weiteres ubiquitär vorkommendes Gen, das sogenannte „Housekeeping-Gen“ bezogen. In dieser Arbeit wurde als „Housekeeping-Gen“ die ribosomale 18S RNA verwendet. Die Zielgene waren Cx29, Cx30, Cx43 und Cx47.

Die cDNA wurde im Verhältnis 1:2 mit DEPC-Wasser verdünnt. Zu 2,5 µl verdünnter cDNA wurde 17,5 µl eines Reaktionsansatzes pipettiert. Dieser Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 10µl Takyon Mastermix (Takyon Rox SYBER MasterMix dTTP Blue, Eurogentec), 0,6 µl eines 10 µM Primer forward, 0,6 µl eines 10 µM Primer reverse und 6,3 µl H₂O DEPC. Die Sequenzen der Primer sowie die resultierenden Größen der Amplifikationsprodukte sind in der obigen Tabelle (Kapitel 2.1.5) aufgeführt. Der Takyon Mastermix enthielt SYBR Green, welches in doppelsträngige DNA interkaliert und fluoresziert. Zu den Zielgenen wurde noch ein Housekeeping Gen amplifiziert. Die Temperaturkurve sah wie folgt aus: 3 min bei ca. 95°C (Aktivierungsphase), anschließend 40 Zyklen, wobei ein Zyklus aus 10 s 95°C (Denaturierung) und 1 min 60°C (Annealing/Extension) bestand. Nach Ablauf aller Zyklen wurden die Schmelzkurven der Produkte nach folgendem Protokoll bestimmt: 15 s 95°C (Denaturierung), 1 min 60°C (Annealing) und 15 sec 95°C. Das Fluoreszenzsignal wurde während der gesamten Zeit vom Photometer (Step One Plus Real-Time System, Applied Biosystems) gemessen. Von jedem Tier wurden pro Primer drei Ansätze, sogenannte Triplets, durchgeführt. Aus den Triplets wurde dann der Mittelwert gebildet.

2.13 Auswertung der qRT-PCR

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mittels einer relativen Quantifizierung. Hierbei erfolgte eine Normalisierung der Expression gegen ein Houskeeping-Gen, welches in dieser Arbeit das 18S rRNA Gen war. Anschließend erfolgte die Berechnung mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode (Pfaffl 2001). Zielgen waren die jeweils zu untersuchenden Connexine. Zur Auswertung wurde das Programm StepOne (StepOne Software v2.3, Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) genutzt.

Znächst wurde die Differenz der Ct Werte von Zielgen und Houskeeping Gen ermittelt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Houskeeping-Gen}$$

Es sollte ermittelt werden, ob es eine Veränderung der Connexin-Expression in den erkrankten Tieren gibt. Als Kontrolle diente die RNA von *Nn. optici* gesunder Kontrolltiere. Nun wurde die Differenz der ΔCt Werte zwischen EAE-Tieren und Kontrolltieren gebildet:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{Ct EAE-Tiere} - \Delta\text{Ct Kontrolltiere}$$

Die Pfaffl Formel besagt:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \text{ (Pfaffl 2001)}.$$

Für die Gruppe mit den Kontrolltieren ergab sich somit $\Delta\Delta\text{CT}_{\text{Kontrolle}} = \Delta\text{Ct Kontrolltiere} - \Delta\text{Ct Kontrolltiere} = 0$. Die Ratio für die Kontrolltiere ist somit 2^{-0} und ergibt einen Wert von 1. Die Expression wurde jeweils in drei EAE Tieren (zwei Tiere mit Score 2 und ein Tier mit Score 1,5) und drei Kontrolltieren untersucht.

2.14 Statistik

Die statistische Auswertung der histologischen und immunhistologischen Daten sowie der Ergebnisse der qRT-PCR erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism (Version 5.02, GraphPad Software Inc., La Jolla CA, USA). Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (standard error of the mean; SEM) in einem Säulendiagramm dargestellt. Zunächst erfolgte die Prüfung der Werte auf Normalverteilung mit Hilfe des d'Agostino-Pearson Omnibus-Test. Es zeigten sich ausschließlich nicht-normalverteilte Daten. Daher wurden nur nicht-parametrische Tests für die weitere Auswertung genutzt. Bei den Proben mit vier Gruppen (Kontrollgruppe, Scoregruppe 1, Scoregruppe 2 und Scoregruppe 3) wurde der Kruskal-Wallis Test angewendet. Für den Vergleich der einzelnen Gruppen

untereinander wurde nach dem Kruskal-Wallis Test der Dunn's Multiple Comparison Test durchgeführt. Bei den Proben mit zwei Gruppen (Kontrollgruppe und Mittelwert der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3)) wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Für die Signifikanz wurde folgende Einteilung genutzt: $p \geq 0,5$ nicht signifikant; * $0,01 \leq p < 0,05$ signifikant; ** $0,001 \leq p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ sehr hoch signifikant.

3 Ergebnisse

Bei der MS ist der N. opticus eines der ersten betroffenen Gewebe und zeigt häufig eine Neuritis (Danesh-Sani et al. 2013, Marques et al. 2014, Stadelmann et al. 2011). Generell sind die typischen Merkmale der MS Inflammation, Demyelinisierung und Axonschädigung und diese Symptome werden auch im N. opticus beobachtet (Milo and Miller 2014, Stadelmann et al. 2011). Connexine sind Gap Junction-Proteine, die in allen neuronalen Zellen vorkommen und z.B. im Zuge von Inflammation Veränderungen ihrer Expression aufweisen (Brand-Schieber et al. 2005, Roscoe et al. 2007a). In dieser Arbeit wurde experimentell untersucht, ob sich die Expression von Connexinen im N. opticus im Tiermodell der EAE im Vergleich zu Kontrolltieren verändert.

Untersucht wurden die Nn. optici von 12 Tieren, denen mittels Injektion von MOG-Peptid eine EAE induziert worden war. Die klinischen Symptome der EAE wurden anhand eines Scoresystems (siehe Kapitel 2.4) bestimmt. Bei Erreichen des jeweiligen Scorewertes erfolgte nach Tötung der Tiere (Tag 2 bis 23 nach Erkrankungsbeginn) die Organentnahme: Die Nn. optici wurden präpariert und für histologische bzw. molekularbiologische Analysen aufgearbeitet. Zur Analyse wurden die Tiere in sogenannte Scoregruppen zusammengefasst. Sowohl bei den histologischen Färbungen als auch bei den Immunfluoreszenz-Färbungen betrug die Anzahl der Tiere in jeder der drei Scoregruppen sowie in der Kontrollgruppe $n = 3$. Mäuse mit den Scores 0,5 und 1 bildeten die Scoregruppe 1; Mäuse mit den Scores 1,5 und 2 wurden zu der Scoregruppe 2 zusammengefasst und die Scores 2,5 und 3 bildeten die Scoregruppe 3.

In einem ersten Schritt wurden die histologischen Färbungen HE und LFB an Kryoschnitten der Nn. optici von Kontrolltieren und EAE-Tieren angefertigt. Anhand dieser Färbungen konnte gezeigt werden, dass Läsionsstellen im entsprechenden Abschnitt des N. opticus vorlagen. Anschließend folgten die Untersuchungen zur Expression glialer und neuronaler Connexine, einerseits auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR und andererseits auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz-Färbungen.

Alle Färbungen wurden fotografisch dokumentiert und alle Fotos wurden in die Auswertung einbezogen. Bei den Abbildungen wurden exemplarisch ein repräsentatives Foto von einem Tier aus jeder Scoregruppe und eines von einem Kontrolltier ausgesucht. Im ersten Schritt wurde der Mittelwert aller EAE-Tiere (alle Scoregruppen) mit dem der Kontrolltiere verglichen. Im nächsten Schritt wurden die Werte der drei Scoregruppen jeweils einzeln betrachtet, um Veränderungen in Abhängigkeit eines zunehmendem Scores und somit zunehmender Erkrankung zu detektieren. Bei der qRT-PCR wurde die Connexin-Expression in EAE-induzierten Tiere der Scoregruppe 2 ($n = 3$) mit der von Kontrolltieren ($n = 3$) verglichen.

3.1 HE-Färbung

Zur Übersicht der Morphologie der Nn. optici wurden HE-Färbungen angefertigt (Abbildung 1 und 2). Das Zytoplasma erscheint bei dieser Färbung rosé-rot, während sich die Zellkerne blau-violett färben.

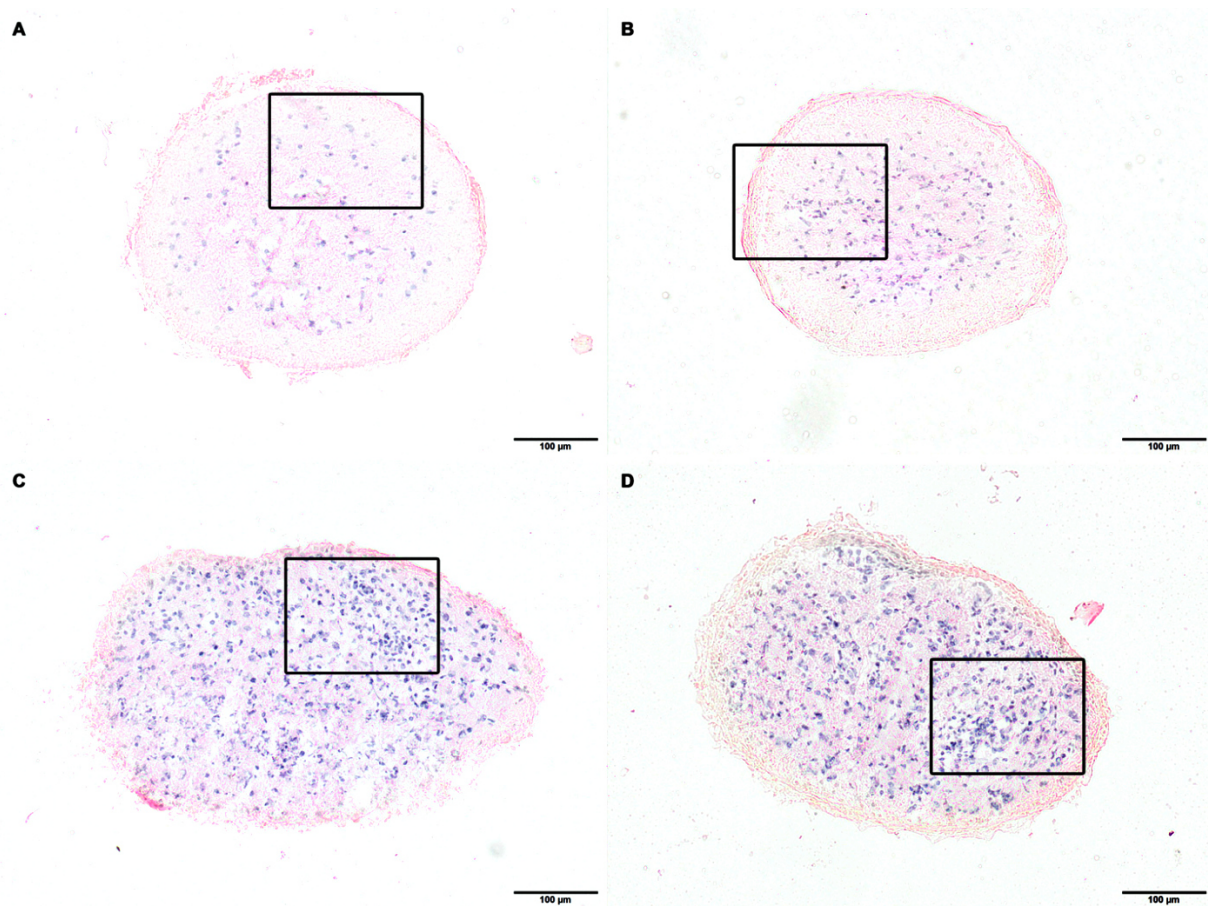


Abbildung 1: Histologische HE-Färbung des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden exemplarisch HE-gefärbte Kryoschnitte (Querschnitte) des N. opticus von (A) Kontrolltieren, (B) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (C) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Kästchen zeigen die Lokalisation der Ausschnittsvergrößerungen in Abbildung 2. Der Maßstab entspricht 100 µm.

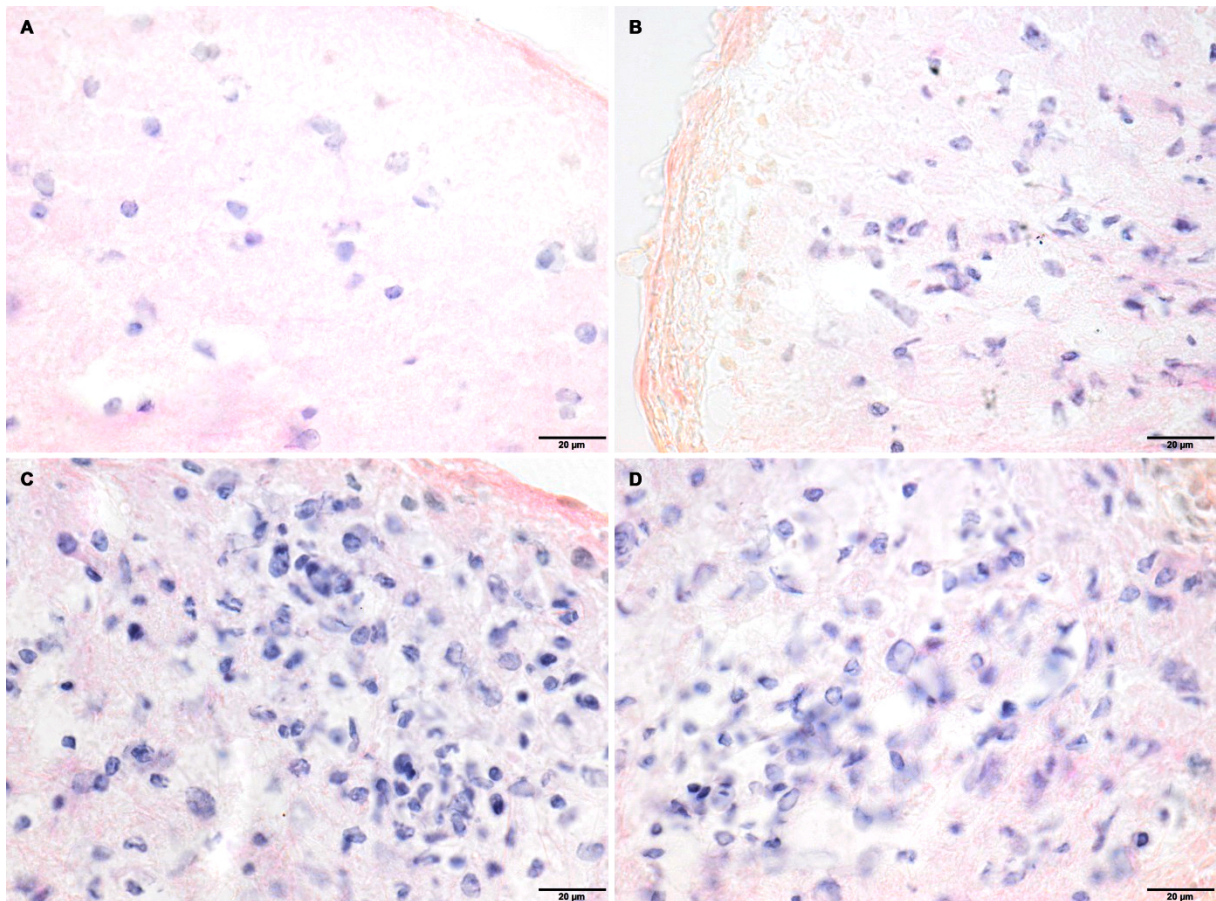


Abbildung 2: Ausschnittsvergrößerungen der histologischen HE-Färbung des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Ausschnittsvergrößerungen der Querschnitte des N. opticus aus Abbildung 1. HE-gefärbte Kryoschnitte des N. opticus von (A) Kontrolltieren, (B) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (C) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 3, jeweils aus dem Randbereich der Nn. optici. Der Maßstab entspricht 20 µm.

In der HE-Färbung fiel eine Zunahme der Zellkerne (blau-violett) bei den EAE-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren auf. Um dies zu verifizieren, erfolgte die Auszählung der Zellkerne und die Berechnung der Anzahl der Zellkerne pro Fläche. Zur Dokumentation in den Abbildungen wurde jeweils ein repräsentatives Bild aus jeder Scoregruppe ausgesucht. Für die anschließende Auswertung wurden mehrere Bilder von den drei Nervenanschnitten jedes Tieres aus jeder Scoregruppe herangezogen, sodass der gesamte Anschnitt des Nerven zusammengesetzt werden konnte.

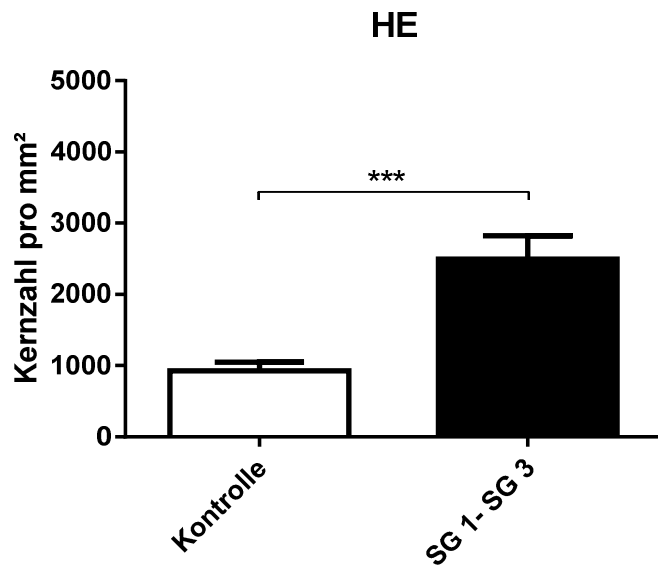


Abbildung 3: Die Anzahl der Zellkerne pro 1 mm² im N. opticus der Kontrollgruppe (Kontrolle) und bei den EAE-induzierten Tieren. Die Auszählung erfolgte in der HE-Färbung. Bei den EAE-induzierten Tieren wurde der Mittelwert der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) gebildet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt (***p* < 0,001).

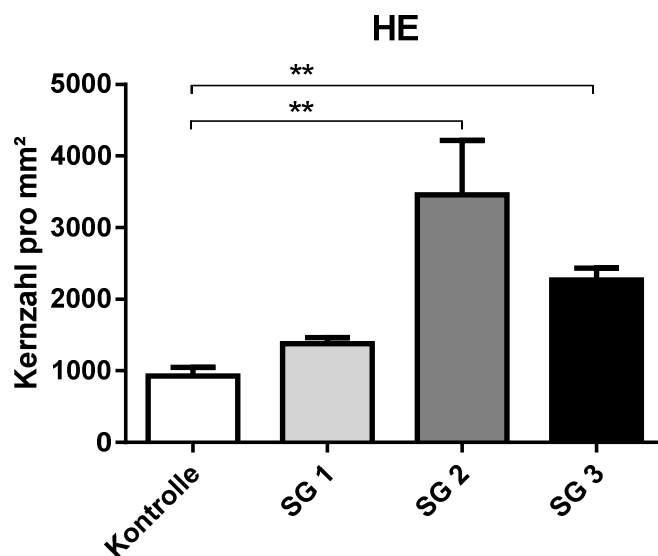


Abbildung 4: Die Anzahl der Zellkerne pro 1 mm² im N. opticus in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und bei den EAE-induzierten Tieren der drei Scoregruppen. Die Auszählung erfolgte in der HE-Färbung. Scoregruppe 1 (SG 1), Scoregruppe 2 (SG 2) und Scoregruppe 3 (SG 3) der EAE-Mäuse wurden getrennt betrachtet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt (***p* < 0,01).

Ergebnisse

In der HE-Färbung konnte mit zunehmendem Krankheitsscore ein Anstieg der Anzahl der Zellkerne pro 1 mm² beobachtet werden. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich von Tieren der Kontrollgruppe mit kranken Tieren (SG 1- SG 3) (Abbildung 3). Wenn man die Scoregruppen getrennt voneinander betrachtete, zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Scoregruppe 2 sowie der Kontrollgruppe mit der Scoregruppe 3 (Abbildung 4).

Nach der HE-Übersichtsfärbung wurde untersucht, ob in den Nn. optici eine Demyelinisierung, einer der Pathomechanismen der EAE (Constantinescu et al. 2011), zu detektieren war.

3.2 LFB-Färbung

Die LFB-Färbung wurde zur Darstellung des Myelins angefertigt. Mit zunehmendem Krankheitsscore nahm der Myelingeht der Nn. optici ab (Abbildungen 5 und 6). Die Kerne sind bei dieser Färbung dunkelblau und das Myelin ist hellblau-türkis angefärbt.

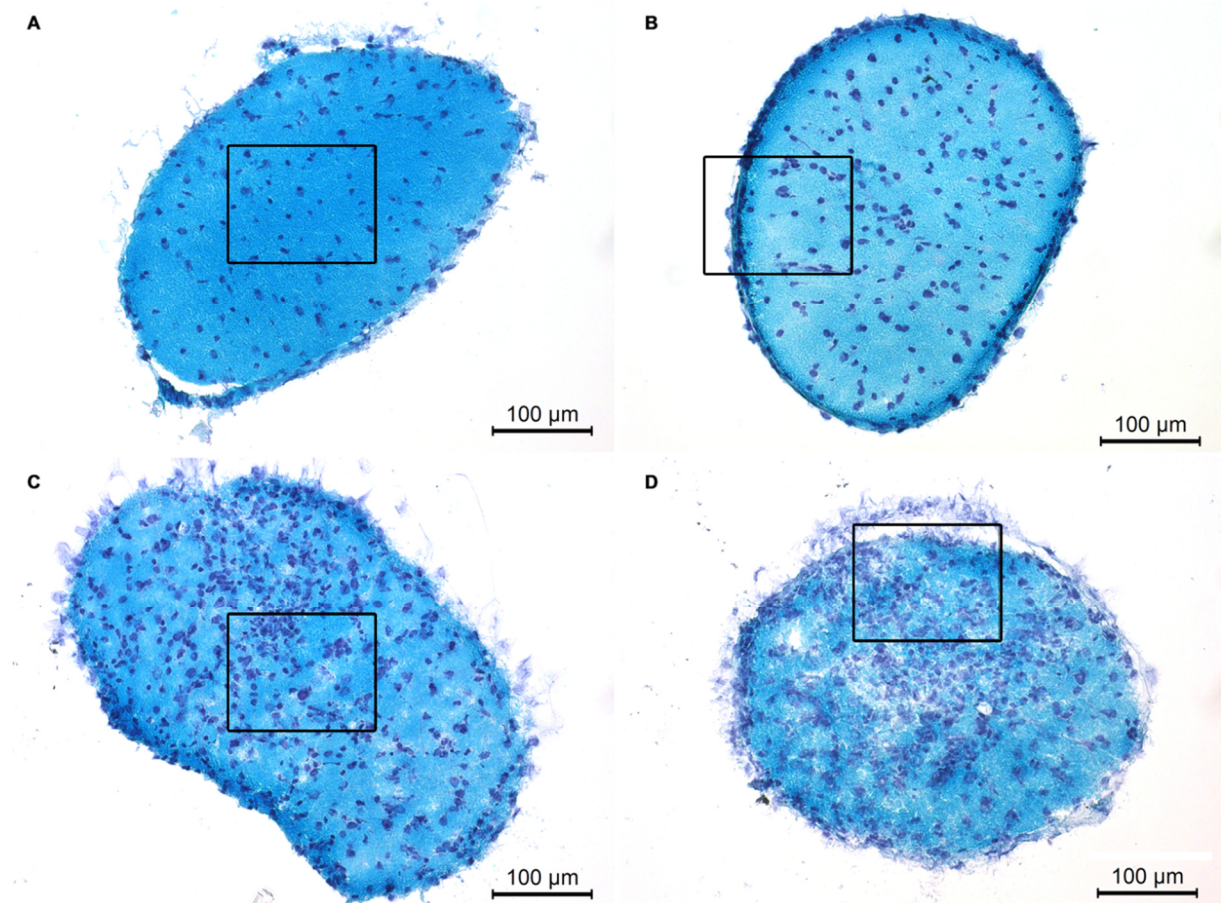


Abbildung 5: Histologische LFB-Färbung des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Querschnitte des N. opticus von (A) Kontrolltieren, (B) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (C) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Kästchen zeigen die Lokalisation der Ausschnittsvergrößerungen in Abbildung 6. Der Maßstab entspricht 100 µm.

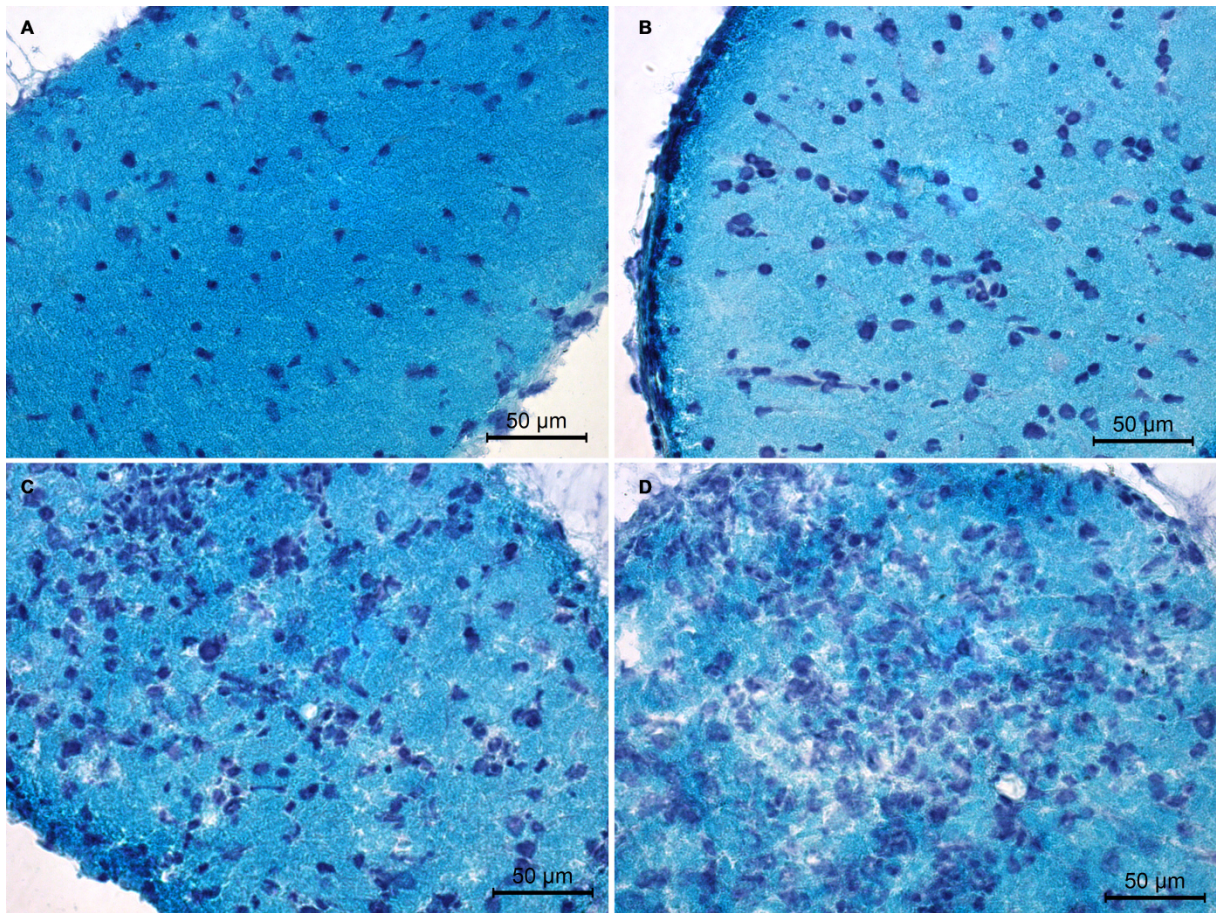


Abbildung 6: Ausschnittsvergrößerungen der histologischen LFB-Färbung des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Ausschnittsvergrößerungen der Querschnitte des N. opticus aus Abbildung 5, jeweils aus dem Randbereich der Anschnitte. LFB-gefärbte Kryoschnitte des N. opticus von (A) Kontrolltieren, (B) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (C) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Auch in der LFB-Färbung fiel, wie bei der HE-Färbung schon quantifiziert und statistisch belegt, eine Zunahme der Anzahl der Zellkerne (dunkelblau) pro Fläche mit zunehmendem Krankheitsscore auf. In der LFB-Färbung war das Myelin türkis gefärbt. Die Demyelinisierung zeigte sich entsprechend in einer Abnahme der Türkisfärbung. Weniger stark gefärbte Areale, indikativ für eine Abnahme des Myelins (türkis), waren dezent zu sehen. Allerdings konnten diese Veränderungen, also die Demyelinisierung, über ImageJ aufgrund der schwachen Intensitätsdifferenz nicht quantitativ nachgewiesen werden. Es erfolgte daher eine semiquantitative Auswertung. Dazu wurde das Ausmaß der Demyelinisierung herangezogen und in vier Grade eingeteilt. Hierzu erfolgte die Auswertung und grafische Darstellung. Zudem erfolgte die Einteilung der Verteilung der Zellkerne in vier Grade sowie anschließende Auswertung und grafische Darstellung in einem zweiten Diagramm. Für die Dokumentation in den Abbildungen 5 und 6 wurde jeweils ein repräsentatives Bild aus jeder

Scoregruppe ausgesucht. Für die Auswertung wurde jeweils ein Bild von den drei Nervenanschnitten von jedem Tiere aus jeder Scoregruppe herangezogen, also insgesamt ein Bild pro Tier.

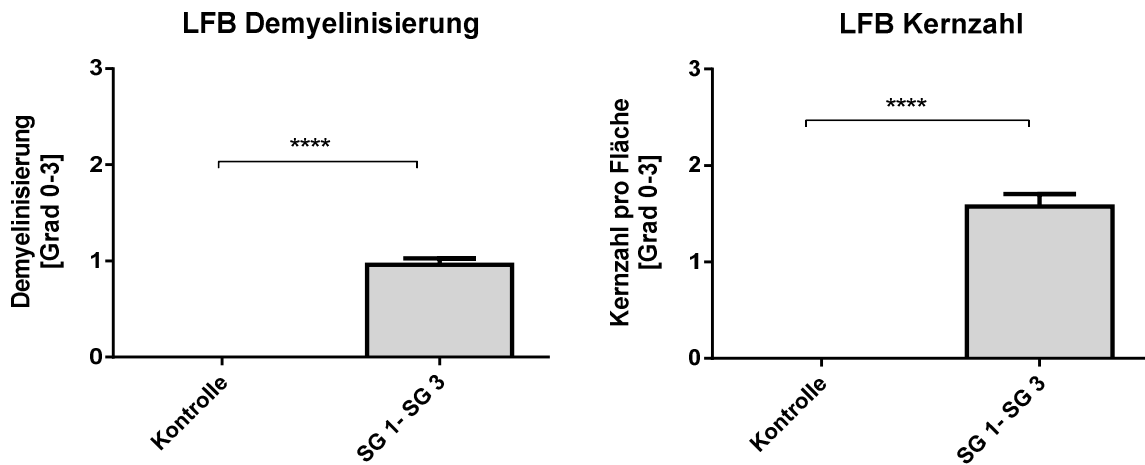


Abbildung 7: Das Ausmaß der Demyelinisierung und die Verteilung der Zellkerne im N. opticus in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und bei den EAE-induzierten Tieren der drei Scoregruppen. Die Auswertung erfolgte anhand der LFB-Färbung. Bei den EAE-induzierten Tieren wurde der Mittelwert der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) gebildet. Die Daten wurden semiquantitativ erhoben und als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt (**** p<0,0001).

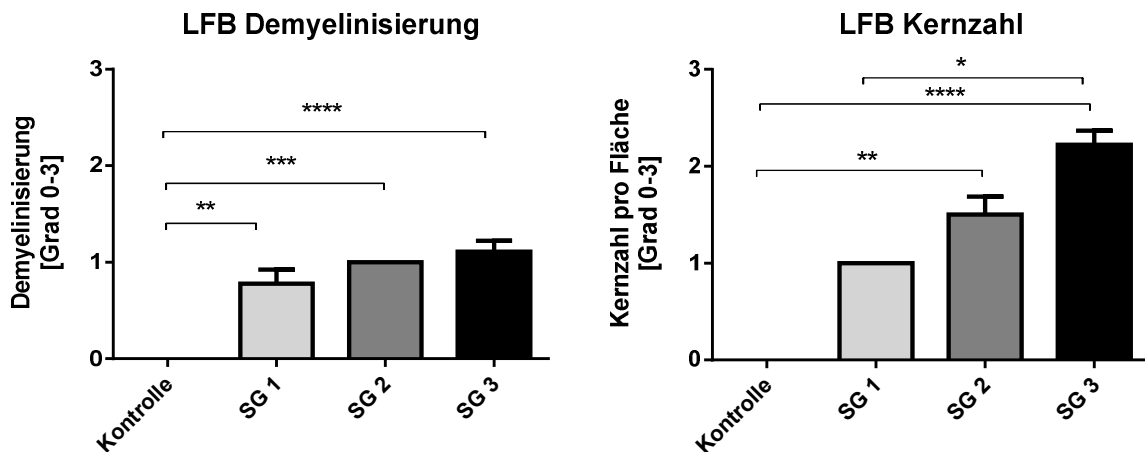


Abbildung 8: Das Ausmaß der Demyelinisierung und die Verteilung der Zellkerne im N. opticus in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und bei den EAE-induzierten Tieren der drei Scoregruppen. Die Auswertung erfolgte anhand der LFB-Färbung. Scoregruppe 1 (SG 1), Scoregruppe 2 (SG 2) und Scoregruppe 3 (SG 3) der EAE-Mäuse wurden getrennt betrachtet. Die Daten wurden semiquantitativ erhoben und als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p<0,0001).

Die LFB-Färbung zeigte mit zunehmendem Krankheitsscore sowohl eine Zunahme des Ausmaßes der Demyelinisierung als auch die in der HE-Färbung bereits nachgewiesene Zunahme der Zellkernansammlung im N. opticus. Bei der Einschätzung der Zellkernansammlungen wurden einerseits die Anzahl der Zellkerne an einer Stelle und andererseits die gesamte Anzahl der Kerne im Querschnitt des N. opticus berücksichtigt.

Die signifikante Zunahme der Demyelinisierung und die Zellansammlung im N. opticus zeigte sich im Vergleich von Tieren der Kontrollgruppe mit kranken Tieren (SG 1-SG 3) (Abbildung 7). Wenn man die Scoregruppen getrennt voneinander betrachtete, sah man einen signifikanten Unterschied beim Ausmaß der Demyelinisierung im N. opticus zwischen der Kontrollgruppe und allen drei Scoregruppen. Auch bei der Zellansammlung im N. opticus konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Scoregruppe 2, zwischen Kontrollgruppe und Scoregruppe 3 sowie zwischen Scoregruppe 1 und Scoregruppe 3 nachgewiesen werden (Abbildung 8).

Bei einigen Anschnitten des N. opticus war die meningeale Schicht zu sehen, bei anderen nicht. Die Ursache hier lag vermutlich darin, dass die Meningen sich bei der Präparation oder bei der Anfertigung der Kryoschnitte vom restlichen Nerven abgelöst hatten. Daher wurden die peripheren Areale mit den Meningen in der weiteren Auswertung separat betrachtet.

Es folgte nun die Überlegung, welcher Zellart die Kerne in diesem betroffenen Abschnitt des N. opticus zuzuordnen sind. Die Zellkerne in der Kontrollgruppe könnten die Zellkerne der Gliazellen sein. In den EAE-Tieren stieg die Anzahl der Zellkerne. Dies würde sich zum einen durch eine Zunahme der Gliazellen (Gliose) und zum anderen durch die Infiltration inflammatorischer Zellen, z. B. Lymphozyten und aktivierter Mikroglia, erklären lassen.

Die histologischen Ergebnisse zeigten, dass die Induktion der EAE Zellinfiltrationen im N. opticus zur Folge hatte. Der Nachweis der Zellidentität an der Läsionsstelle wurde durch eine Immunfluoreszenz mit CD3, einem T-Zell-Marker, erbracht.

3.3 Anti-CD3-Immunfluoreszenz

Bei der MS/EAE kommt es neben der Demyelinisierung zu einer inflammatorischen Reaktion mit Anstieg der Immunzellen und v.a. auch der T-Lymphozyten (Bhat and Steinman 2009, Greter et al. 2005). In dieser Arbeit wurden T-Lymphozyten mittels des Immunfluoreszenz-Nachweises des T-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküls CD3 detektiert (Abbildungen 9 und 10). Die Präsenz CD3-immunpositiver Zellen wurde als Indikator für eine inflammatorische Läsion gewertet.

Die Ergebnisse zum Immunfluoreszenz-Nachweis von CD3 sind wie folgt angeordnet: Die Bilder der Immunfluoreszenz-Färbung der jeweiligen Scoregruppen, der Kontrollgruppen sowie der Positiv- und Negativkontrollen werden zuerst aus dem peripheren Bereich des N. opticus und im Anschluss aus

dem zentralen Bereich des N. opticus gezeigt. Im peripheren Bereich befinden sich die Meningen. Um herauszufinden, ob die CD3-Expression sich in der Randregion des N. opticus bei zunehmender Erkrankung anders verhält als im zentralen Bereich, wurde diese Region separat betrachtet. Für die fotografische Dokumentation in den Abbildungen wurde jeweils ein repräsentatives Bild jeder Scoregruppe ausgesucht. Für die anschließende Auswertung wurde jeweils ein Bild von den drei Nervenanschnitten von jedem Tiere aus jeder Scoregruppe herangezogen.

Anschließend folgt die grafische Darstellung der Fläche des Immunsignals, hier CD3, in Prozent. In Abbildung 11 wurden die drei Scoregruppen zu einer Gruppe zusammengefasst und mit der Kontrollgruppe verglichen. Dabei wurden die zentralen Bereiche des N. opticus getrennt von den peripheren Bereichen betrachtet. In Abbildung 12 wurden die Ergebnisse der drei Scoregruppen getrennt betrachtet und sowohl untereinander als auch mit der Kontrollgruppe verglichen. Auch in dieser Auswertung wurden die zentralen und peripheren Areale des Nerven getrennt betrachtet.

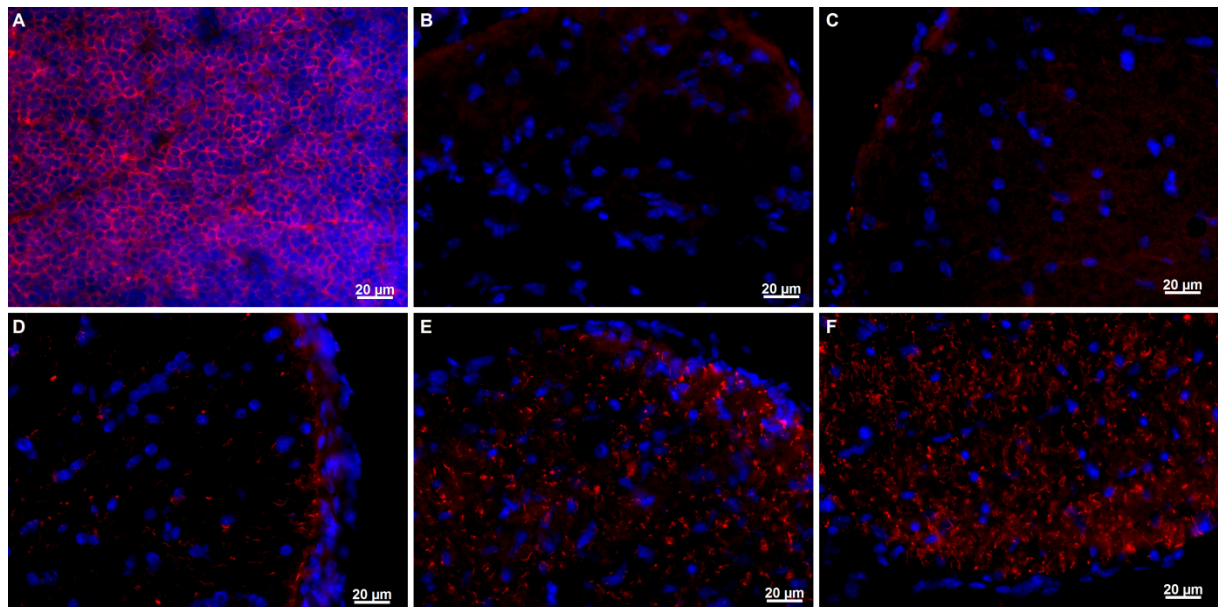


Abbildung 9: Anti-CD3-Immunfluoreszenz-Färbung in peripheren Arealen des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. CD3-Immunfluoreszenz (rot) in (A) Kryoschnitten der Milz (Positivkontrolle). (B) Querschnitte des N. opticus ohne Primärantikörper-Inkubation dienen als Negativkontrolle. CD3-Immunfluoreszenz (rot) in Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

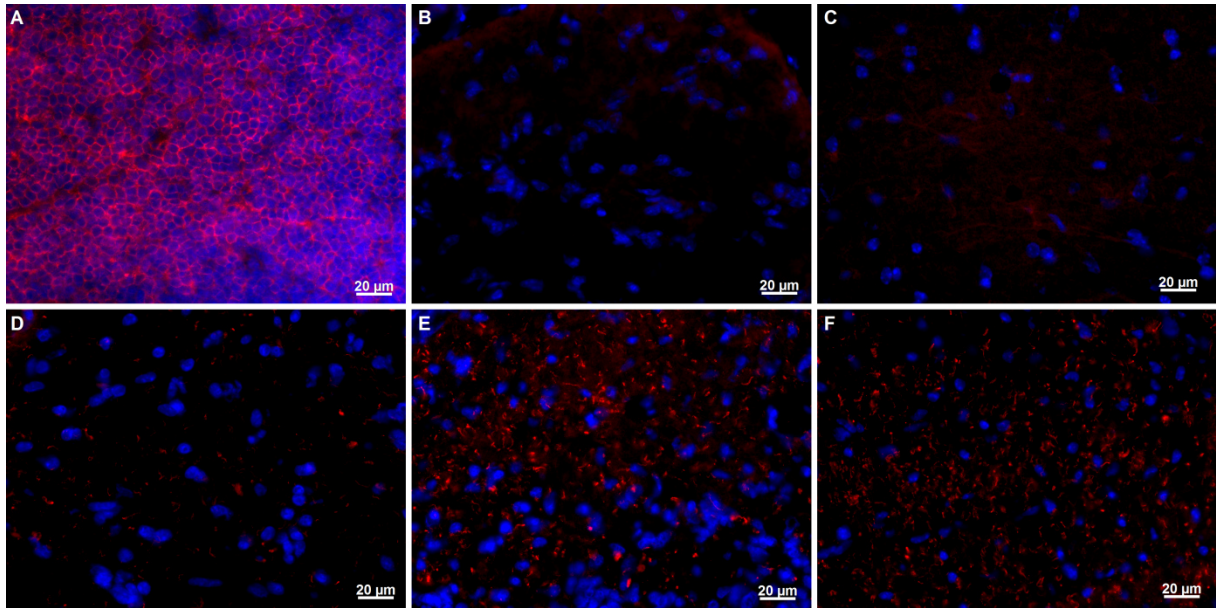


Abbildung 10: Anti-CD3-Immunfluoreszenz-Färbung in zentralen Arealen des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. CD3-Immunfluoreszenz (rot) in (A) Kryoschnitten der Milz (Positivkontrolle). (B) Querschnitte des N. opticus ohne Primärantikörper-Inkubation dienten als Negativkontrolle. CD3-Immunfluoreszenz (rot) in Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

Die CD3-Immunfluoreszenz färbte die CD3-exprimierenden T-Zellen an. In den Kontrolltieren war kein Signal für CD3 sichtbar. In allen EAE-Tieren waren hingegen CD3-immunpositive Zellen zu sehen (Abbildungen 9 und 10). Die Auswertung erfolgte über die Flächenberechnung des immunpositiven Signals an der Fläche des Anschnittes des N. opticus [mm²] mittels des Programmes Image J. Eine Zunahme der immunpositiven Zellen resultierte in einer Zunahme der Flächenwerte (%).

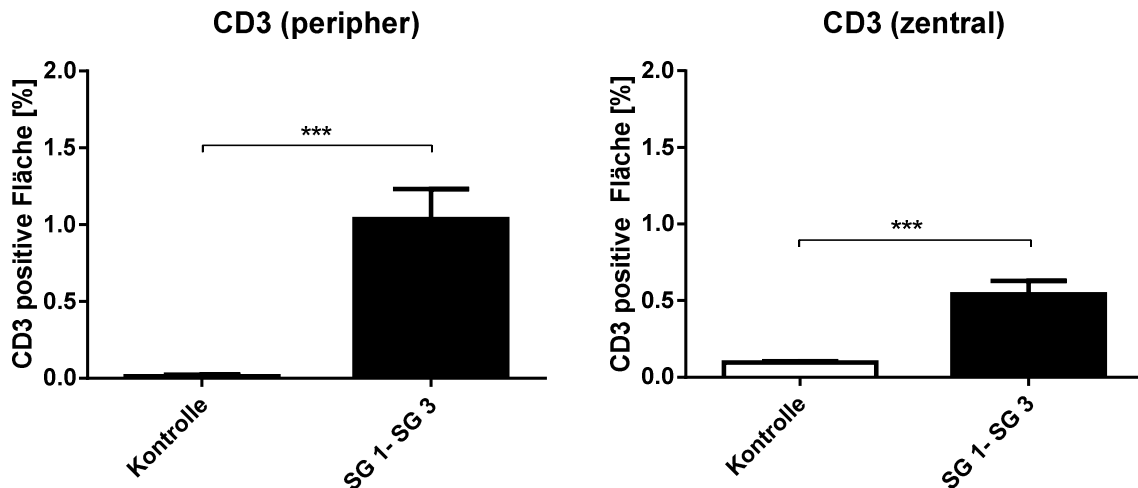


Abbildung 11: Anteil der CD3-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in den EAE-induzierten Tieren (SG 1- SG 3). Bei den EAE-induzierten Tieren wurde der Mittelwert der drei Scoregruppen gebildet. Periphere Bereiche (CD3 (peripher)) und zentrale Bereiche (CD3 (zentral)) wurden getrennt betrachtet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt (***) $p < 0,001$.

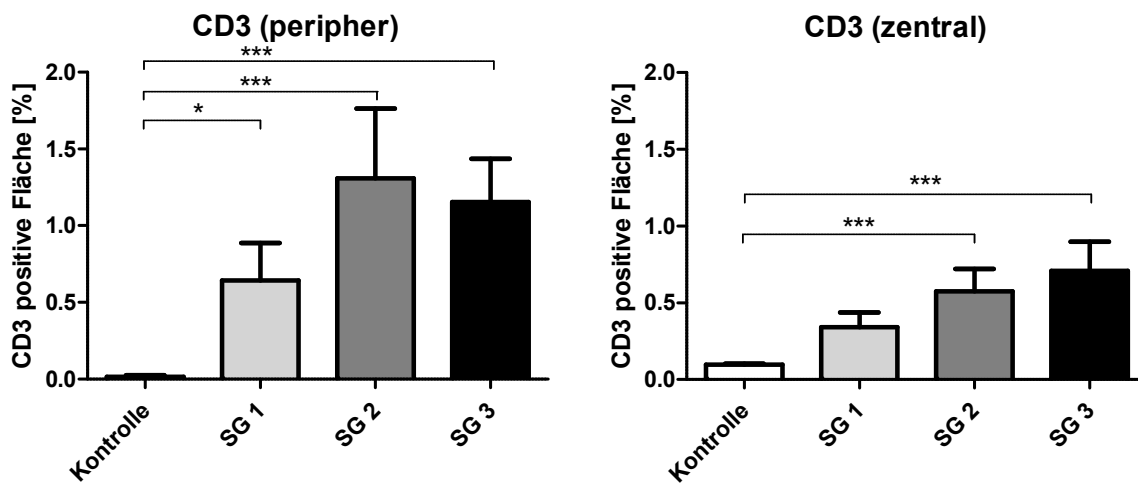


Abbildung 12: Anteil der CD3-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in den Tieren der drei EAE-Scoregruppen (SG 1- SG 3) separat betrachtet. Periphere Bereiche (CD3 (peripher)) und zentrale Bereiche (CD3 (zentral)) wurden separat ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Die EAE-Induktion führte zu einem signifikanten Anstieg der CD3-immunpositiven Fläche, also der CD3-positiven T-Zellen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Tieren der Kontrollgruppe und EAE-induzierten, kranken Tieren (SG 1- SG 3), sowohl in zentralen als auch in peripheren Arealen der Nn. optici (Abbildung 11). Bei der getrennten Betrachtung der Scoregruppen

zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Vergleich von Kontrolltieren mit EAE-Tieren. Wenn man den N. opticus in periphere und zentrale Bereich unterteilt, ergab sich für den zentralen Bereich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe gegenüber Scoregruppe 2 sowie zwischen Kontrollgruppe und Scoregruppe 3. Im peripheren Bereich zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und allen drei Scoregruppen (Abbildung 12). Dies bestätigte die Ergebnisse der histologischen Färbung (Abbildung 9 und 10). In der histologischen Färbung konnte mit zunehmendem Score eine Zunahme der Zahl der Zellkerne pro Fläche detektiert werden. In der CD3-Färbung zeigte sich eine Zunahme der CD3-immunpositiven Fläche. Der Befund, dass es in EAE-Tieren zu einer Zunahme von Zellen im N. opticus kommt, und die Vermutung, dass diese Zellen Immunzellen und vor allem T-Zellen sein könnten, wird somit gefestigt.

3.4 Connexin-Expression in Nn. optici

In den histologischen Färbungen und der CD3-Immunfluoreszenz wurde deutlich, dass in den Nn. optici der EAE-Tiere inflammatorische und demyelinisierende Läsionen vorlagen. Um die Auswirkungen der EAE auf die Expression der Connexine in den Nn. optici zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzmarkierungen (Proteinexpression und -lokalisierung) sowie qRT-PCR Analysen (mRNA-Expression) durchgeführt. Analysiert wurden astrozytäre (Cx43, Cx30, Cx26) und oligodendrozytäre (Cx32, Cx29, Cx47) Connexine sowie das neuronale Gap Junction-Protein Cx36. In den Abschnitten zu astrozytären und oligodendrozytären Connexinen sind den Immunfluoreszenz-Färbungen die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR vorangestellt. Die oligodendrozytären Connexine Cx26 und Cx32 sowie das neuronale Cx36 wurden nur auf der RNA-Ebene betrachtet.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzen sind wie folgt angeordnet:

Die Bilder der Immunfluoreszenz-Färbung der jeweiligen Scoregruppen, der Kontrollgruppen sowie der Positiv- und Negativkontrollen werden zuerst aus dem peripheren Bereich des N. opticus und im Anschluss aus dem zentralen Bereich des N. opticus gezeigt. Um herauszufinden, ob die Connexin-Expression sich in der Region der Meningen bei zunehmender Erkrankung anders verhält als im zentralen Bereich, wurden zentrale und periphere Regionen des N. opticus separat betrachtet. Für die Abbildungen wurde jeweils ein repräsentatives Bild aus jeder Scoregruppe ausgesucht. Für die anschließende Auswertung wurde jeweils ein Bild von den drei Nervenanschnitten von jedem Tier aus jeder Scoregruppe herangezogen.

Anschließend folgte die grafische Darstellung der Fläche des jeweiligen Markers in Prozent. In den ersten zwei Grafiken wurden die drei Scoregruppen zu einer Gruppe zusammengefasst und mit der Kontrollgruppe verglichen. Dabei wurden die zentralen Bereiche des N. opticus getrennt von den peripheren Bereichen betrachtet. Im peripheren Bereich befanden sich um den N. opticus die drei Hirnhäute. In den nächsten beiden Grafiken wurden die drei Scoregruppen getrennt und untereinander

und mit der Kontrollgruppe verglichen. Hier wurden auch wieder die zentralen Bereiche getrennt von den peripheren Bereichen betrachtet.

3.4.1 Expression astrozytärer Connexine in den Nn. optici von EAE-Tieren

Zu den astrozyären Connexinen zählen Cx26, Cx30 und Cx43. Zunächst wurde die Connexin-Expression mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene betrachtet. Anschließend erfolgte die Untersuchung auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz.

3.4.1.1 Cx43-mRNA-Expression

Cx43 als häufigstes astrozytäres Protein war in Zellen der Nn. optici der Kontrolltiere exprimiert. In den Nn. optici der EAE-Tiere zeigte Cx43 eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Abnahme der mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrollen (Abbildung 13).

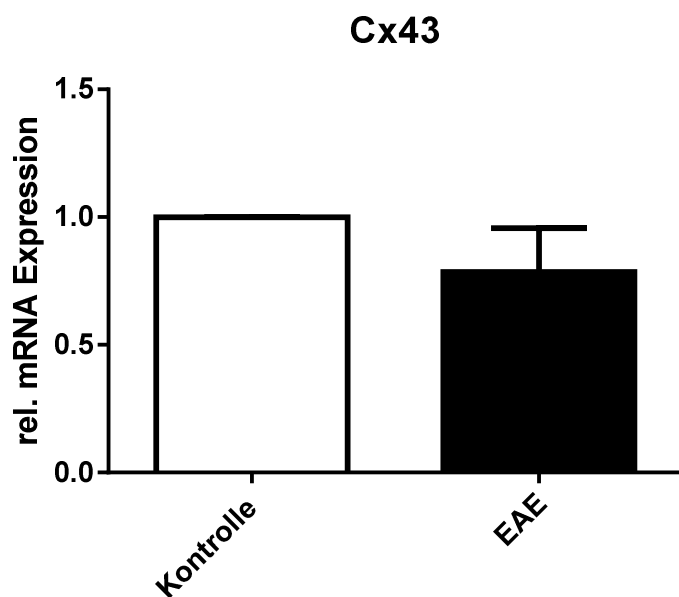


Abbildung 13: Die relative mRNA-Expression von Cx43 im N. opticus in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE). Die Daten wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Cx43-Expression der Kontrolltiere im Vergleich zu EAE-Tieren.

3.4.1.2 Cx43-Proteinexpression

Auf Proteinebene wurde die Expression des Cx43 mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Positivkontrolle, hier das Gehirn, zeigte das Astrozyten-spezifische Muster der Cx43 Immunfluoreszenz. Die Negativkontrolle ohne Primärantikörper zeigte keine Fluoreszenz bei einer Anregung im Wellenlängenbereich von 488 nm. In der Auswertung des Immunsignals der Nn. optici wurden periphere (Abbildung 14) bzw. zentrale (Abbildung 15) Anteile der Nervenquerschnitte separat ausgewertet. Das Cx43-Immunsignal war in den Nerven aller Versuchsgruppen als punktförmiges Signal zu erkennen.

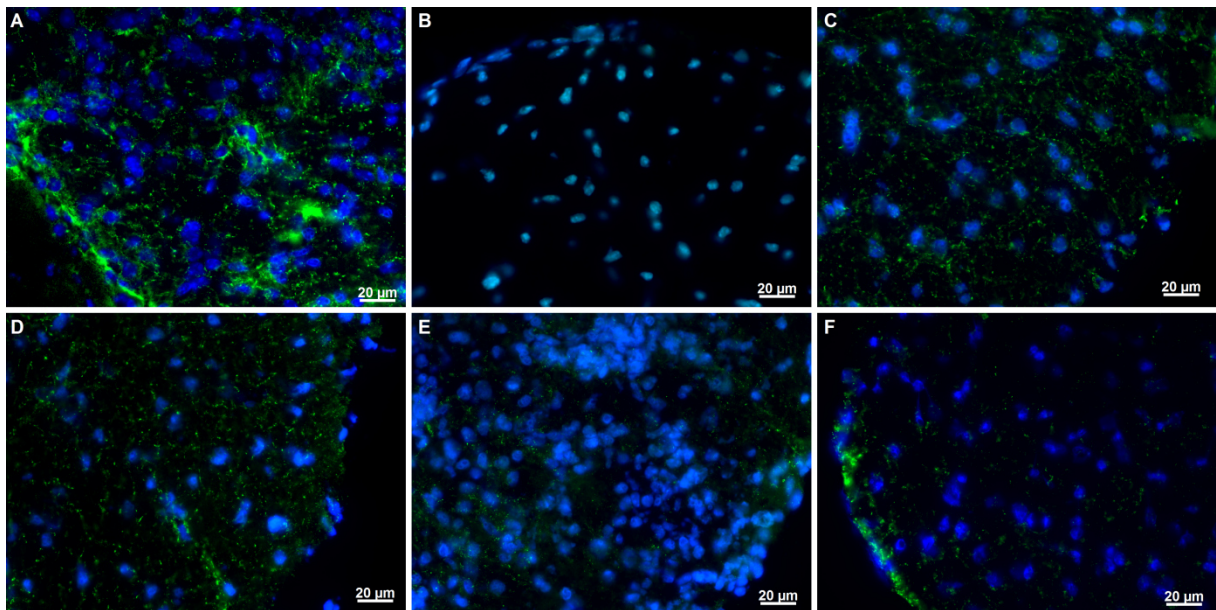


Abbildung 14: Cx43-Immunfluoreszenz (grün) des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Querschnitte des N. opticus aus dem peripheren Bereich. (A) Als Positivkontrolle dienten Kryoschnitte des Gehirns. (B) Negativkontrolle waren Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx43-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten der Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

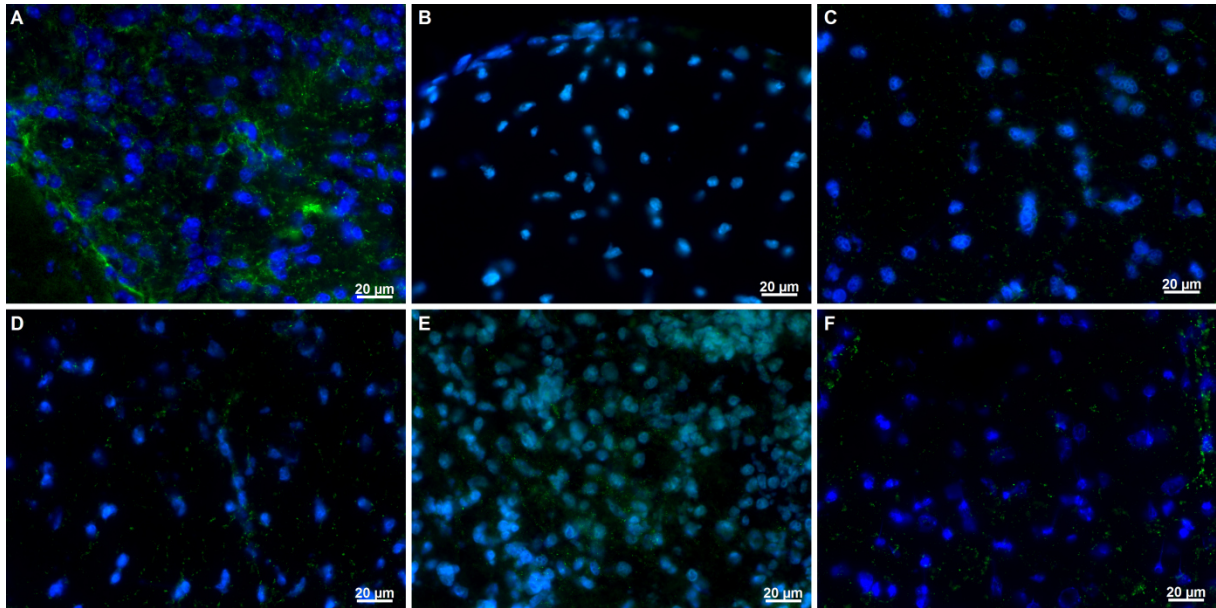


Abbildung 15: Cx43-Immunfluoreszenz (grün) des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Querschnitte des N. opticus aus dem zentralen Bereich. (A) Als Positivkontrolle dienten Kryoschnitte des Gehirns. (B) Negativkontrolle waren Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx43-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten der Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

In den Immunfluoreszenzen der Nn. optici der Kontrolltiere war die Intensität der astrozytären Cx43-Markierung sehr stark. In den Nn. optici der EAE-Tiere kam es in den zentralen Arealen der Nn. optici zu einer signifikanten Abnahme der Cx43-immunpositiven Fläche (Abbildung 16). Die periphere Proteinexpression war hingegen unverändert zwischen den Gruppen. Die Meningen zeigten, wie in Abbildung 14 besonders gut zu erkennen ist, ein besonders intensives Signal. Einschränkend muss daher erwähnt werden, dass die Meningen nicht an allen Nerven erhalten waren, so dass die Messung nur in manchen Anschnitten die Cx43-exprimierenden Meningen einschloss. In der Auswertung zu Abbildung 16 wurden die drei Scoregruppen zusammengefasst. Die getrennte Betrachtung der Scoregruppen (Abbildung 17) ergab keine signifikanten Unterschiede in der Cx43-Expression zwischen Kontrolltieren und den EAE-Tieren der einzelnen Gruppe.

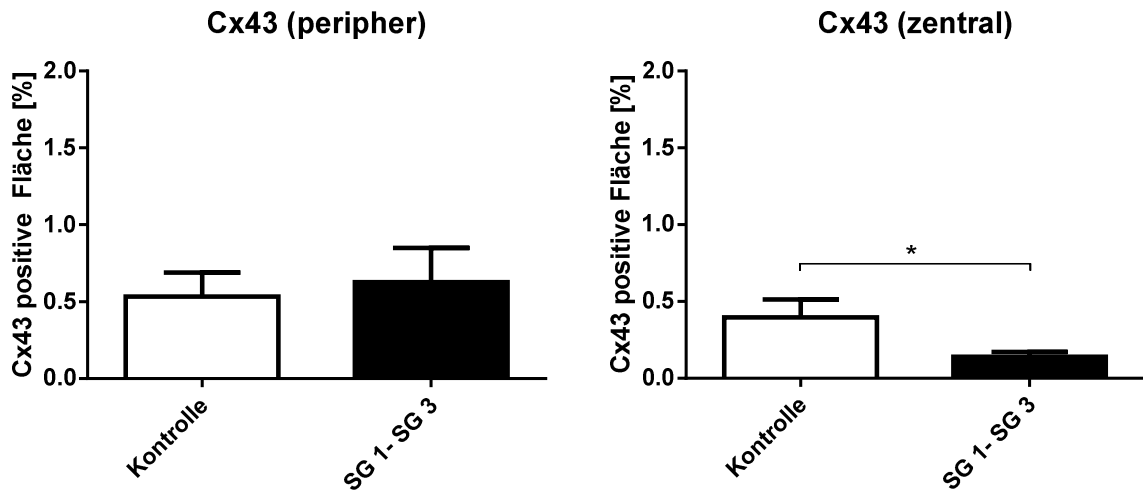


Abbildung 16: Der Anteil der Cx43-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und EAE-induzierten Tieren. Bei den EAE-induzierten Tieren wurde der Mittelwert der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) gebildet. Periphere (Cx43 (peripher)) und zentrale (Cx 43 (zentral)) Areale wurden getrennt ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Im peripheren Bereich zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Cx43-immunpositiven Fläche zwischen Kontroll- und EAE-Tieren. Im zentralen Bereich hingegen wurde eine signifikante Abnahme der Cx43-Expression beobachtet (* $p < 0,05$).

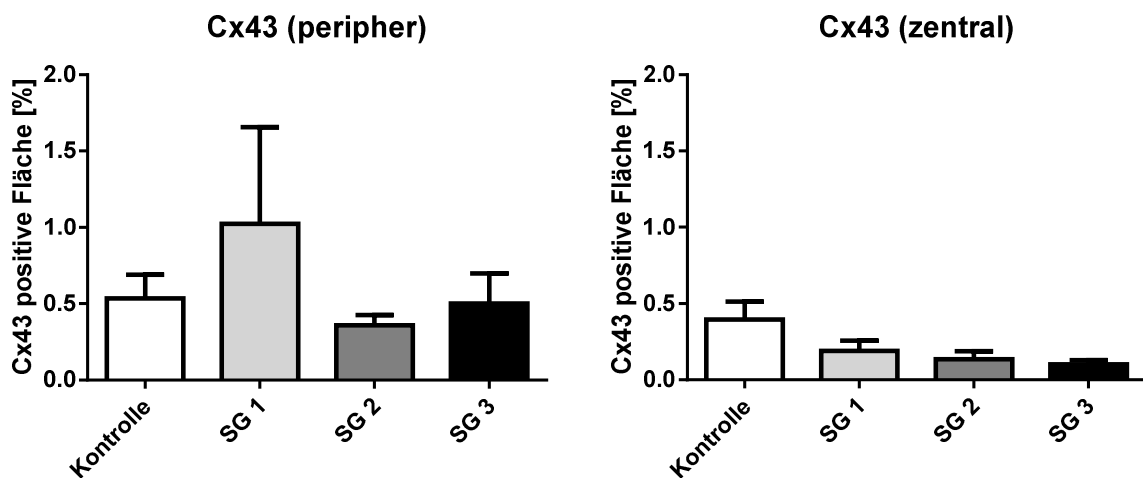


Abbildung 17: Der Anteil der Cx43-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren. Bei den EAE-induzierten Tieren wurden die Tiere der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) separat betrachtet. Periphere (Cx43 (peripher)) und zentrale (Cx43 (zentral)) Areale wurden getrennt ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Bei der Untersuchung der Cx43-Proteinexpression wurde eine signifikante Abnahme im peripheren Bereich des N. opticus im Vergleich der Kontrollgruppe und der Scoregruppe (SG 1- SG 3) gezeigt (Abbildung 16). Diese Signifikanz konnte im Vergleich der drei einzelnen Scoregruppen mit der Kontrollgruppe nicht belegt werden (Abbildung 17).

3.4.1.3 Cx30-mRNA-Expression

Die mRNA-Expression des astrozytären Cx30 wurde in den Nn. optici der Kontrolltiere gezeigt (Abbildung 18). Auch in EAE-Tieren war Cx30 in gleichem Maße exprimiert. Eine geringfügige Reduktion der Mittelwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe war statistisch nicht signifikant.

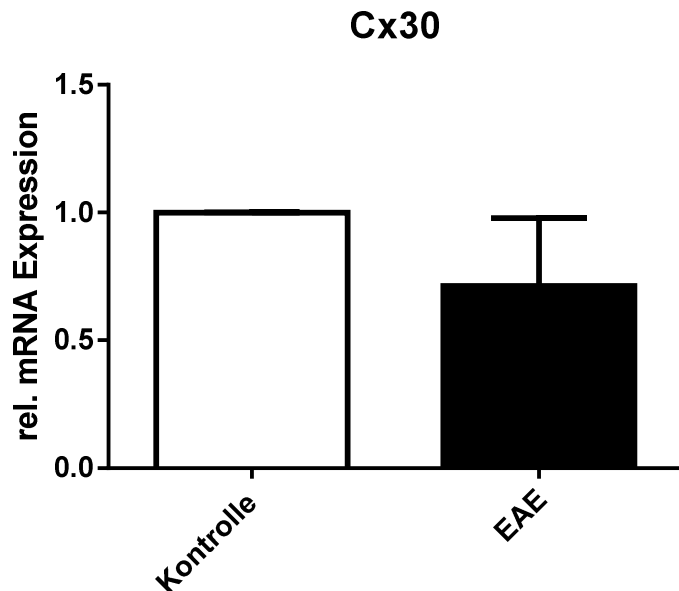


Abbildung 18: Die relative mRNA-Expression von Cx30 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE). Die Daten wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Cx30 Expression der Kontrolltiere im Vergleich zu EAE-Tieren. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Cx30-mRNA-Expression zwischen Tieren der Kontrollgruppe und kranken Tieren.

Ein signifikanter Unterschied in der Cx30-Expression zwischen Tieren der Kontrollgruppe und kranken Tieren konnte auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden.

3.4.1.4 Cx30-Proteinexpression

Cx30 wurde auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente das Gehirn; die Negativkontrolle waren Färbungen von Nn. optici ohne Primärantikörper. Cx30 stellte sich als punktförmiges Signal dar.

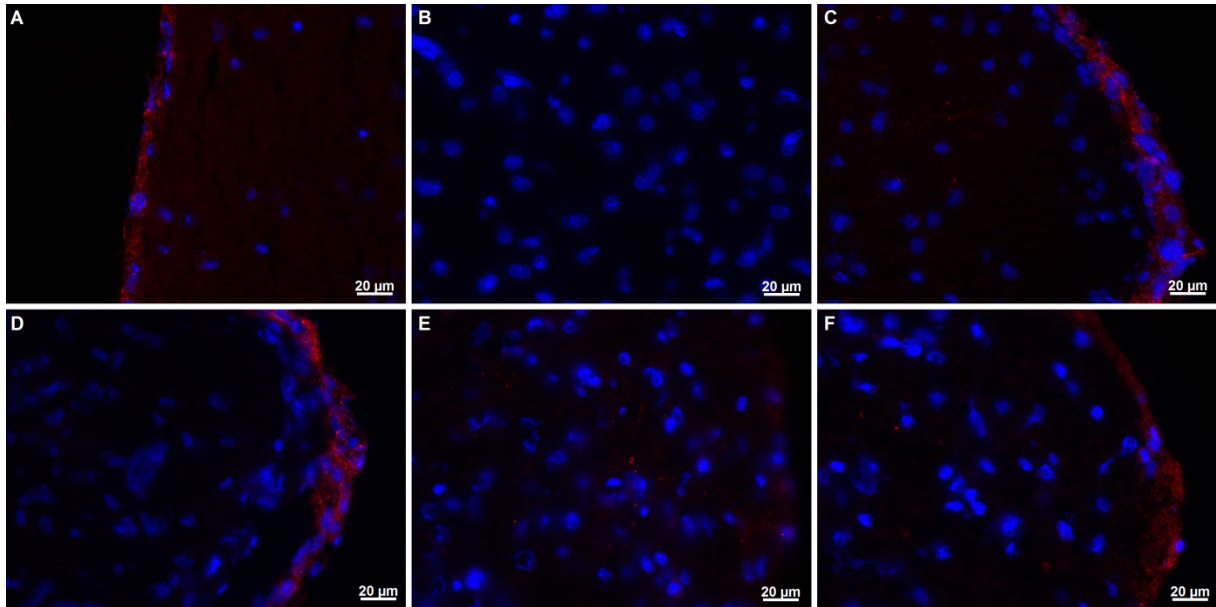


Abbildung 19: Cx30-Immunfluoreszenz (rot) des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Querschnitte des N. opticus aus dem peripheren Bereich. (A) Als Positivkontrolle dienen Kryoschnitte des Gehirns. (B) Negativkontrolle waren Schnitte der Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx30-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten der Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

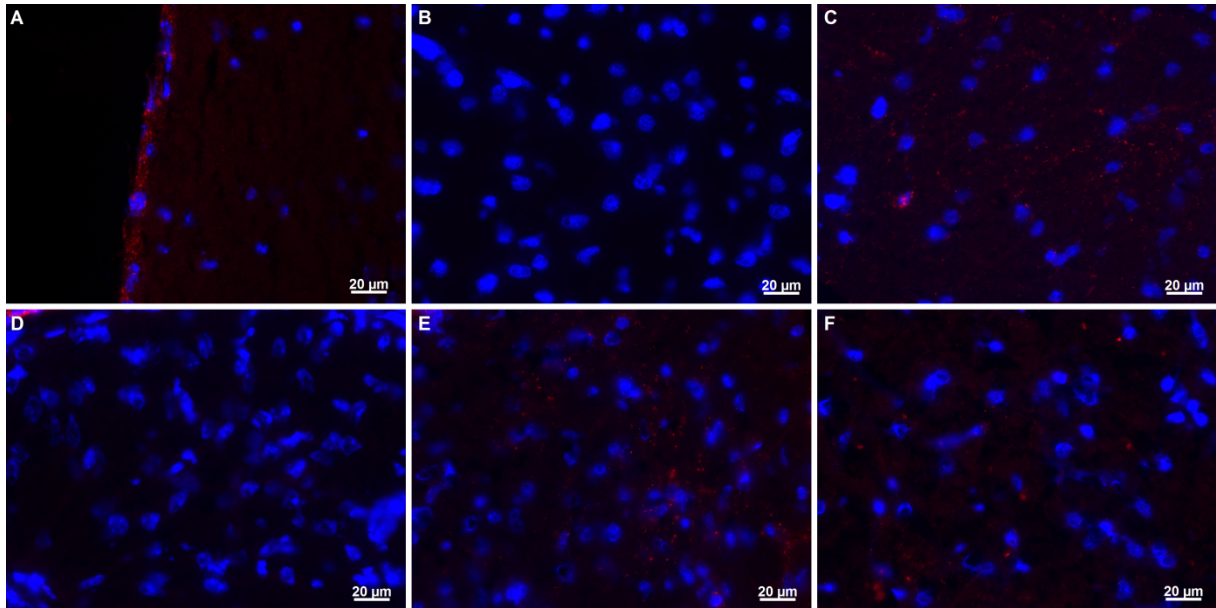


Abbildung 20: Cx30-Immunfluoreszenz (rot) des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Querschnitte des N. opticus aus dem zentralen Bereich. (A) Als Positivkontrolle dienen Kryoschnitte des Gehirns. (B) Negativkontrolle waren Schnitte der Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx30-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten der Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

Die Expression von Cx30 in Astrozyten (Abbildung 19 und 20) zeigte in den Fluoreszenzaufnahmen keine Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und den drei Scoregruppen. Primär war das Fluoreszenzsignal in den Meningen zu detektieren; im N. opticus selbst war das Signal nur sehr diskret zu erkennen. Es zeigt sich auch kein Unterschied des Cx30-Immunsignals zwischen peripheren und zentralen Bereichen.

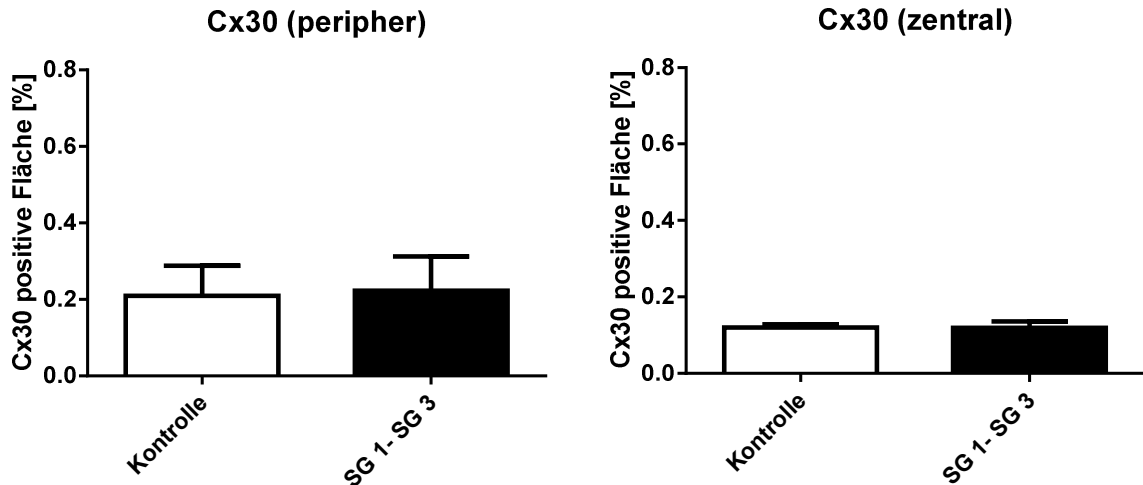


Abbildung 21: Der Anteil der Cx30-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren. Bei den EAE-Tieren wurde der Mittelwert der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) gebildet. Periphere (Cx30 (peripher)) und zentrale (Cx30 (zentral)) Areale wurden getrennt ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

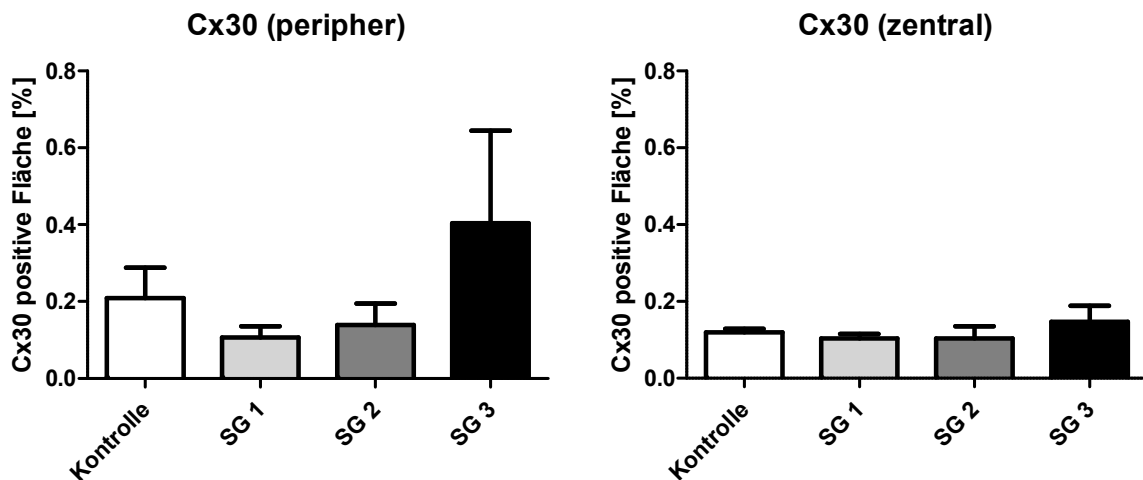


Abbildung 22: Der Anteil der Cx30-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren. Bei den EAE-induzierten Tieren wurden die Tiere der drei Scoregruppen (SG 1- SG 2) separat betrachtet. Periphere (Cx30 (peripher)) und zentrale (Cx30 (zentral)) Areale wurden getrennt ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression von Cx30, weder im Vergleich der Kontrollgruppe mit EAE-induzierten Tieren (SG 1- SG 3), noch bei dem Vergleich der drei verschiedenen Scoregruppen untereinander und mit der Kontrollgruppe (Abbildungen 21 und 22).

3.4.1.5 Cx26-mRNA-Expression

Cx26 ist in den Nn. optici der Kontrolltiere und der EAE-induzierten Tiere exprimiert.

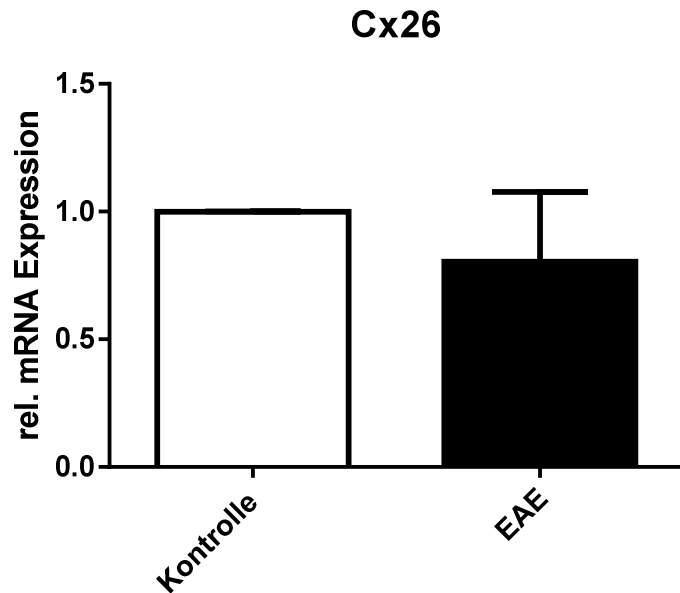


Abbildung 23: Die relative mRNA-Expression von Cx26 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE). Die Daten wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Cx26-Expression der Kontrolltiere im Vergleich zu EAE-Tieren.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Cx26-mRNA-Expression zwischen Tieren der Kontrollgruppe und kranken Tieren (Abbildung 23).

Da sich bereits auf der mRNA-Ebene kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in den Versuchsgruppen zeigte, wurde für Cx26 auf die Untersuchung auf Proteinebene verzichtet. Cx26 wird bevorzugt im Bereich der Leptomeningen exprimiert (Nagy et al. 2001). Da bei der Präparation nicht immer sich die meningeale Schicht bei den Nn. optici erhalten blieb, konnte die Auswirkung der EAE auf Cx26 nicht immer exakt bestimmt werden.

Bei den drei astrozytären Connexinen zeigt nur das Cx43 eine deutliche Veränderung. Im zentralen Bereich der Nn. optici war eine Cx43-Reduktion zu beobachten. Die anderen astrozytären Connexine wiesen keine Expressionsänderung auf.

3.4.2 Expression oligodendrozytärer Connexine in Nn. optici von EAE-Tieren

Zu den oligodendrozytären Connexinen zählen Cx47, Cx32 und Cx29. Zunächst wurden die Connexine mittels quantitativer Real-Time PCR auf mRNA-Ebene betrachtet. Anschließend erfolgten die Untersuchungen auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz.

3.4.2.1 Cx47-mRNA-Expression

Cx47-mRNA wird sowohl in Kontrolltieren als auch in EAE-Tieren exprimiert.

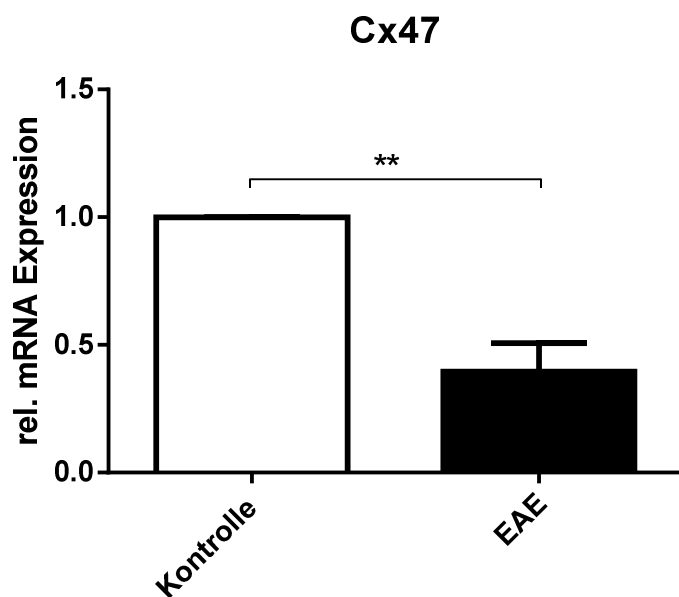


Abbildung 24: Die relative mRNA-Expression von Cx47 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE). Die Daten wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und als Mittelwerte mit Standardfehler [SEM] dargestellt (** $p < 0,01$). Es kam zu einer signifikanten Abnahme in der mRNA-Expression von Cx47 in kranken Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression von Cx47 zwischen Tieren der Kontrollgruppe und kranken Tieren (Abbildung 24).

3.4.2.2 Cx47-Proteinexpression

Die Cx47-Proteinexpression wurde mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Als Positivkontrolle dient das Gehirn, als Negativkontrolle werden Nn. optici ohne Primärantikörper genutzt. Cx47 war als punktförmiges Signal sichtbar.

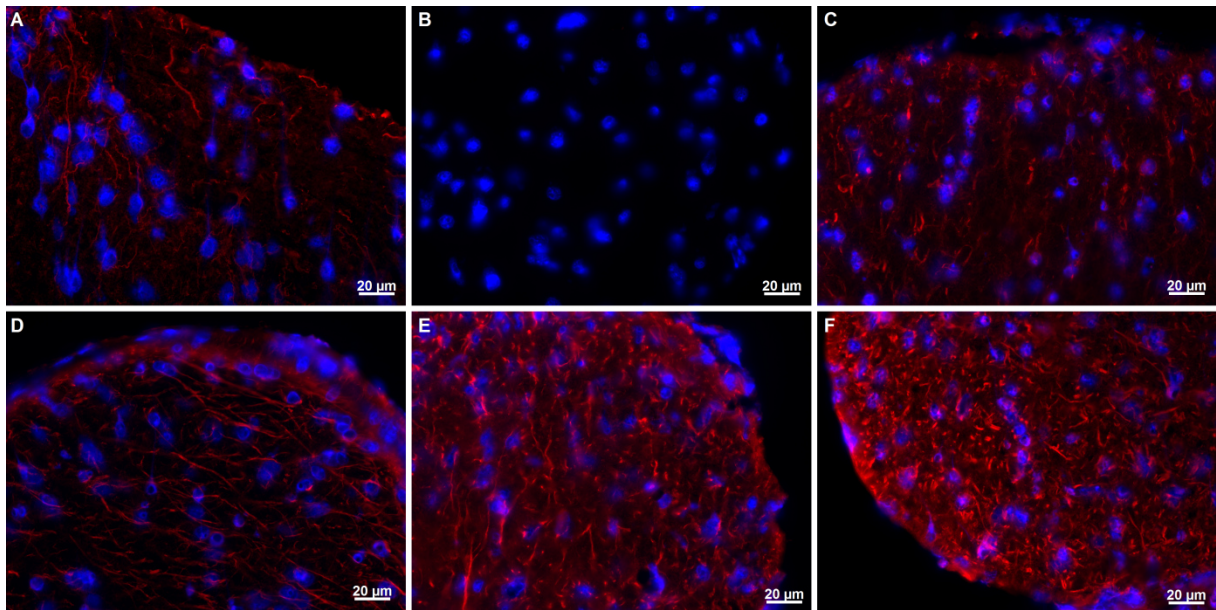


Abbildung 25: Cx47-Immunfluoreszenz (rot) des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Querschnitte des N. opticus aus dem peripheren Bereich. (A) Als Positivkontrolle dienen Kryoschnitte des Gehirns. (B) Als Negativkontrolle dienen Schnitte der Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx47-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten der Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

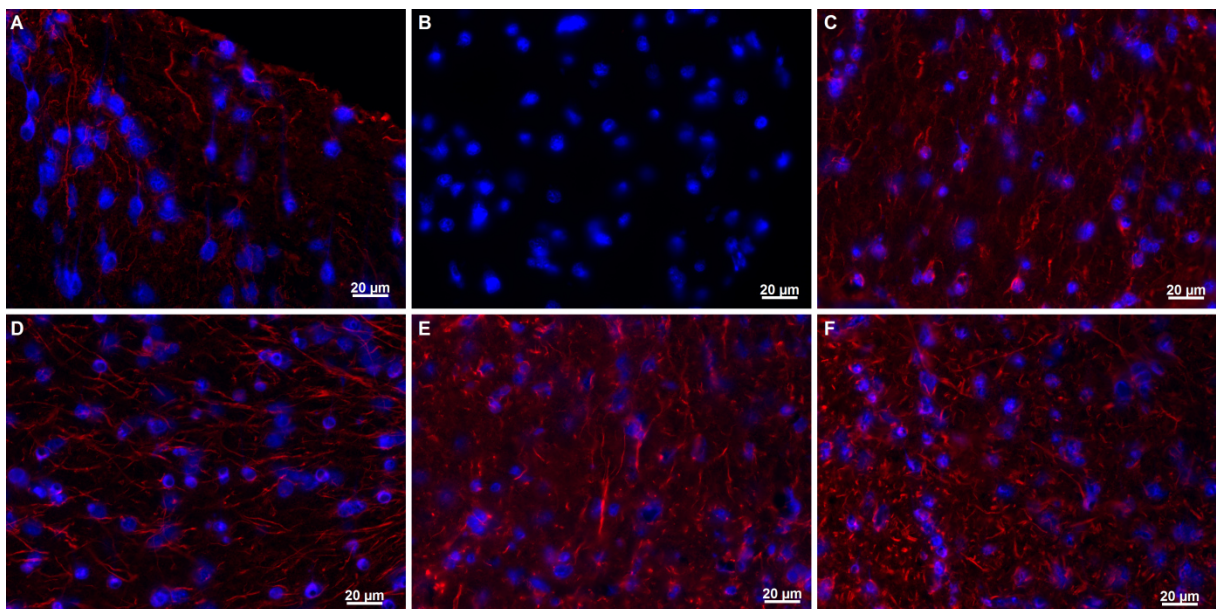


Abbildung 26: Cx47-Immunfluoreszenz (rot) des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Querschnitte des N. opticus aus dem zentralen Bereich. (A) Als Positivkontrolle dienen Kryoschnitte des Gehirns. (B) Negativkontrolle waren Schnitte der Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx47-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten der Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

Für das Cx47-Protein zeigte sich in den Fluoreszenzaufnahmen eine Zunahme der Immunreaktivität in den drei Scoregruppen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildungen 25 und 26).

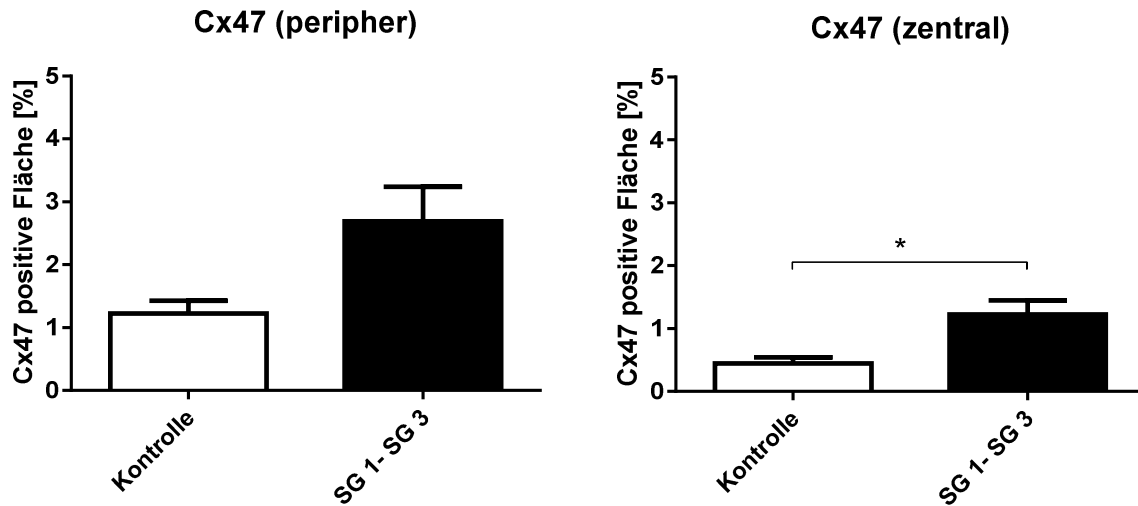


Abbildung 27: Der Anteil der Cx47-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren. Bei den EAE-induzierten Tieren wurde der Mittelwert der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) gebildet. Periphere (Cx47 (peripher)) und zentrale (Cx47 (zentral)) Areale wurden getrennt ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Im peripheren Bereich (Cx47 (peripher)) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Cx47-immunpositiven Fläche zwischen Kontroll- und EAE-Tieren. Im zentralen Bereich hingegen wurde eine signifikante Zunahme der Cx47-immunpositiven Fläche detektiert (* $p < 0,05$).

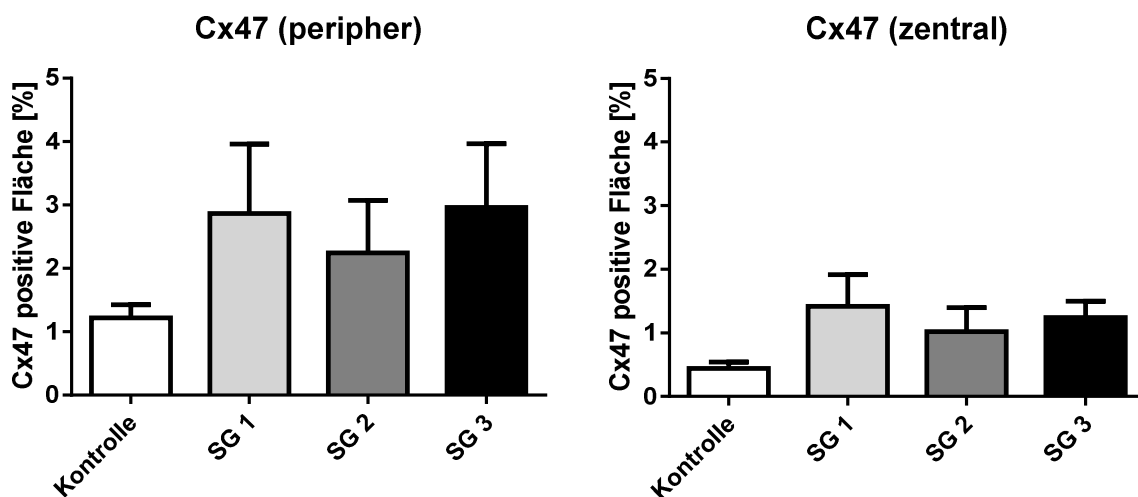


Abbildung 28: Der Anteil der Cx47-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren. Bei den EAE-induzierten Tieren wurden die Tiere der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) separat betrachtet. Periphere (Cx47 (peripher)) und zentrale (Cx47 (zentral)) Areale wurden getrennt ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Cx47-immunpositiven Fläche zwischen Kontroll- und EAE-Tieren aller drei Scoregruppen.

Bei der Untersuchung der Cx47-Proteinexpression konnte eine signifikante Zunahme im zentralen Bereich des N. opticus im Vergleich der Kontrollgruppe zum Gesamtwert der Scoregruppen (SG 1-SG 3) nachgewiesen werden. Diese Signifikanz zeigt sich nur im Vergleich der EAE-induzierten Tiere (SG 1- SG 3) mit der Kontrollgruppe. Dieser signifikante Unterschied zeigte sich im zentralen Bereich der Nn. optici (Abbildungen 27 und 28).

3.4.2.3 Cx29-mRNA-Expression

Cx29-mRNA wird sowohl in Kontrolltieren als auch in EAE-Tieren exprimiert. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Cx29-mRNA-Expression zwischen Tieren der Kontrollgruppe und EAE-induzierten Tieren (Abbildung 29).

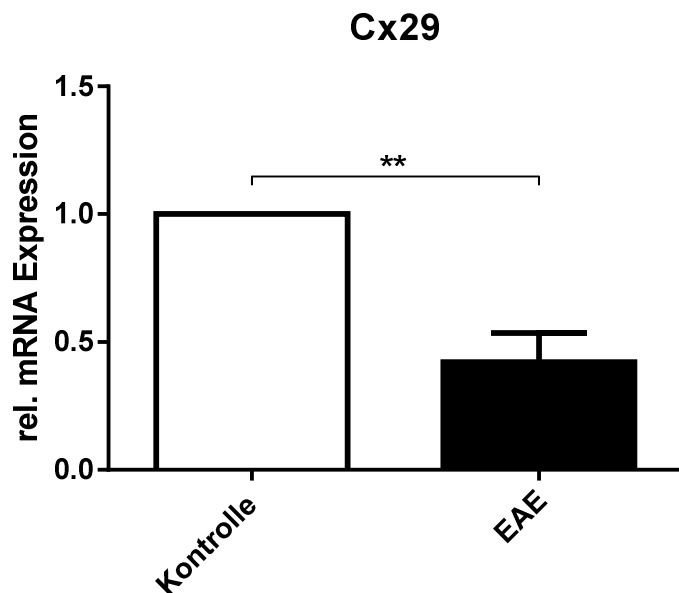


Abbildung 29: Die relative mRNA-Expression von Cx29 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE). Die Daten wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt (** $p < 0,01$). Es kam zu einer signifikanten Abnahme in der mRNA-Expression von Cx29 bei kranken Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.4.2.4 Cx29-Proteinexpression

Die Cx29-Proteinexpression wurde mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Als Positivkontrolle diente das Gehirn, als Negativkontrolle dienten Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx29 stellte sich als punktförmiges Signal dar (Abbildungen 30 und 31).

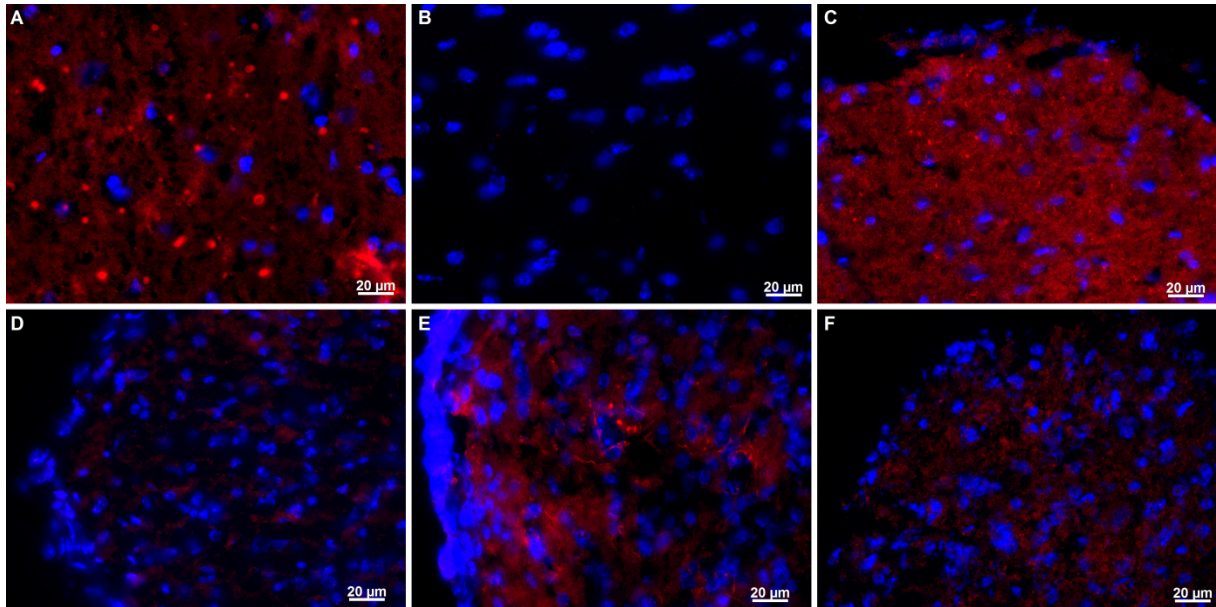


Abbildung 30: Cx29-Immunfluoreszenz (rot) aus dem peripheren Bereich des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren (Querschnitte). (A) Als Positivkontrolle dienten Kryoschnitte des Gehirns. (B) Negativkontrolle waren Schnitte der Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx29-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten der Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

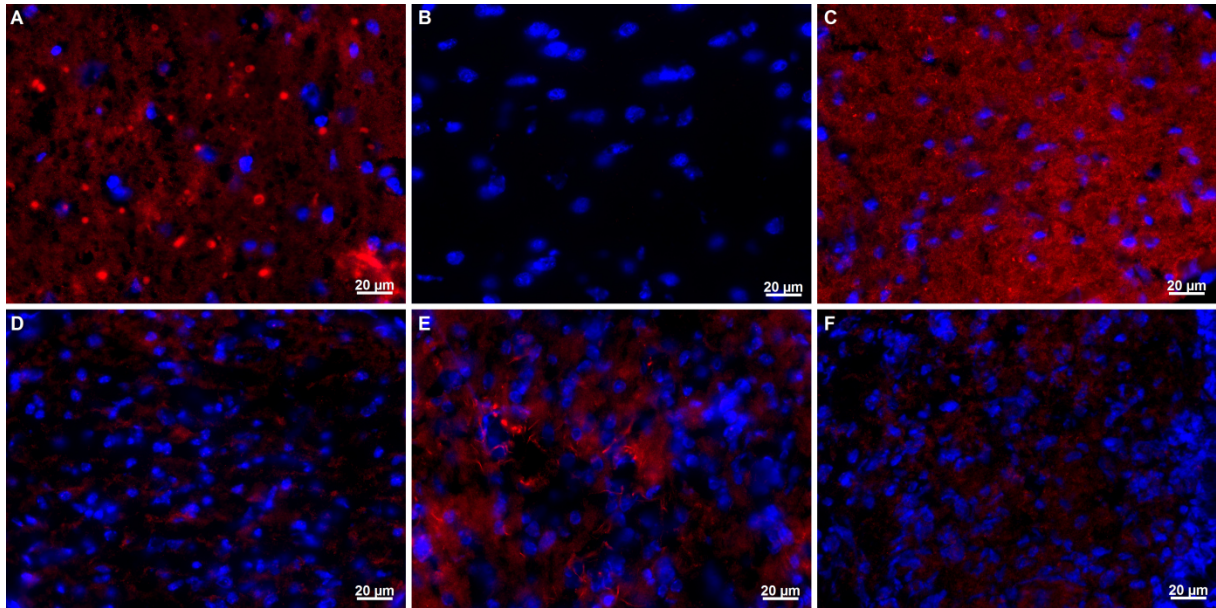


Abbildung 31: Cx29-Immunfluoreszenz (rot) des N. opticus von EAE- und Kontrolltieren. Dargestellt wurden Querschnitte des N. opticus aus dem zentralen Bereich. (A) Als Positivkontrolle dienen Kryoschnitte des Gehirns. (B) Negativkontrolle waren Schnitte der Nn. optici, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Cx29-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten der Nn. optici von (C) Kontrolltieren, (D) EAE-Tieren der Scoregruppe 1, (E) EAE-Tieren der Scoregruppe 2 und (F) EAE-Tieren der Scoregruppe 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 20 µm.

Cx29 gehört zu den oligodendrozytären Connexinen. Im Gegensatz zur signifikanten Reduktion der mRNA-Expression konnte auf Proteinebene kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen der Kontrollgruppe und dem Mittelwert der drei Scoregruppen nachgewiesen werden (Abbildung 32). Auch in der getrennten Betrachtung der drei Scoregruppen zeigte die statistische Auswertung keine signifikante Änderung der Cx29-Expression mit steigendem Score (Abbildung 33).

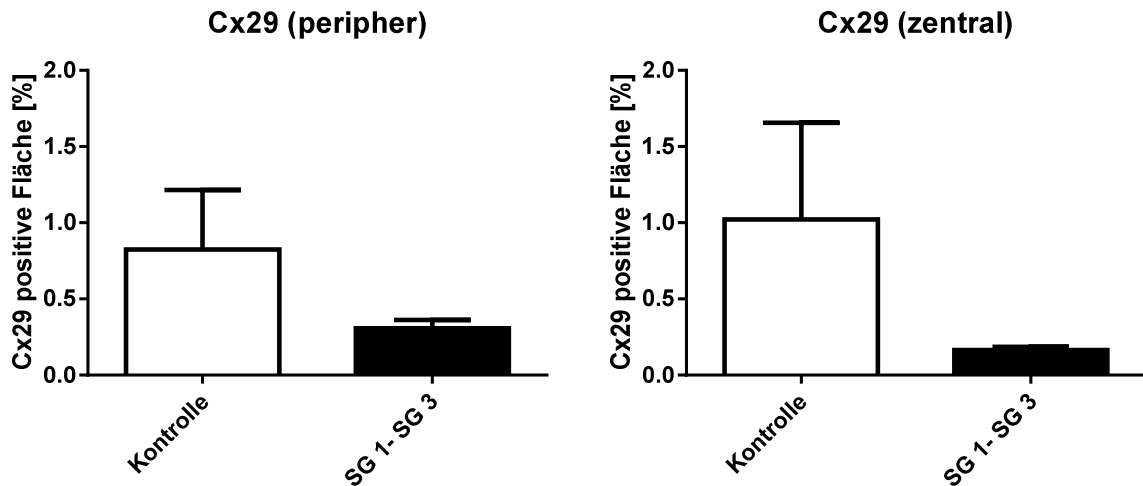


Abbildung 32: Der Anteil der Cx29-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren. Bei den EAE-induzierten Tieren wurde der Mittelwert der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) gebildet. Periphere (Cx29 (peripher)) und zentrale (Cx29 (zentral)) Areale wurden getrennt ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Cx29-immunpositiven Fläche zwischen Kontroll- und EAE-Tieren.

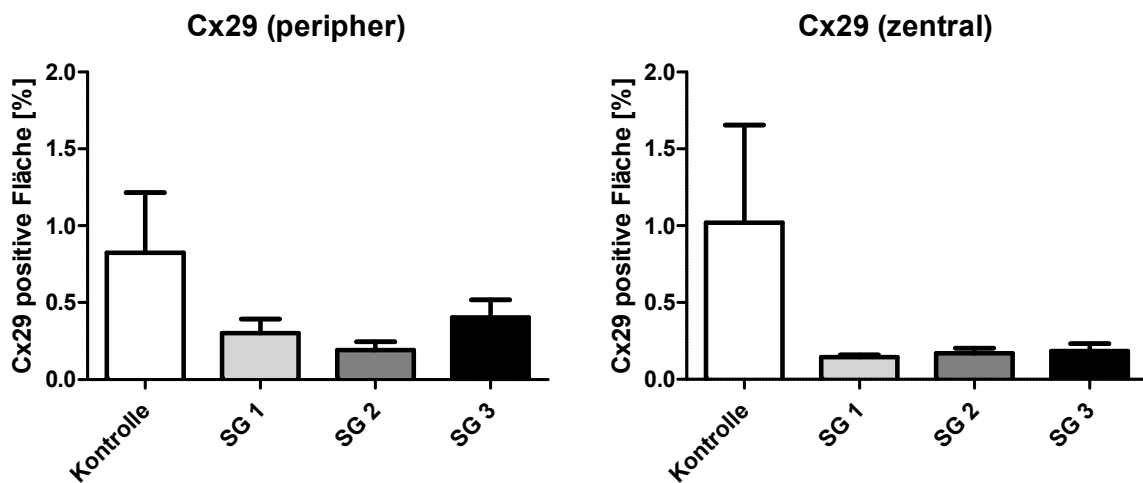


Abbildung 33: Der Anteil der Cx29-immunpositiven Fläche [%] in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren. Bei den EAE-induzierten Tieren wurden die Tiere der drei Scoregruppen (SG 1- SG 3) separat betrachtet. Periphere (Cx29 (peripher)) und zentrale (Cx29 (zentral)) Areale wurden getrennt ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Cx29-immunpositiven Fläche zwischen Kontroll- und EAE-Tieren.

3.4.2.5 Cx32-mRNA-Expression

Cx32-mRNA wird sowohl in den Nn. optici von Kontrolltieren als auch von EAE-Tieren exprimiert. Die EAE hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von Cx32 (Abbildung 34). Auch für Cx32 wurde auf die weitere Untersuchung auf Proteinebene verzichtet, da sich auf mRNA-Ebene kein signifikanter Unterschied gezeigt hatte. Cx32 findet man in myelinisierten Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems. Mutationen von Cx32 führen im peripheren Nervensystem zu Veränderungen (Nualart-Marti et al. 2013, Scherer et al. 1995).

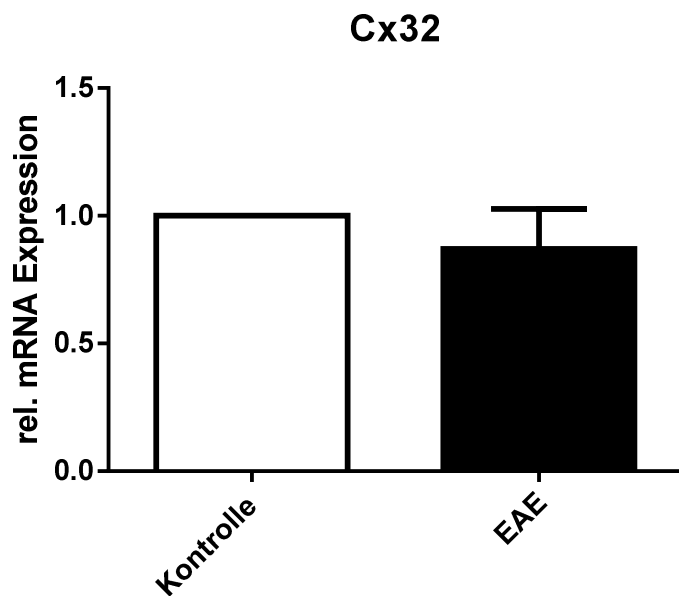


Abbildung 34: Die relative mRNA-Expression von Cx32 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE). Die Daten wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Cx32-Expression der Kontrolltiere im Vergleich zu EAE-Tieren.

3.4.3 Expression eines neuronalen Connexins in den Nn. optici von EAE-Tieren

3.4.3.1 Cx36-mRNA-Expression

Cx36-mRNA wurde sowohl in den Nn. optici von Kontrolltieren als auch von EAE-Tieren detektiert. Es kam zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression von Cx36 bei kranken Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 35).

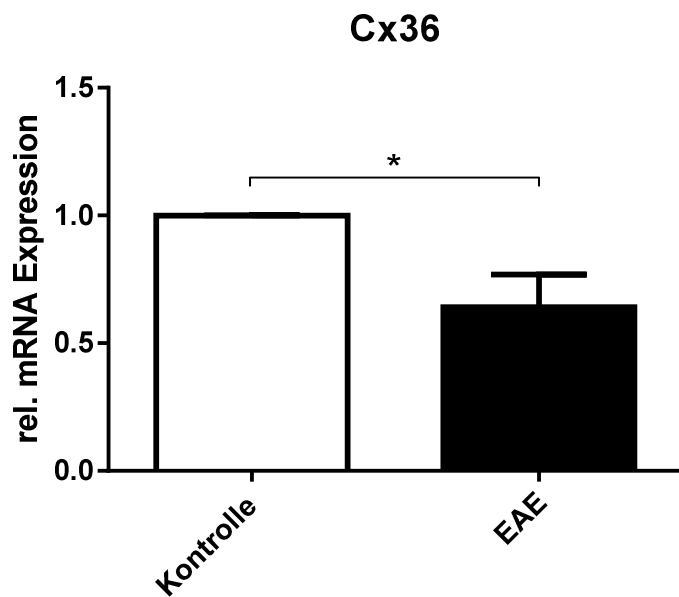


Abbildung 35: Die relative mRNA-Expression von Cx36 in der Kontrollgruppe (Kontrolle) und in EAE-induzierten Tieren (EAE). Die Daten wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt (* $p < 0,05$).

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der glialen Connexinen, weshalb eine weitere Untersuchung der Proteinexpression von Cx36 in einer weiteren Arbeit erfolgen sollte.

4 Diskussion

4.1 Pathomechanismen der Multiplen Sklerose und der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Die MS ist eine sehr heterogene Erkrankung mit mehreren pathologischen Merkmalen, einschließlich Demyelinisierung, Inflammation und Axonschädigung (Stadelmann et al. 2011). Diese Arbeit verfolgte die Hypothese, dass insbesondere die Inflammation einen Effekt auf die interzelluläre Kommunikation der Zellen im Nervensystem mittels Gap Junctions hat und sich die Expression der Gap Junction-Proteine somit in erkrankten Tieren verändert. Da in vielen Patienten eine Neuritis des N. opticus als eines der ersten Symptome einer MS auftritt (Danesh-Sani et al. 2013, Pau et al. 2011, Petzold et al. 2014), lag der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der Gap Junction-Proteinexpression im N. opticus.

Analysiert wurden murine Nn. optici nach Induktion einer EAE. Das EAE-Modell ist eines von vielen tierexperimentellen Ansätzen, in denen unterschiedliche Aspekte der Pathologien einer MS imitiert werden. Im EAE-Modell liegt der Fokus auf der inflammatorischen Komponente: Nach Induktion einer EAE mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid in C57BL/6 Mäusen wird ein Hauptmerkmal der MS besonders gut repräsentiert, nämlich die T-Zell-induzierte Autoimmunkomponente (Constantinescu et al. 2011, Diem et al. 2007, Doronin et al. 2016, Kipp et al. 2017, Sonobe et al. 2007, Wang et al. 2005). Auch in der MOG-induzierten EAE war der N. opticus eines der im Krankheitsverlauf am frühesten betroffenen Gewebe (Diem et al. 2007), so dass dieses Modell besonders gut zur Untersuchung der N. opticus-assoziierten Pathologie geeignet war.

Gap Junctions spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Funktion von allen Geweben und Organen, und besonders in der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn (Aasen et al. 2018). In dieser Arbeit wurde angenommen, dass die inflammatorische Komponente der EAE die Ausbildung von Gap Junctions in neuronalen Zellen nachhaltig beeinflusst. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA- und Proteinexpression von Connexinen in Nn. optici von Mäusen nach EAE-Induktion analysiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurde das Ausmaß der Inflammation im N. opticus bestimmt. Die T-Zellen wurden mittels Anti-CD3-Immunfluoreszenz detektiert. Zusammen mit histologischen Färbungen (HE, LFB), welche die Demyelinisierung der Nerven sowie eine Zellinfiltration zeigten, wies die Präsenz von T-Zellen auf inflammatorische Läsionen in den Nn. optici hin.

Diese Pathomechanismen, i.e. die T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion, die Inflammation und die Demyelinisierung, führten zu einer veränderten Funktion der Gliazellen und somit zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Nervenzellen. Die aus Connexin-Proteinen gebildeten Gap Junctions sind essentiell für die korrekte Erfüllung der Aufgaben der Gliazellen (Gielen et al. 2006,

Nagy and Rash 2003, Schafer and Stevens 2015). Die Inflammation ist ein komplexer Prozess, der aus mehreren Komponenten besteht. Bei der Inflammation kommt es zu einer Aktivierung der Immunzellen, einer Vasodilatation und einer gesteigerten Permeabilität der Endothelzellen für Blutbestandteile (Valdebenito et al. 2018, Willebrords et al. 2016). Es werden zudem inflammatorische Zytokine freigesetzt. Neben den neuronalen Zellen exprimieren auch Immunzellen wie die Zellen des mononukleären phagozytotischen Systems, Mikroglia, T-Zellen und Granulozyten Connexine (Valdebenito et al. 2018). Während einige der inflammatorischen Zytokine die Connexin-Expression der Immunzellen hemmen, stimulieren andere die Connexin-Expression (Valdebenito et al. 2018). Neben der Connexin-Expression wird auch die Kanalfunktion der Gap Junction bzw. der Hemikanäle durch Zytokine moduliert: Pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1beta (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) reduzieren die Gap Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation der Immunzellen (Valdebenito et al. 2018, Willebrords et al. 2016). Dahingegen weisen die Ergebnisse dieser Arbeiten auf eine Aktivierung der Hemikanäle durch IL- β und TNF- α hin, was zur Freisetzung von ATP führt. ATP wiederum verstärkt die Inflammation (Valdebenito et al. 2018). Vergleichbare Effekte haben die pro-inflammatorischen Zytokine auch auf Astrozyten: In fetalen Astrozyten reduzierte IL-1 β sowohl die Cx43-Expression als auch die interzelluläre Kommunikation (Duffy et al. 2000).

Bei der MOG-induzierten EAE zeigten sich fast zeitgleich zur Inflammation die Axonschädigung und die Demyelinisierung. Diese pathophysiologischen Veränderungen erschienen schon vor Ausbildung der klinischen Symptome (Ayers et al. 2004). Das Ausmaß der klinischen Symptome hingegen korrelierte mit der Ausprägung der Inflammation und der Demyelinisierung. Im Zusammenhang mit der Inflammation traten auch Veränderungen von Mikroglia und Astrozyten auf. Während der EAE stieg die Anzahl der Astrozyten und der Mikroglia an (Horstmann et al. 2013). Auch in anderen inflammatorischen Modellen, wie dem der Virus-induzierten Inflammation, kam es durch eine Inflammation zu einer Zunahme der Mikroglia-Zellzahl. Diese sezernierten dann Zytokine und Chemokine, was wiederum zu einer Ausbreitung der Immunreaktion führte. Proinflammatorische Zytokine induzierten die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in Mikroglia, was wiederum zu einem Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO) führt. Die Stickstoffmonoxidproduktion der Mikroglia verursachte eine Oligodendrozytenschädigung und Demyelinisierung. Wenn man sich nun den Astrozyten widmete, konnte man ebenfalls einen Anstieg der Astrozytenzahl bei einer Inflammation beobachten. Die von den Astrozyten sezernierten Zytokine führten zu einem Anstieg der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Dies verstärkte zusammen mit der astrozytären Chemokinproduktion die Immunantwort (Chastain et al. 2011). Die Inflammation, welche ein Merkmal der MS und EAE ist (Danesh-Sani et al. 2013, Pau et al. 2011, Petzold et al. 2014), hatte Auswirkungen auf die Gliazellen (Chastain et al. 2011), was wir in dieser Arbeit genauer betrachten wollten.

Es stellte sich nun die interessante Frage, ob es in der EAE zu Veränderungen der neuronalen und glialen Connexinexpression im N. opticus kommt. Dies sollte in dieser Studie genauer untersucht werden. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass eine EAE zu Veränderungen der Cx29-, Cx36-, Cx43- und Cx47-Expression im N. opticus führte.

4.2 Astrozytäre Connexine

Zu den Connexinen der Astrozyten gehören Cx26, Cx30 und Cx43 (Abrams and Scherer 2012, Rash et al. 2001b). In dieser Arbeit wurde eine EAE-bedingte Reduktion der astrozytären Cx43-Expression beobachtet. Dieses Ergebnis wurde in dieser Studie erstmals für den N. opticus gezeigt. Interessanterweise ließ sich diese Änderung nur auf Proteinebene nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Veränderung auf mRNA-Ebene detektiert werden.

Eine Reduktion der Cx43-Expression wurde in anderen EAE-Studien bereits für andere Gewebe nachgewiesen: In der weißen Substanz des lumbalen Rückenmarks von SJL/J-Mäusen kam es in Läsionsgebieten zu einer reduzierten Cx43-Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Die Anzahl der GFAP-positiven Astrozyten war hingegen nahezu konstant geblieben. Diese Daten wurden von den Autoren dahingehend interpretiert, dass der Cx43-Verlust nicht auf einen Astrozytenverlust zurückzuführen war (Brand-Schieber et al. 2005). Die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der mRNA-Expression von Cx43 könnten auf die Verwendung unterschiedlicher Gewebe zurückzuführen sein. In dieser Arbeit wurde der N. opticus untersucht, während bei Brand-Schieber et al. das Rückenmark betrachtet wurde (Brand-Schieber et al. 2005). Auch die Methoden der mRNA-Detektion, i.e. Microarray-Analyse bei Brand-Schieber et al. (Brand-Schieber et al. 2005) und qRT-PCR in dieser Arbeit, waren nicht identisch. Diese methodischen Unterschiede könnten diese unterschiedlichen Ergebnisse bedingen.

In einer Arbeit von Faustmann et al. wurde ebenfalls eine Cx43-Reduktion bei zunehmender Zahl von Mikrogliazellen, welche *in vivo* Zeichen einer Neuroinflammation sind, beobachtet werden (Faustmann et al. 2003). In dieser *in vitro* Untersuchung von Co-Kulturen mit Astrozyten und Mikroglia wurde deutlich, dass das Astrozytennetzwerk durch Mikroglia reguliert wurde. In diesen Kulturen kam es zu einem Absinken der astroglialen Cx43-Proteinexpression bei größerer Anzahl aktivierter Mikroglia (Faustmann et al. 2003). Eine Erklärung dafür wäre, dass die aktivierte Mikroglia eine zytotoxische Auswirkung auf die Astrozyten hatten. Somit führte entweder eine dadurch entstandene Reduktion der Astrozytenzahl zu einer Cx43-Reduktion oder es kam isoliert zu einer Reduktion von Cx43 in den Astrozyten. Die Arbeiten von Duffy et al. legen nahe, dass pro-inflammatorische Interleukine sowohl die Expression als auch die Kanalfunktion von Cx43 in Astrozyten einschränken (Duffy et al. 2000) und auch Faustmann et al. konnten die Reduktion der Gap Junction-vermittelten interzellulären Kommunikation in Astrozyten nachweisen (Faustmann et al. 2003).

Somit zeigten die Arbeiten von Faustmann et al. (Faustmann et al. 2003), Brand-Schieber et al. (Brand-Schieber et al. 2005) sowie diese Arbeit *in vivo* und *in vitro*, dass es unter inflammatorischen Bedingungen zu einem Cx43-Verlust in Astrozyten kam.

Eine Erklärung für die verminderte Cx43-Proteinexpression wäre, dass diese durch die Immunreaktion bedingt sein könnte. Die Inflammation und die Aktivierung der Immunzellen bei der EAE könnten zu einer Zytokin-vermittelte Reduktion der Cx43-Proteinexpression führen. Die fehlenden Connexine könnten zu einer gestörten Astrozytenfunktion führen und dadurch eine gestörte Homöostase bedingen. Dies könnte die klinische Verschlechterung der Symptome erklären.

Interessanterweise deuteten andere Arbeiten auf eine andersgerichtete Regulation in Zellen des Plexus choroideus hin: In Dark-Agouti-Ratten wurde über Injektion von MOG-Antikörpern eine EAE induziert. Zum Zeitpunkt der stärksten Symptomausprägung wurde ein signifikanter Anstieg der Cx43-Proteinexpression im Plexus choroideus sowie in der subventrikulären und hippocampalen subgranulären Zone festgestellt (Jovanova-Nesic et al. 2009). Zudem konnte man bei Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop strukturelle Veränderungen der Oberfläche von Epithelzellen des Plexus choroideus feststellen, welche ein „kraterähnliches Gebilde“ zeigten (Jovanova-Nesic et al. 2009). Als Ursache dafür wurde eine EAE-assoziierte Ödembildung postuliert. Auch die Gap Junctions zeigten eine strukturelle Veränderung: Analysen von Topographien nach Atomic Force Mikroskopien ergaben, dass der Innendurchmesser der extrazellulären Schleife deutlich geringer im Vergleich zu gesunden Tieren war (Jovanova-Nesic et al. 2009).

Somit könnte die Regulation des Cx43 zell- und damit auch funktionsspezifisch sein: Während es in den Nn. optici und dem Rückenmark zu einer Cx43-Reduktion kam, zeigte sich im Plexus choroideus ein Anstieg des Cx43. In ihrer Lokalisation, zellulären Zusammensetzung und Funktion unterschieden sich beide Gewebe, was eine spezifische Regulation des Cx43 vermuten lässt.

Ein möglicher Zusammenhang von zellulärer Funktion und Connexin-Expression zeigte sich auch, wenn man die Phase der Demyelinisierung und der Remyelinisierung vergleichend betrachtete: Bei Roscoe et al. sah man einen Anstieg der Cx43-Expression in der Phase der Remyelinisierung. In den demyelinisierten Arealen sah man dagegen eine Reduktion der Cx43-Expression (Roscoe et al. 2007a, Roscoe et al. 2007b), was sich auch in unserer Studie beobachten ließ. Das wäre eine Bestätigung, dass die Untersuchungen dieser Arbeit zu einem Zeitpunkt der Demyelinisierung erfolgten. Dieses unterschiedliche Connexin-Expressionsänderungen konnte nochmals bestätigt werden in Untersuchungen der akuten sowie der chronischen EAE: In der akuten EAE (Tag 14 und 28 nach EAE-Induktion) war eine Cx43-Reduktion zu sehen und in der chronischen EAE (Tag 50 nach EAE-Induktion) kam es dann zu einem Anstieg von Cx43-Expression (Papaneophytou C. et al. 2019). In unserer Arbeit haben wir nur die Connexin-Expression in der Phase der Demyelinisierung betrachtet und dabei eine Cx43-Proteinreduktion detektiert. Zusammenfassend gingen somit die unterschiedlichen Erkrankungsstadien, i.e. das Stadium der Demyelinisierung und das Stadium der Remyelinisierung, mit einem spezifischen Expressionsverhalten der Connexine einher.

Brand-Schieber et al. beschrieben eine Cx43-Reduktion auf Proteinebene und mRNA-Ebene ohne Astrozytenverlust (Brand-Schieber et al. 2005). Ob die beobachtete Cx43-Reduktion in dieser Studie im N. opticus eine isolierte Cx43-Reduktion auf Proteinebene war oder ob die Reduktion auf ein Absinken der Astrozytenzahlen zurückzuführen war, muss in einer weiteren Untersuchung geklärt werden. Wir sahen, dass die mRNA-Expression von Cx43 unverändert war. Ein Grund für die Reduktion der Cx43-Proteine könnte ein vermehrter Abbau des Proteins oder eine verminderte Translationsrate sein. Da in dieser Arbeit eine Cx43-Reduktion auf Proteinebene gezeigt werden konnte, könnte man aufgrund von früheren Arbeiten darauf schließen, dass die beobachteten Abschnitte der N. opticus sich in der Phase der Demyelinisierung befanden, wie mittels LFB-Färbung dargestellt wurde. Ob die Cx43-Reduktion eine Ursache oder Folge einer Astrozytenfunktionsstörung ist, muss in weiteren Untersuchungen erforscht werden. Cx43 schien aber eine Rolle für den weiteren Krankheitsverlauf zu spielen: Die Cx43-Reduktion könnte zu einem verminderten Kalium- und Glutamattransport führen, was wiederum in einem veränderten pH-Wert und einer gestörten Homöostase resultieren würde. Die pH-Wert- und Homöostaseveränderungen, zusammen mit der EAE-assoziierten Inflammation und der Aktivierung von Immunzellen, könnte möglicherweise die klinischen Symptome der EAE verstärken.

In dieser Arbeit kam es zu einem Absinken der Cx43-Proteinexpression nur in den zentralen Anteilen des N. opticus, nicht aber im peripheren Bereich. Im peripheren Bereich des N. opticus sind die Hirnhäute lokalisiert, die von der Connexin-Veränderung gar nicht bzw. nicht so stark betroffen sind. Die starke Expression im peripheren Bereich könnte geringe Änderungen im zentralen Bereich möglicherweise überdecken. Eine weitere Erklärung für die Unterschiede zwischen dem zentralen und peripheren Bereich könnte in einer zeitlichen Komponente liegen: Bei der EAE könnte die reduzierte Cx43-Proteinexpression im peripheren Bereich des N. opticus zu Beginn der Erkrankung auftreten und sich im Verlauf der EAE nach zentral ausbreiten. Die inflammatorischen Zellen und die Immunzellen treten durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS ein und breiten sich dann von den peripheren Areal bis zu den zentralen Bereich aus. In der fortgeschrittenen Erkrankungsphase könnte man demnach erwarten, die Connexinveränderungen vor allem in den zentralen Bereichen des N. opticus finden.

Die Unterschiede der Cx43-Proteinexpression im zentralen und peripheren Bereich könnten auch eine Erklärung für die unveränderte Cx43-mRNA-Expression sein. Zur Bestimmung der mRNA-Expression wurde bei uns ein Homogenat, welches zentrale und periphere Bereiche des N. opticus enthielt, genutzt. Die gleichbleibend hohe Expression in den peripheren Anteilen könnte der Grund sein, dass leichte Änderungen der Cx43-mRNA-Expression im zentralen Bereich nicht zu detektieren waren.

In den bisherigen Studien der EAE lag der Fokus auf Cx43. In dieser Untersuchung wurde zusätzlich Cx30 auf mRNA- und Proteinebene betrachtet. Hier wurde keine signifikante Veränderung beobachtet. Das dritte Connexin, Cx26, wurde ausschließlich auf mRNA-Ebene untersucht. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und erkrankten Tieren. Da beide

Proteine eine subzelluläre Lokalisation aufweisen, die der von Cx43 ähnelt, weisen die unterschiedlichen Regulationen auf distinkte funktionelle Bedeutungen der drei Connexine in Astrozyten hin.

4.3 Oligodendrozytäre Connexine

Die Connexine der Oligodendrozyten sind Cx29, Cx32 und Cx47 (Kleopa et al. 2004). Im Folgenden wird zunächst Cx47 näher betrachtet.

In dieser Arbeit wurde in den Nn. optici von EAE-induzierten Tieren ein Anstieg der Cx47-Proteinexpression bei gleichzeitiger Reduktion der Cx47-mRNA-Expression beobachtet.

Die Cx47-Expression wurde in einem anderen Tiermodell von Parenti et al. untersucht. Im Cuprizin-induzierten Modell der MS in C57BL/6 Mäusen konnten die Phasen der Demyelinisierung und Remyelinisierung gut untersucht werden (Parenti et al. 2010). In der Phase der Demyelinisierung kam es zu einer Abnahme der Oligodendrozytenanzahl und einer Zunahme sowohl der Mikroglia/Makrophagen als auch der Astrozyten. Während dieser Phase sah man gleichzeitig einen Anstieg der Cx47-Proteinexpression. Parenti et al. postulieren, dass Astrozyten Cuprizin-induzierter Mäuse Cx47 exprimierten und zwar primär in demyelinisierten Arealen – obwohl die Expression von Cx47 physiologischerweise nur in Oligodendrozyten detektiert werden kann. Während der Phase der Remyelinisierung kam es dann zu einem Anstieg der Oligodendrozytenzahlen und zu einer Abnahme der Mikroglia/Makrophagen. Die Anzahl der Astrozyten blieb weiterhin erhöht. Die Proteinexpression von Cx47 sank in dieser Phase wieder. Das oligodendrozytäre Cx47 stieg also zunächst an und war in der Phase des Myelinverlustes überwiegend in Astrozyten exprimiert. In der Phase der Remyelinisierung sank die Cx47-Proteinexpression wieder und verlagerte sich wieder hin zu den Oligodendrozyten und dem Myelin (Parenti et al. 2010). Möglicherweise sind diese Änderungen jedoch spezifisch für das Cuprizin-Modell, das in der Studie von Parenti et al. Anwendung fand (Parenti et al. 2010). Dafür spräche auch, dass eine Arbeit von Markoullis et al. im Mausmodell der EAE, das mittels MOG-Peptid-Applikation in C57BL/6 Mäuse induziert wurde, ein anderes Ergebnis zeigte. Die Gap Junction-Plaques wurden mittels Immunfluoreszenz untersucht und zeigten folgende Veränderungen: Es kam während der Demyelinisierung (Tag 14 p.i.) zu einer Reduktion der Cx47-Gap Junctions und während der Remyelinisierung (Tag 28 p.i.) zu einem Anstieg der Cx47-Gap Junction (Anzahl der Cx47 Gap Junction-Plaques/Quadrant der weißen Substanz). Die Cx47-Proteinexpression blieb initial konstant und sank dann im Krankheitsverlauf ab. Die Cx47- und Cx32-mRNA-Expression sank während der Demyelinisierung und stieg wieder während der Remyelinisierung (Markoullis et al. 2012a). Da über die unterschiedliche Induktion in beiden Modellen (EAE; Cuprizin) auch unterschiedliche Pathomechanismen im Vordergrund stehen, könnten die unterschiedlichen Ergebnisse zur Connexin-Expression auf die ausgeprägte oder fehlende immunologische Komponente des jeweiligen Modells zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit der Immunfluoreszenz zeigten einen Anstieg der Cx47-Proteinexpression. Dies stimmten mit den Ergebnissen von Parenti et al. überein (Parenti et al. 2010). In der Arbeit von Parenti et al. wurde die Cx47-mRNA-Expression allerdings nicht untersucht (Parenti et al. 2010). Der Grund für die teilweise abweichenden Ergebnis dieser Arbeit im Vergleich zu Markoullis et al. (Markoullis et al. 2012a) könnte an den unterschiedlichen Geweben liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde der N. opticus untersucht und in der Arbeit von Markoullis et al. (Markoullis et al. 2012a) wurde das Rückenmark betrachtet. Die Ergebnisse der mRNA-Expression in dieser Arbeit zeigten jedoch eine Reduktion der Cx47-Expression, die wiederum mit den Ergebnissen von Markoullis et al. (Markoullis et al. 2012a) übereinstimmte.

Anhand der LFB-Färbung konnte gezeigt werden, dass wir uns in einem Areal der Demyelinisierung befanden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass in dieser Arbeit die Cx47-Protein und mRNA-Expression in der Phase der Demyelinisierung beobachtet wurden. Das wiederum würde darauf hinweisen, dass Cx47 als ein oligodendrozytäres Connexin eine bedeutende Rolle in der Myelin-Bildung spielt, da die Demyelinisierung und Cx47-mRNA-Reduktion in dieser Arbeit gleichzeitig auftraten. In Cx47-defizienten Mäusen zeigten sich deutliche Defizite im Myelin (Papanephytous et al. 2018).

Möglicherweise besteht eine Wechselwirkung zwischen Cx47-Expression und Myelinisierung: Zum einen kann die Cx47-Expressionsänderung zu einer Demyelinisierung führen. Durch die reduzierte Cx47-mRNA-Expression, bei gleichzeitig vermindertem Cx47-Proteinabbau, könnte es zu einer gestörten Oligodendrozytenfunktion und dadurch zu einer verminderten Myelinisierung der Axone durch Oligodendrozyten kommen. Zum Zweiten kann die Demyelinisierung eine Veränderung der Cx47-Expression bedingen. Durch die Demyelinisierung und Immunezellaktivität käme es zu einem Abbau der Myelinscheide. Durch die vermehrte Immunezellaktivierung könnte die Cx47-mRNA-Expression suprimiert werden. Durch verlangsamten Abbau des Cx47-Proteins ist dieses aber noch erhöht. Hierfür müsste in weiteren Untersuchungen die Veränderungen im zeitlichen Verlauf genauer betrachtet werden.

Auch die Unterschiede in der mRNA- und der Proteinexpression muss man genauer betrachten. Eine Erklärung für die erhöhte Proteinexpression bei erniedrigter mRNA-Expression ist ein veränderter Umsatz (turn-over), z. B. vermittelt über einen fehlenden oder verlangsamten Abbau des Cx47. Cx47 wird zwar vermindert synthetisiert, aber die Proteinexpression ist erhöht durch fehlenden oder verlangsamten Abbau des Cx47. Denkbar wäre ebenfalls eine reaktive Herunterregulierung der mRNA-Synthese aufgrund vermehrter Proteinansammlung. Das Cx47 spielt eine wichtige Rolle im Erhalt und der Integrität der Myelinschicht. Ob es allein ein Cx47-Protein Anstieg ist oder ob die Cx47-Proteinerhöhung auf eine Zunahme der Oligodendrozytenanzahl zurückzuführen ist, muss in einer weiteren Arbeit geklärt werden. Dazu wäre eine Doppelfärbung mit einem Oligodendrozytenmarker notwendig.

Um jetzt abschließend die gesteigerte Cx47-Proteinexpression und die reduzierte Cx47-mRNA-Expression zu erklären, steht die Inflammation am Anfang der Kaskade. Die Inflammation könnte zu einer zytokinbedingten Cx47-mRNA-Reduktion führen. Diese mRNA-Reduktion bei vermindertem Abbau des Cx47-Proteins führt schlussendlich zu einem Anstieg der Cx47-Proteine und dadurch zu einer vermehrten Aktivität der Gap Junctions. Es kommt zu einem vermehrten Austausch und einer vermehrten Aktivierung von Immunzellen, was einen immunprotektiven Effekt haben könnte. Dadurch wäre die an die demyelinisierende Phase anschließende Remyelinisierung zu erklären.

Neben dem Cx47 gibt es noch zwei wichtige oligodendrozytäre Connexine. Bei einem weiteren oligodendrozytären Connexin, dem Cx29, konnte in dieser Arbeit bei EAE-Mäusen eine Reduktion der mRNA-Expression nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnte eine reduzierte mRNA-Transkription sein oder eine verminderte Anzahl an Oligodendrozyten. Die Proteinexpression von Cx29 blieb bei den EAE-Tieren unverändert zu den gesunden Mäusen bei gleichzeitig verminderter mRNA-Expression. Ein möglicher Grund wäre ein verlangsamter oder reduzierter Abbau der Cx29-Proteine.

Hinsichtlich des letzten der drei oligodendrozytären Connexinen, dem Cx32, konnte in dieser Arbeit keine Veränderung der mRNA-Expression gesehen werden. Markoullis et al. zeigte bei Mäusen eine gesteigerte Cx32-mRNA-Expression, bei gleichzeitig reduzierte Proteinexpression im Rückenmark in der Phase der Demyelinisierung (Markoullis et al. 2012a). Eine Erklärung hierfür wäre ein kompensatorischer Anstieg der mRNA-Synthese auf den Proteinabbau. Eine Deletion von Cx32 führt bevorzugt zu Veränderungen im peripheren Nervensystem (Prost et al. 2008). In dieser Arbeit konnte keine Veränderung der mRNA-Expression festgestellt werden. Die erhaltene Cx32-mRNA-Expression im ZNS könnte auch durch eine nur minimale Beeinträchtigung oder Veränderung des Cx32 im ZNS erklärt werden. Zudem könnte die erhaltene Cx32-mRNA-Expression ein kompensatorischer Ausgleich für die reduzierte Cx29-mRNA-Expression und reduzierte Cx47-mRNA-Expression sein.

4.4 Neuronales Connexin

Cx36 war eines der ersten identifizierten neuronalen Connexine bei den Säugetieren (Condorelli et al. 1998). Das neuronale Cx36 bildet Gap Junction-Kanäle zwischen Neuronen (Bautista et al. 2014, Rash et al. 2001b). Ultrastrukturell wurden jedoch keine Gap Junctions zwischen Neuronen und Gliazellen gefunden (Rash et al. 2001b). Cx36 findet sich auf neuronalen Zellkörpern und Dendriten (Rubio and Nagy 2015). In der Entwicklung der Säugetiere steigt die Cx36-Expression in den ersten beiden postnatalen Wochen an und sinkt dann in der dritten bis fünften postnatalen Woche wieder ab. Bei einer neuronalen Verletzung, wie z.B. der Inflammation, konnte ein schneller Anstieg der Cx36-Expression innerhalb von 1-2 Stunden detektiert werden (Belousov and Fontes 2013). Bautistan et al. konnten anhand mittels Immunfluoreszenz-gefärbten Rückenmarksschnitten von Ratten und Mäuse ein ausschließlich punktförmiges Cx36-Immunfluoreszenzsignal verifizieren. Cx36-Proteinexpression

fand sich in den meisten Laminae des Rückenmarks und im motorischen Kern des N. trigeminus (Bautista et al. 2014). Anhand von in Kultur gebrachten neuronalen Zellen des somatosensorischen Kortex von C57BL/6 Mäusen konnte gezeigt werden, dass die neuronalen Gap Junctions eine essentielle Rolle für neuronalen Zelltod nach hypoxischem oder traumatischem Insult spielen (Fontes et al. 2015). Eine mögliche Erklärung wäre, dass Cx36 Gap Junctions bildet, welche toxische Signalstoffe in die Zelle eindringen ließen. Eine zweite Theorie beschreibt einen Kanal-unabhängigen neuronalen Zelltod, in dem Cx36 einen Teil eines apoptotischen Signalweg vermitteln würde (Fontes et al. 2015).

In der Retina konnte eine spezifische Cx36-Proteinexpression belegt werden (Meier et al. 2002). Das Cx36 konnte in der Retina in der Ganglienzellschicht, der Photorezeptorzellschicht und der inneren Körnerzellschicht nachgewiesen werden (Degen et al. 2004). Dass die retinalen Ganglienzellen, insbesondere die alpha-Ganglienzellen, immunpositiv waren, konnte in einer weiteren Studie erneut nachgewiesen werden, während die Cx36-Expression in amakrinen Zellen dagegen nicht bestätigt wurde (Schubert et al. 2005). Ein weiteres Connexin in der Retina ist das Cx45. Es wurde bevorzugt in den bipolaren Zellen, den amakrinen Zellen und den Ganglienzellen exprimiert. Die Deletion von Cx45 in Neuronen der Retina führte zu einer eingeschränkten visuellen Transmission (Maxeiner et al. 2005). Dahingegen war kein Cx36-Protein in den Axonen der retinalen Ganglienzellen, also im N. opticus, nachzuweisen (Akopian et al. 2017).

Die Analyse der Cx36-mRNA-Expression in der vorliegenden Studie ergab jedoch, dass die Expression von Cx36-mRNA sehr wohl im N. opticus detektierbar war. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EAE-Tiere eine Reduktion der Cx36-mRNA im Vergleich zu Kontrolltieren aufwiesen. Dieses Ergebnis war überraschend, da in den Axonen bislang kein Cx36-Protein nachgewiesen werden konnte (Akopian et al. 2017). Generell wird Cx36 soweit bekannt nur von Neuronen exprimiert (Rubio and Nagy 2015). Eine Hypothese zur Erklärung dieses Befundes könnte eine gesteigerte Cx36-Expression im Neuron bei einer Inflammation sein (Belousov and Fontes 2013). Man fand mRNA erstaunlicherweise auch im Axon. Das bedeutet, dass nicht alle mRNAs im Soma translatiert werden. Die im Neuron entstanden mRNAs bildeten mit den mRNA-bindenden Proteinen einen Komplex und wurden dann durch anterograden axonalen Transport ins Axon transferiert. Axone enthalten kein Endoplasmatisches Retikulum und keinen Golgi Apparat. Für die Proteinsynthese wurde vor kurzem gezeigt, dass sie im Axon über ein axonales Transkriptom stattfand (Costa and Willis 2018). Durch einen gesteigerten anterograden Transport der Cx36-mRNA kann es dann im Axon zu einem Anstieg desselben kommen.

4.5 Gap Junctions

Gap Junctions werden für die Aufrechterhaltung der glialen Funktion benötigt. Sie bilden sich zwischen Astrozyten, zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten und in geringerem Ausmaß auch zwischen Oligodendrozyten aus (Altevogt and Paul 2004, Rash et al. 2001b).

Wenn man die astrozytären Gap Junctions betrachtet, sieht man, dass bevorzugt Cx30 und Cx43 Gap Junctions untereinander ausbilden (Altevogt and Paul 2004, Rash et al. 2001b). Das dritte astrozytäre Connexin, das Cx26, kommt eher in homotypischen Gap Junctions vor (Altevogt and Paul 2004, Rash et al. 2001b). Prinzipiell können aber alle drei astrozytären Connexine, Cx26, Cx30 und Cx43, Gap Junctions miteinander ausbilden. Die Astrozyten spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Kalium-Homöostase und transportieren Kaliumionen über eine gliales Synzytium ab (Nagy and Rash 2003). Daher ist die Verbindung der Astrozyten untereinander über Gap Junctions so essentiell für ihre Funktion.

Wir konnten eine reduzierte Cx43-Proteinexpression in der EAE nachweisen. Diese könnte eine Ursache für eine verminderte Astrozytenfunktion sein. Die Cx43-Reduktion könnte aber vielleicht auch die Folge einer Astrozytenfunktionsstörung sein.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese Reduktion des Cx43 durch eines der beiden anderen astrozytären Connexine kompensiert wird, um die Funktion der Gap Junctions und damit der Astrozyten aufrecht zu erhalten. Laut einer früheren Studie führte eine reduzierte Cx43-Proteinexpression in der EAE zu keinem kompensatorischen Anstieg des zweiten Hauptconnexins der Astrozyten, dem Cx30 (Brand-Schieber et al. 2005). Auch in dieser Arbeit konnte kein kompensatorischer Ausgleich der Reduktion der Cx43-Proteinexpression durch die anderen astrozytären Connexin gezeigt werden.

So wurde auch keine Cx30-Expressionsveränderung bei der EAE beobachtet. Es wurde jedoch gezeigt, dass ein Cx30-Defizit einen protektiven Effekt auf die chronische EAE hat. Die EAE-Induktion in Cx30-Knock-out-Mäusen führte zu einem Anstieg der Astrozyten und zu einem Anstieg der anti-inflammatorischen Wirkung der Mikroglia (Fang et al. 2018). Obwohl in dieser Arbeit keine Cx26- und Cx30-Protein- und mRNA-Expressionsänderung nachgewiesen wurde, spielen Cx26 und Cx30 dennoch eine wichtige Rolle bei der EAE. Eine Erklärung unabhängig von deren Expression wäre z.B. eine gesteigerte interzelluläre Kommunikation der von Cx26 und Cx30 gebildeten Gap Junctions. Somit käme es zwar nicht zu einem kompensatorischen Anstieg der Anzahl von Cx26 und Cx30 Gap Junctions, sondern zu einer Kompensation durch eine Aktivitätszunahme.

Die unveränderte Expression von Cx30 und Cx26 könnte auch darauf hindeuten, dass jedes Connexin eine individuelle Aufgabe hat, welche nicht durch die anderen Connexin kompensiert werden kann. Die fehlende Kompensation durch die anderen Connexine könnte auch an einer fehlenden Signalkopplung der Connexine, begünstigt durch eine fehlende Kolokalisation, liegen. Ob es zu Veränderungen in der Kolokalisation von z. B. Cx43 und Cx30 kommt, muss in einer weiteren Untersuchung mit Doppelfärbung der zwei Connexine untersucht werden.

Nun werden die oligodendrozytären Connexine näher betrachtet. Auch hier wäre interessant, ob die Veränderung eines Connexins zu einer kompensatorischen Veränderung eines weiteren Connexin führt. Bei einem homozygoten Cx47-Verlust bei Mäusen wurde keine kompensatorische Heraufregulierung der beiden anderen oligodendrozytären Connexine, Cx29 und Cx32, beobachtet (Odermatt et al. 2003). In dieser Arbeit konnte ein Anstieg der Cx47-Proteinexpression in der EAE gezeigt werden. Die Proteinexpressionen von Cx32 und Cx29 hingegen blieben unverändert. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Odermatt et al. überein (Odermatt et al. 2003). Interessanterweise konnten wir eine Reduktion der Cx29-mRNA-Expression in der EAE detektieren. Zum einen könnte dies eine Cx47-unabhängige Veränderung sein, zum anderen könnte es aber auch eine durch den Anstieg der Cx47-Proteinexpression kompensatorische Herunterregulierung der Cx29-mRNA sein. Die Cx32-mRNA- und Proteinexpression blieben unverändert.

Bisher wurden die astrozytären Connexine getrennt von den oligodendrozytären Connexinen betrachtet. Sie haben aber auch eine wichtige gemeinsame Rolle. Astrozyten bilden mit Oligodendrozyten Gap Junctions. Cx43 und Cx30 bilden mit Cx47 Gap Junctions. Cx26 bildet bevorzugt mit Cx32 Gap Junctions (Altevogt and Paul 2004). In einer Studie von Nagy et al. konnte gezeigt werden, dass die Veränderung eines Connexins zu einer Veränderung eines zweiten Connexins führte. So veränderten sich z.B. durch die Deletion eines Connexins in Knock-out-Tiere auch die Connexine, die mit diesem in Verbindung standen. In den WT-Tieren ist das oligodendrozytäre Cx32 mit dem astrozytären Cx30 und Cx43 assoziiert. In Cx32-defizienten Mäusen war kein Cx32 mehr zu detektieren. Dabei kam es auch zu einer Reduktion des Cx30. Hinsichtlich des Cx43 sah man jedoch keine Veränderung. Es wurden auch keine Veränderungen der anderen oligodendrozytären Connexine, Cx47 und Cx29, beobachtet (Nagy et al. 2003a). So ist auch für diese Studie denkbar, dass die beobachteten Veränderungen in der Expression z.B. von Cx43 und Cx47 sich durch eine gegenseitige Beeinflussung bedingen.

Nun wird im Weiteren genauer auf die Proteinexpression von Cx43 und Cx47 eingegangen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Cx43-Veränderung zu einer Veränderung von Cx47 führt. Bei den Mäusen mit einer Cx43-Deletion konnte man gleichzeitig eine Reduktion der Cx47-Proteinexpression beobachten. Die Cx47-Reduktion ließ auf einen posttranslationalen Prozess schließen, da die Cx47-mRNA-Expression unverändert blieb. Durch die Cx43-Reduktion sank auch die Cx47-Proteinexpression (Basu and Sarma 2018, May et al. 2013). Die Cx43-Reduktion führte zu einer reduzierten Cx47-Phosphorylierung, was wiederum die verminderte Cx47-Expression bedingte. Die Cx43/Cx47-Gap Junctions spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Kalium- und Nährstoffhomöostase (Basu and Sarma 2018). In den EAE-Tieren beobachteten wir bei einer Reduktion des Cx43-Proteins eine Erhöhung des Cx47-Proteins. Obwohl die gegenseitige Regulation im EAE Modell (diese Arbeit) anders gerichtet war als in den Cx43-defizienten Tieren beschrieben (May et al. 2013), weisen die Ergebnisse beider Studien auf eine wechselseitige Beeinflussung der beiden Proteine bzw. deren Expression hin. Die in dieser Arbeit beobachtete Cx47-

Proteinerhöhung könnte ein kompensatorischer Mechanismus sein, um die reduzierte Cx43-Expression auszugleichen. Schlussendlich sprechen die Daten dieser Arbeit dafür, dass nicht nur ein Connexin allein in der EAE beeinflusst wurde, sondern mehrere Connexine betroffen waren. Auch die auf mRNA-Ebene nachgewiesene Cx47-Expressionminderung könnte somit durch die Cx43-Reduktion bedingt sein. Dies wäre wiederum eine Bestätigung für die gemeinsame Rolle der zwei Connexine. Um zu sehen, ob die Cx43-Veränderung mit der Veränderung des colokalisierten Cx47 zusammenhängt, muss im Weiteren in einer Doppelfärbung betrachtet werden. Hypothetisch lässt sich jedoch vermuten, dass die Störung von Cx43/Cx47 Gap junction die Pathophysiologie der MS fördert und aufgrund der Störung des Ionenhaushalts an der myelinisierten Faser Demyelinisierung begünstigt.

4.6 Connexin-bedingte Erkrankungen

Die Bedeutung der Gap Junction-Proteine für die Funktion des Nervensystems wird insbesondere bei der Betrachtung der mit Connexin-Mutationen bzw. -Deletionen assoziierten Pathologien deutlich. Die Krankheitsbilder beim Menschen (Abrams 2017) lassen sich auch in sogenannten Knock-out-Tieren beobachten, in denen die Deletion bestimmter Connexin-Genen eine Erkrankung mit bestimmten Symptomen zur Folge hat.

So führt eine Cx32-Genmutation beim Menschen zur X-Chromosom-assoziierten Form der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT-X). In der CMT-X kommt es zu Axon- und Myelinveränderungen, die eine progressive periphere Neuropathie verursachen. Die Demyelinisierung der hauptsächlich peripheren Nerven führt zu einer Muskelschwäche und Atrophie der distalen Muskeln. Das entsprechende Tiermodell sind die Cx32-Knock-out-Tiere (Masaki 2015, White and Paul 1999). In den Cx32-defizienten Mäusen sah man jedoch nur eine sehr geringe Beteiligung der peripheren Nerven. Die Leberschädigung mit erhöhter Tumorentstehung stand hier im Vordergrund (Masaki 2015, White and Paul 1999). Ein interessanter Aspekt ist, dass die Cx32-Deletion keine signifikanten zentralnervösen Ausfälle zur Folge hat (Scherer et al. 1998). So wollten Koutsis et al. herausfinden, ob es einen Zusammenhang zwischen der CMT-X und der MS gibt. Über einen Zeitraum von 20 Jahren wurden 70 Patienten mit der CMT-X Erkrankung sowohl klinisch als auch mittels MRT- und Liquordiagnostik untersucht. Bei drei Patienten mit CMT-X Erkrankung wurde auch eine MS festgestellt. Zusätzlich wurden 18 Patienten mit CMT-X Erkrankungen, welche keine zentralneurologischen Symptome aufwiesen, einer MRT-Untersuchung unterzogen. Zwei Patienten hiervon zeigten typische Läsionen, die auf eine fokale Demyelinisierung hinwiesen und 10 Patienten zeigten eine charakteristische Hyperdensität. Diese Erkenntnisse deuteten auf einen Zusammenhang zwischen der CMT und der MS hin (Koutsis et al. 2018). Unser Befund der Regulation der Connexin-Expression in den Nn. optici von EAE-Tieren weist möglicherweise auf eine reziproke Interaktion von

Gap Junction und EAE-Symptomatik hin, in der das Ausmaß der Neuroinflammation die Stellschraube sein könnte.

Eine Cx47-Genmutation führt beim Menschen zur Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung (PMLD). Hier kommt es zu einer Demyelinisierung der weißen Substanz. Die charakteristischen Symptome sind Nystagmus, psychomotorische Retardierung, progressive Spastik und Kleinhirnsymptome. Diese Mutationen konnten im Tiermodell reproduziert werden – allerdings nicht durch die Deletion des Cx47 alleine, denn Mäuse mit einem homozygoten Verlust von Cx47 zeigten keine offensichtlichen Erkrankungsmerkmale und eine nur sehr gering ausgeprägte Pathologie des ZNS. Dahingegen fielen bei Mäusen mit Verlust von zwei oligodendrozytären Connexinen, Cx32 und Cx47, ausgeprägte Veränderungen im ZNS auf: Man sah eine Demyelinisierung, Axondegeneration, Vakuolenbildung und Verlust der Oligodendrozyten (Masaki 2015). Klinisch zeigten diese Tiere Krankheitsmerkmale wie Tremor und tonische Krampfanfälle (Odermatt et al. 2003). Das bedeutet, dass beide Connexine eine wichtige Rolle bei der Myelinisierung und der Aufrechterhaltung der ZNS Homöostase spielen (Masaki 2015). Zudem starben diese Tiere innerhalb von zwei Monaten, durchschnittlich nach 51 Tagen (Odermatt et al. 2003). Durch den Verlust der Connexine traten typische pathologische Merkmale auf, welche man auch in der MS und der EAE sieht (Masaki 2015).

Der Befund dieser Auffälligkeiten nur im ZNS, nicht im PNS (Odermatt et al. 2003), ist durch die fehlende Cx47-Expression in Schwannzellen erklärbar. Masaki et al. (Masaki 2015) und Odermatt et al. (Odermatt et al. 2003) zeigten, dass Connexinverluste zu Erkrankungen führten, die v.a. die Nerven und Myelinscheide betreffen. Papaneophytou et al. untersuchten die Ausprägung der EAE in Mäusen mit einem Verlust von Cx47 und von Cx32. Hierfür wurde die EAE in Cx47-Knock-out-Mäusen sowie in Cx32-Knock-out-Mäusen induziert. Es zeigte sich eine Verstärkung der pathophysiologischen Merkmale der EAE, v.a. bei den Cx47-Knock-out-Mäusen. Es kam zu einer verstärkten Inflammation, Myelinverlust, Mikrogliaaktivierung und Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke. Diese Merkmale waren bei den Cx47-Knock-out-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht (Papaneophytou et al. 2018). Diese Ergebnisse trugen zur Entwicklung unserer Hypothese bei, dass bei der EAE, einer Erkrankung, bei der es zur Demyelinisierung und Axonschädigung kommt, auch eine Veränderung der Connexine auftritt. In der vorliegenden Arbeit konnte tatsächlich in EAE-Mäusen eine mRNA-Reduktion von Cx47 bei gleichzeitigem Anstieg der Cx47-Proteinexpression beobachtet werden. Diese Cx47-mRNA-Reduktion könnte zu den typischen neurologischen Symptomen der EAE beitragen.

Diese Beobachtung machten May et al. auch bei Cx43 und Cx32. In Cx43- und Cx32-Doppel-Knockout-Mäusen kam es zu einem Oligodendrozytenverlust, Astrogliaosis, Aktivierung von Mikroglia und zu einer sekundären Demyelinisierung. Zusätzlich verzeichnete sich eine Reduktion des Cx47-Proteinlevels bei gleichbleibendem mRNA-Level des Cx47 (May et al. 2013). Eine Schlussfolgerung wäre, dass die Veränderung eines von zwei korrespondierenden Connexinen eine Veränderung des Partners bedingt.

Am Beispiel des Cx29 kann aufgezeigt werden, dass ein Connexinverlust zur Beeinträchtigung eines ganzen Sinnesorgans führen kann. Bei Cx29-defizienten Mäusen kam es zu einer verzögerten Entwicklung des Gehörs. Cx29 wird von den Zellen der Cochlea exprimiert und bei Mäusen, denen das Cx29 fehlte, kam es zu einer Demyelinisierung der Axone der Spiralganglion-Neurone. Die klinischen Symptome waren Hörverlust im Hochfrequenzbereich und Lärmempfindlichkeit (Tang et al. 2006).

Auch ein fehlendes Cx43-Gen hat weitreichende Folgen. Das Oculodentodigitale Dysplasie Syndrom (ODDD) beruht auf einer Mutation des Cx43-Gens. Zu den phänotypischen Merkmalen zählen Abnormalitäten im Gesicht, Augen, Zähne, Finger und Zehen. Im ZNS sieht man periventrikuläre Läsionen in der weißen Substanz und es kommt zu Spastiken (Masaki 2015). Ein homozygoter Verlust des Cx43-Gens bei Mäusen führt fast immer zum Tod des Embryos bei Geburt aufgrund einer Herzmalformation (Dermietzel et al. 2000, Reaume et al. 1995).

Die Astrozyten bilden untereinander und mit den Oligodendrozyten Gap Junctions aus. In Knock-out-Mäusen, in denen ein Allel von entweder Cx43 oder Cx30 noch vorhanden ist, fand man keine Pathologien. Dahingegen sah man in Doppel-Knock-out-Mäusen, denen Cx43 und Cx30 fehlte, pathologische Veränderungen. Es kam zu einer Vakuolisierung, Ödembildung und Verlust sowohl von Astrozyten als auch von Oligodendrozyten. Die Mäuse entwickelten klinisch ein sensomotorisches Defizit und eine Beeinträchtigung ihres räumlichen Gedächtnisses (Lutz et al. 2009). In den EAE-Mäusen konnte in dieser Arbeit eine Cx43-Proteinreduktion beobachtet werden. Diese Reduktion könnte ebenfalls zu den klinischen Symptomen der Erkrankung beitragen.

In mehreren oben genannten Studien konnte gezeigt werden, dass das Fehlen eines oder mehrerer Connexine zu einer Erkrankung führt. Bei diesen Erkrankungen fand man häufig eine Demyelinisierung und eine Axonschädigung. Dies sind auch die typischen Merkmale der MS und der EAE. Nun stellt sich die Frage, ob die Ursache oder Beteiligung am Voranschreiten der Erkrankung der EAE auch im Verlust oder der Veränderung eines oder mehrerer Connexine bedingt ist.

Umgekehrt verursachten auch die neurodegenerativen Erkrankungen wie MS und NMO eine Veränderung der Connexin-Expression (Masaki et al. 2013). Bei Masaki et al. konnte eine Cx43-Reduktion in menschlichem Autopsiegewebe, Gehirn, Rückenmark und N. opticus, bei MS und NMO Patienten festgestellt werden. Dabei ging der Cx43-Verlust signifikant mit einem schnelleren und stärkeren Voranschreiten der Erkrankungen einher (Masaki et al. 2013). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der EAE eine Cx43-Reduktion. Die Ergebnisse von Markoullis et al. beobachteten ebenfalls eine Veränderung der Connexin-Expression durch die Inflammation bei der MS. Hierzu wurde menschliches Autopsiegewebe, Gehirn, untersucht. Läsionsorte wiesen eine signifikante Reduktion von Cx32 und Cx47 auf (Markoullis et al. 2012b). Des Weiteren konnte Markoullis et al. auch bei der rMOG-induzierten EAE in C57BL/6 Mäusen eine durch die inflammatorische Demyelinisierung verursachte Connexin-Expressionsänderung detektieren. In der akuten Phase der EAE (Tag 14 nach EAE-Induktion) wurde eine Reduktion der mRNA- und

Proteinexpression der oligodendrozytären Connexine Cx47 und Cx32 festgestellt (mit Ausnahme der Cx32-mRNA-Expression) (Markoullis et al. 2012a).

In drei Arbeiten von Markoullis et al. konnte ein Cx43-Anstieg beobachtet werden (Markoullis et al. 2012a, Markoullis et al. 2014, Markoullis et al. 2012b). Dieser Cx43-Anstieg ging vermutlich mit einer Astrogliose einher, da bei Markoullis et al. in der frühen Phase der EAE (Tag 14 und Tag 28 nach EAE Induktion) zunächst eine Cx43-Reduktion detektiert wurde und erst später (Tag 50 nach EAE Induktion) zusammen mit einem Astrozytenanstieg eine Cx43-Erhöhung beobachtet wurde (Markoullis et al. 2012a). Markoullis et al. betrachteten Läsionen von menschlichem Autopsiegewebe, i.e. des Gehirns, von MS Patienten. Diese Läsionen wiesen eine Inflammation mit Mikrogliaaktivierung und Astrogliose auf, welche mit einem Cx43 und Cx30 Anstieg einhergingen (Markoullis et al. 2014).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmten mit den Beobachtungen von Markoullis et al. (Markoullis et al. 2012a) bei Cx47 überein, die Cx47-mRNA-Expression war hier vermindert. Hingegen stimmten die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Markoullis et al. (Markoullis et al. 2012a, Markoullis et al. 2014, Markoullis et al. 2012b) hinsichtlich der Cx43-Expression nicht vollständig überein, da in der vorliegenden Arbeit eine Verminderung der Cx43-Proteinexpression zu sehen war. Das könnte darauf hindeuten, dass sich die Cx43-Expression in unterschiedlichen Erkrankungsstadien unterschiedlich verhält, und die Expression in dieser Arbeit zu einem früheren Erkrankungszeitpunkt erfasst wurde. Markoullis et al. (Markoullis et al. 2012a) beschrieb ebenfalls eine Cx43-Reduktion in der frühen Erkrankungsphase. Die Erkenntnis, dass es durch infektiöse und inflammatorische Auslöser zur einer Cx43-Reduktion kam, konnte durch Basu und Sarma et al. gefestigt werden (Basu and Sarma 2018).

Cx43 und Cx47 bilden eine der wichtigsten Verbindungen zwischen den Astrozyten und Oligodendrozyten. Ein bei der MS und EAE auftretender Verlust der Cx43-Cx47 Gap Junctions führte zu einer Ausbreitung der Läsionen (Basu and Sarma 2018). Ein Verlust von Cx47 in Cx47-Knock-out-Mäusen verstärkte die EAE. Das resultierte klinisch in einer früheren und stärkeren Ausprägung. Des weiteren kam es zu einem signifikanten Anstieg des Myelinverlustes, der Apoptose von Oligodendrozyten, der Inflammation und der Mikrogliaaktivierung sowie der Durchlässigkeit der Blut-Rückenmarks-Barriere (Papaneophytou C. P. et al. 2018). Die durch die EAE bedingten Connexin-Veränderungen könnten durch inflammatorische Zellen, Mikrogliaaktivierung und Immunzellen vermittelt sein.

Anhand der vielen oben aufgeführten Literaturergebnisse stellt sich nun die Frage, ob die Connexin-Veränderung hauptsächlich durch die Erkrankung verursacht wird oder ursächlich zur EAE-Symptomatik beitragen. Ob eine oder beide Thesen eine Bedeutung haben ist noch nicht eindeutig festzulegen. Die Daten in der hier vorliegenden Arbeit zeigen jedoch eindeutig, dass eine EAE mit Veränderungen neuraler Connexin-Expression im N. opticus einhergeht.

4.7 Fazit

Die MS ist eine demyelinisierende Erkrankung, die bevorzugt die Myelinscheide der Oligodendrozyten betrifft (Stadelmann et al. 2011). Die EAE, ein Tiermodell der MS, weist viele der typischen pathophysiologischen Merkmale der MS auf (Diem et al. 2007). Bei der EAE sieht man Expressionsänderungen der Connexine im N. opticus, eines der am frühesten betroffenen Gewebe der Erkrankung. Es konnten anhand der anti-CD3-Immunfluoreszenz und LFB-Färbung Läsionen mit T-Zell-Infiltration und Demyelinisierung detektiert werden. Man sah in der Phase der Demyelinisierung im N. opticus der EAE-Mäuse eine Cx43-Proteinreduktion. Die Veränderung des Cx43 scheint eine von mehreren Veränderungen zu sein, die zum Erkrankungsverlauf beitragen und ihn aufrechterhalten.

Das zweite Connexin, welches eine Veränderung im N. opticus zeigte, war das Cx47. Man sah eine Erhöhung der Cx47-Proteinexpression in der Phase der Demyelinisierung, die mit verminderter Genexpression einherging. Die Expressionsveränderungen von Cx43 und Cx47 konnte nun erstmals für den N. opticus gezeigt werden.

Auf mRNA-Ebene konnten wir eine Abnahme des oligodendrozytären Cx29 und des neuronalen Cx36 nachweisen. Diese Reduktion zeigte sich bei Cx29 ausschließlich auf mRNA-Ebene. Die Proteinexpression des Cx29 blieb unverändert. Bei Cx36 wurde nur die mRNA-Expression untersucht. Somit konnte in dieser Arbeit eine Veränderung sowohl oligodendrozytärer als auch der astrozytärer Connexine beobachtet werden. Dies zeigt, dass im Nervensystem die Gliazellfunktionen aneinander gekoppelt und voneinander abhängig sind und die Gliazellen ein zusammenhängendes System bilden. Zur Aufrechterhaltung der Funktionen des Nervensystems werden neben den Neuronen alle Gliazellarten benötigt. Daher könnte ein Zusammenhang zwischen den astrozytären und oligodendrozytären Connexinen bestehen. Die Änderung eines Connexins könnte ein weiteres beeinflussen, was in weiteren Versuchen mit Doppelfärbungen näher beleuchtet werden müsste. Ein weiterer Aspekt für zukünftige Studien wäre, ob die Connexin-Expressionsänderung eine Folge oder Ursache des Gliazellfunktionsverlustes ist.

5 Literaturverzeichnis

- Aasen T, Johnstone S, Vidal-Brime L, Lynn KS, Koval M. 2018. Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 19.
- Abrams CK. 2017. Diseases of connexins expressed in myelinating glia. *Neurosci Lett*.
- Abrams CK, Scherer SS. 2012. Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2030-2047.
- Akopian A, Kumar S, Ramakrishnan H, Roy K, Viswanathan S, Bloomfield SA. 2017. Targeting neuronal gap junctions in mouse retina offers neuroprotection in glaucoma. *J Clin Invest* 127: 2647-2661.
- Altevogt BM, Paul DL. 2004. Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *J Neurosci* 24: 4313-4323.
- Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL. 2002. Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 22: 6458-6470.
- Asavapanumas N, Ratelade J, Papadopoulos MC, Bennett JL, Levin MH, Verkman AS. 2014. Experimental mouse model of optic neuritis with inflammatory demyelination produced by passive transfer of neuromyelitis optica-immunoglobulin G. *J Neuroinflammation* 11: 16.
- Ayers MM, Hazelwood LJ, Catmull DV, Wang D, McKormack Q, Bernard CC, Orian JM. 2004. Early glial responses in murine models of multiple sclerosis. *Neurochem Int* 45: 409-419.
- Balcer LJ. 2006. Clinical practice. Optic neuritis. *N Engl J Med* 354: 1273-1280.
- Basu R, Sarma JD. 2018. Connexin 43/47 channels are important for astrocyte/oligodendrocyte cross-talk in myelination and demyelination. *J Biosci* 43: 1055-1068.
- Bautista W, McCrea DA, Nagy JJ. 2014. Connexin36 identified at morphologically mixed chemical/electrical synapses on trigeminal motoneurons and at primary afferent terminals on spinal cord neurons in adult mouse and rat. *Neuroscience* 263: 159-180.
- Belousov AB, Fontes JD. 2013. Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury. *Trends Neurosci* 36: 227-236.
- Belousov AB, Fontes JD, Freitas-Andrade M, Naus CC. 2017. Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease. *BMC Cell Biol* 18: 4.
- Beyer EC, Berthoud VM. 2018. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 5-8.
- Bhat R, Steinman L. 2009. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. *Neuron* 64: 123-132.
- Brand-Schieber E, Werner P, Iacobas DA, Iacobas S, Beelitz M, Lowery SL, Spray DC, Scemes E. 2005. Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 80: 798-808.
- Chaboub LS, Deneen B. 2013. Astrocyte form and function in the developing central nervous system. *Semin Pediatr Neurol* 20: 230-235.
- Chastain EM, Duncan DS, Rodgers JM, Miller SD. 2011. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1812: 265-274.
- Chu M, Novak SM, Cover C, Wang AA, Chinyere IR, Juneman EB, Zarnescu DC, Wong PK, Gregorio CC. 2018. Increased Cardiac Arrhythmogenesis Associated With Gap Junction Remodeling With Upregulation of RNA-Binding Protein FXR1. *Circulation* 137: 605-618.
- Clarkson BD, Walker A, Harris M, Rayasam A, Sandor M, Fabry Z. 2014. Mapping the accumulation of co-infiltrating CNS dendritic cells and encephalitogenic T cells during EAE. *J Neuroimmunol* 277: 39-49.

- Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato Salinaro A, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F. 1998. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10: 1202-1208.
- Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 164: 1079-1106.
- Costa CJ, Willis DE. 2018. To the end of the line: Axonal mRNA transport and local translation in health and neurodegenerative disease. *Dev Neurobiol* 78: 209-220.
- Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Shin ML, Rus H. 2006. Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *J Rehabil Res Dev* 43: 123-132.
- Danesh-Sani SA, Rahimdoost A, Soltani M, Ghiyasi M, Haghdoost N, Sabzali-Zanjankhah S. 2013. Clinical assessment of orofacial manifestations in 500 patients with multiple sclerosis. *J Oral Maxillofac Surg* 71: 290-294.
- de Hoz L, Simons M. 2015. The emerging functions of oligodendrocytes in regulating neuronal network behaviour. *Bioessays* 37: 60-69.
- Degen J, Meier C, Van Der Giessen RS, Sohl G, Petrasch-Parwez E, Urschel S, Dermietzel R, Schilling K, De Zeeuw CI, Willecke K. 2004. Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin36 in transgenic mice. *J Comp Neurol* 473: 511-525.
- Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV, Spray DC. 2000. Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 45-56.
- Diem R, Sattler MB, Bahr M. 2007. Neurodegeneration and -protection in autoimmune CNS inflammation. *J Neuroimmunol* 184: 27-36.
- Doronin VB, et al. 2016. Changes in different parameters, lymphocyte proliferation and hematopoietic progenitor colony formation in EAE mice treated with myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Cell Mol Med* 20: 81-94.
- Duffy HS, John GR, Lee SC, Brosnan CF, Spray DC. 2000. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *J Neurosci* 20: RC114.
- Emery B. 2010. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330: 779-782.
- Fairless R, Williams SK, Diem R. 2014. Dysfunction of neuronal calcium signalling in neuroinflammation and neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 357: 455-462.
- Fairless R, Williams SK, Hoffmann DB, Stojic A, Hochmeister S, Schmitz F, Storch MK, Diem R. 2012. Preclinical retinal neurodegeneration in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 32: 5585-5597.
- Fang M, Yamasaki R, Li G, Masaki K, Yamaguchi H, Fujita A, Isobe N, Kira JI. 2018. Connexin 30 Deficiency Attenuates Chronic but Not Acute Phases of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Through Induction of Neuroprotective Microglia. *Front Immunol* 9: 2588.
- Faustmann PM, Haase CG, Romberg S, Hinkerohe D, Szlachta D, Smikalla D, Krause D, Dermietzel R. 2003. Microglia activation influences dye coupling and Cx43 expression of the astrocytic network. *Glia* 42: 101-108.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3): 393-399.
- Fontes JD, Ramsey J, Polk JM, Koop A, Denisova JV, Belousov AB. 2015. Death of Neurons following Injury Requires Conductive Neuronal Gap Junction Channels but Not a Specific Connexin. *PLoS One* 10: e0125395.
- Friese MA, Fugger L. 2009. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 66: 132-141.

- Fuhrmann S. 2010. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* 93: 61-84.
- Geenen V, Kecha O, Brilot F, Hansenne I, Renard C, Martens H. 2001. Thymic T-cell tolerance of neuroendocrine functions: physiology and pathophysiology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47: 179-188.
- Gielen E, Baron W, Vandeven M, Steels P, Hoekstra D, Ameloot M. 2006. Rafts in oligodendrocytes: evidence and structure-function relationship. *Glia* 54: 499-512.
- Giepmans BN. 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62: 233-245.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65: 475-502.
- Greene ND, Copp AJ. 2009. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenat Diagn* 29: 303-311.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B. 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11: 328-334.
- Harada T, Harada C, Parada LF. 2007. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev* 21: 367-378.
- Hartfield EM, Rinaldi F, Glover CP, Wong LF, Caldwell MA, Uney JB. 2011. Connexin 36 expression regulates neuronal differentiation from neural progenitor cells. *PLoS One* 6: e14746.
- Hoffmann DB, Williams SK, Bojcevski J, Muller A, Stadelmann C, Naidoo V, Bahr BA, Diem R, Fairless R. 2013. Calcium influx and calpain activation mediate preclinical retinal neurodegeneration in autoimmune optic neuritis. *J Neuropathol Exp Neurol* 72: 745-757.
- Hormuzdi SG, Pais I, LeBeau FE, Towers SK, Rozov A, Buhl EH, Whittington MA, Monyer H. 2001. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* 31: 487-495.
- Horstmann L, Schmid H, Heinen AP, Kurschus FC, Dick HB, Joachim SC. 2013. Inflammatory demyelination induces glia alterations and ganglion cell loss in the retina of an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Neuroinflammation* 10: 120.
- Hunter SF. 2016. Overview and diagnosis of multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 22: s141-150.
- Jacob A, McKeon A, Nakashima I, Sato DK, Elson L, Fujihara K, de Seze J. 2013. Current concept of neuromyelitis optica (NMO) and NMO spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 922-930.
- Jovanova-Nesic K, Koruga D, Kojic D, Kostic V, Rakic L, Shoenfeld Y. 2009. Choroid plexus connexin 43 expression and gap junction flexibility are associated with clinical features of acute EAE. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 75-82.
- Kamasawa N, Sik A, Morita M, Yasumura T, Davidson KG, Nagy JI, Rash JE. 2005. Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience* 136: 65-86.
- Kezuka T, Usui Y, Goto H. 2011. Analysis of the pathogenesis of experimental autoimmune optic neuritis. *J Biomed Biotechnol* 2011: 294046.
- Kielian T. 2008. Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J Neurochem* 106: 1000-1016.
- Kim ST, Takeuchi K, Sun ZY, Touma M, Castro CE, Fahmy A, Lang MJ, Wagner G, Reinherz EL. 2009. The alphabeta T cell receptor is an anisotropic mechanosensor. *J Biol Chem* 284: 31028-31037.
- Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. 2017. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol* 27: 123-137.

- Kleopa KA, Orthmann JL, Enriquez A, Paul DL, Scherer SS. 2004. Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes. *Glia* 47: 346-357.
- Klotz L, Gold R, Hemmer B, Korn T, Zipp F, Hohlfeld R, Kieseier BC, Wiendl H. 2011. [Diagnosis of multiple sclerosis 2010 revision of the McDonald criteria]. *Nervenarzt* 82: 1302-1309.
- Koutsis G, et al. 2018. X linked Charcot-Marie-Tooth disease and multiple sclerosis: emerging evidence for an association. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Kuhlmann T. 2013. Relapsing-remitting and primary progressive MS have the same cause(s)-the neuropathologist's view: 2. *Mult Scler* 19: 268-269.
- Lana-Peixoto MA, Talim N. 2019. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Anti-MOG Syndromes. *Biomedicines* 7.
- Li X, Lynn BD, Olson C, Meier C, Davidson KG, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI. 2002. Connexin29 expression, immunocytochemistry and freeze-fracture replica immunogold labelling (FRIL) in sciatic nerve. *Eur J Neurosci* 16: 795-806.
- Liu WJ, Yang J. 2015. Preferentially regulated expression of connexin 43 in the developing spiral ganglion neurons and afferent terminals in post-natal rat cochlea. *Eur J Histochem* 59: 2464.
- Lucchinetti CF, et al. 2002. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125: 1450-1461.
- Lutz SE, Zhao Y, Gulinello M, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF. 2009. Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation. *J Neurosci* 29: 7743-7752.
- Mansour H, McColm JR, Cole L, Weible M, 2nd, Korlimbinis A, Chan-Ling T. 2013. Connexin 30 expression and frequency of connexin heterogeneity in astrocyte gap junction plaques increase with age in the rat retina. *PLoS One* 8: e57038.
- Markoullis K, Sargiannidou I, Gardner C, Hadjisavvas A, Reynolds R, Kleopa KA. 2012a. Disruption of oligodendrocyte gap junctions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 60: 1053-1066.
- Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N, Roncaroli F, Reynolds R, Kleopa KA. 2014. Oligodendrocyte gap junction loss and disconnection from reactive astrocytes in multiple sclerosis gray matter. *J Neuropathol Exp Neurol* 73: 865-879.
- Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N, Hadjisavvas A, Roncaroli F, Reynolds R, Kleopa KA. 2012b. Gap junction pathology in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol* 123: 873-886.
- Marques IB, Matias F, Silva ED, Cunha L, Sousa L. 2014. Risk of multiple sclerosis after optic neuritis in patients with normal baseline brain MRI. *J Clin Neurosci* 21: 583-586.
- Masaki K. 2015. Early disruption of glial communication via connexin gap junction in multiple sclerosis, Balo's disease and neuromyelitis optica. *Neuropathology* 35: 469-480.
- Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J. 2013. Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *PLoS One* 8: e72919.
- Maxeiner S, et al. 2005. Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between AII amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J Neurosci* 25: 566-576.
- May D, Tress O, Seifert G, Willecke K. 2013. Connexin47 protein phosphorylation and stability in oligodendrocytes depend on expression of Connexin43 protein in astrocytes. *J Neurosci* 33: 7985-7996.
- Meier C, Dermietzel R, Davidson KG, Yasumura T, Rash JE. 2004. Connexin32-containing gap junctions in Schwann cells at the internodal zone of partial myelin compaction and in Schmidt-Lanterman incisures. *J Neurosci* 24: 3186-3198.

- Meier C, Petrasch-Parwez E, Habbes HW, Teubner B, Guldenagel M, Degen J, Sohl G, Willecke K, Dermietzel R. 2002. Immunohistochemical detection of the neuronal connexin36 in the mouse central nervous system in comparison to connexin36-deficient tissues. *Histochem Cell Biol* 117: 461-471.
- Melcon MO, Correale J, Melcon CM. 2014. Is it time for a new global classification of multiple sclerosis? *J Neurol Sci* 344: 171-181.
- Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL. 2003. Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J Neurosci* 23: 5963-5973.
- Milo R, Miller A. 2014. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 13: 518-524.
- Nagy JI, Rash JE. 2003. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Commun Adhes* 10: 401-406.
- Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE. 2003a. Connexin29 and connexin32 at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions and in myelin of the mouse central nervous system. *J Comp Neurol* 464: 356-370.
- . 2003b. Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia* 44: 205-218.
- Nagy JI, Lynn BD, Tress O, Willecke K, Rash JE. 2011. Connexin26 expression in brain parenchymal cells demonstrated by targeted connexin ablation in transgenic mice. *Eur J Neurosci* 34: 263-271.
- Nagy JI, Li X, Rempel J, Stelmack G, Patel D, Staines WA, Yasumura T, Rash JE. 2001. Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J Comp Neurol* 441: 302-323.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343: 938-952.
- Nualart-Marti A, Solsona C, Fields RD. 2013. Gap junction communication in myelinating glia. *Biochim Biophys Acta* 1828: 69-78.
- Odermatt B, et al. 2003. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J Neurosci* 23: 4549-4559.
- Ortolano S, Di Pasquale G, Crispino G, Anselmi F, Mammano F, Chiorini JA. 2008. Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and functional level in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18776-18781.
- Papaneophytou C, Georgiou E, Kleopa KA. 2019. The role of oligodendrocyte gap junctions in neuroinflammation. *Channels (Austin)* 13: 247-263.
- Papaneophytou CP, Georgiou E, Karaiskos C, Sargiannidou I, Markoullis K, Freidin MM, Abrams CK, Kleopa KA. 2018. Regulatory role of oligodendrocyte gap junctions in inflammatory demyelination. *Glia*.
- Parenti R, Cicirata F, Zappala A, Catania A, La Delia F, Cicirata V, Tress O, Willecke K. 2010. Dynamic expression of Cx47 in mouse brain development and in the cuprizone model of myelin plasticity. *Glia* 58: 1594-1609.
- Pau D, Al Zubidi N, Yalamanchili S, Plant GT, Lee AG. 2011. Optic neuritis. *Eye (Lond)* 25: 833-842.
- Petzold A, et al. 2014. The investigation of acute optic neuritis: a review and proposed protocol. *Nat Rev Neurol* 10: 447-458.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Platten M, Lanz T, Bendszus M, Diem R. 2013. [Clinically isolated syndrome]. *Nervenarzt* 84: 1247-1259.

- Prost G, Bernier-Valentin F, Munari-Silem Y, Selmi-Ruby S, Rousset B. 2008. Connexin-32 acts as a downregulator of growth of thyroid gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E291-299.
- Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI. 2001a. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci* 21: 1983-2000.
- Rash JE, Yasumura T, Davidson KG, Furman CS, Dudek FE, Nagy JI. 2001b. Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun Adhes* 8: 315-320.
- Rash JE, Vanderpool KG, Yasumura T, Hickman J, Beatty JT, Nagy JI. 2016. KV1 channels identified in rodent myelinated axons, linked to Cx29 in innermost myelin: support for electrically active myelin in mammalian saltatory conduction. *J Neurophysiol* 115: 1836-1859.
- Raslan A, Hainz N, Beckmann A, Tschernig T, Meier C. 2016. Pannexin-1 expression in developing mouse nervous system: new evidence for expression in sensory ganglia. *Cell Tissue Res* 364: 29-41.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831-1834.
- Roscoe WA, Kidder GM, Karlik SJ. 2007a. Experimental allergic encephalomyelitis in connexin 43-heterozygous mice. *Cell Commun Adhes* 14: 57-73.
- Roscoe WA, Messersmith E, Meyer-Franke A, Wipke B, Karlik SJ. 2007b. Connexin 43 gap junction proteins are up-regulated in remyelinating spinal cord. *J Neurosci Res* 85: 945-953.
- Rubio ME, Nagy JI. 2015. Connexin36 expression in major centers of the auditory system in the CNS of mouse and rat: Evidence for neurons forming purely electrical synapses and morphologically mixed synapses. *Neuroscience* 303: 604-629.
- Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24: 419-466.
- Schafer DP, Stevens B. 2015. Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020545.
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL. 1995. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 15: 8281-8294.
- Scherer SS, Xu YT, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ. 1998. Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia* 24: 8-20.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
- Schubert T, Degen J, Willecke K, Hormuzdi SG, Monyer H, Weiler R. 2005. Connexin36 mediates gap junctional coupling of alpha-ganglion cells in mouse retina. *J Comp Neurol* 485: 191-201.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haesslein LJ. 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 106-107: 1-16.
- Sinn R, Wittbrodt J. 2013. An eye on eye development. *Mech Dev* 130: 347-358.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.
- Sohl G, Willecke K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232.
- Sohl G, Maxeiner S, Willecke K. 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6: 191-200.
- Solan JL, Lampe PD. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419: 261-272.

- . 2018. Spatio-temporal regulation of connexin43 phosphorylation and gap junction dynamics. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 83-90.
- Sonobe Y, Jin S, Wang J, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. 2007. Chronological changes of CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. *Tohoku J Exp Med* 213: 329-339.
- Sosinsky GE. 1996. Molecular organization of gap junction membrane channels. *J Bioenerg Biomembr* 28: 297-309.
- Stadelmann C, Wegner C, Bruck W. 2011. Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta* 1812: 275-282.
- Swayne LA, Bennett SA. 2016. Connexins and pannexins in neuronal development and adult neurogenesis. *BMC Cell Biol* 17 Suppl 1: 10.
- Tang W, Zhang Y, Chang Q, Ahmad S, Dahlke I, Yi H, Chen P, Paul DL, Lin X. 2006. Connexin29 is highly expressed in cochlear Schwann cells, and it is required for the normal development and function of the auditory nerve of mice. *J Neurosci* 26: 1991-1999.
- Thompson AJ, et al. 2018. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17: 162-173.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338: 278-285.
- Valdebenito S, Barreto A, Eugenin EA. 2018. The role of connexin and pannexin containing channels in the innate and acquired immune response. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 154-165.
- van der Star BJ, Vogel DY, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S. 2012. In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11: 570-588.
- Vaughn JE. 1969. An electron microscopic analysis of gliogenesis in rat optic nerves. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 94: 293-324.
- Voet S, Prinz M, van Loo G. 2019. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol Med* 25: 112-123.
- Wang D, Ayers MM, Catmull DV, Hazelwood LJ, Bernard CC, Orian JM. 2005. Astrocyte-associated axonal damage in pre-onset stages of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 51: 235-240.
- White TW, Paul DL. 1999. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu Rev Physiol* 61: 283-310.
- Willebrords J, Crespo Yanguas S, Maes M, Decrock E, Wang N, Leybaert L, Kwak BR, Green CR, Cogliati B, Vinken M. 2016. Connexins and their channels in inflammation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 51: 413-439.
- Williams SK, Fairless R, Weise J, Kalinke U, Schulz-Schaeffer W, Diem R. 2011. Neuroprotective effects of the cellular prion protein in autoimmune optic neuritis. *Am J Pathol* 178: 2823-2831.
- Williams SK, et al. 2014. Antibody-mediated inhibition of TNFR1 attenuates disease in a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One* 9: e90117.
- Wingerchuk DM. 2011. Environmental factors in multiple sclerosis: Epstein-Barr virus, vitamin D, and cigarette smoking. *Mt Sinai J Med* 78: 221-230.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
- Zola H. 2001. Human leukocyte differentiation antigens as therapeutic targets: the CD molecules and CD antibodies. *Expert Opin Biol Ther* 1: 375-383.

6 Danksagung

Nun möchte ich mich bei allen bedanken die mich während der ganzen Zeit begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Carola Meier für die Bereitschaft bedanken meine Doktorarbeit zu betreuen und für die Ausarbeitung des Themas. Ihrer intensiven fachlichen Betreuung, den fundierten Anregungen und der umfassenden Begleitung und Unterstützung durch die gesamte Zeit gebührt mein großer Dank.

Frau Prof. Dr. Ricarda Diem und Frau Dr. Sarah Williams und Frau Dr. Nadine Hainz danke ich für die Durchführung und Bereitstellung der Tierexperimentellen Arbeit und die Gewebeaufarbeitung. Frau Dr. Barbara Schäfer danke ich für die Gewebeaufarbeitung.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig für die konstruktiven Anregungen bedanken.

Mein Dank gilt der gesamten Abteilung von Frau Prof. Dr. Carola Meier. Besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Nadine Hainz und Frau Dr. Anja Beckmann für die nette Zusammenarbeit und dafür, dass sie mir während meiner gesamten Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen, mir immer mit fachlichen Ratschlägen weiterhalfen und mich in die verschiedenen Arbeitsschritte eingelernt haben.

Ein weiteres Dankeschön geht an Frau Dr. Sandra Wolf für die Unterstützung und Einarbeitung in die verschiedenen Programme der Bildbearbeitung und Auswertung sowie in die Einführung in die Laborarbeit.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Alexander Grißmer, Frau Alina Mattheis, Frau Franziska Müller sowie Frau Belinda König für die Unterstützung bei der Laborarbeit bedanken. Frau Andrea Rabung danke ich für die Durchführung der qRT-PCR. Abschließend sind dankend alle derzeitigen Mitarbeiter und ehemaligen Mitarbeiter zu nennen: Frau Ingrid Lang, Frau Dagmar Wright, Frau Jessica Kilper und Jennifer Heinz möchte ich für die helfenden Hände sowie Tipps im Laboralltag danken.

Ein großes Dankeschön an die gesamte Abteilung für das nette und freundliche Klima während der Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich die ganze Zeit hindurch begleitet und mich immer unterstützt und ermutigt haben. Nicht zu vergessen ist mein Verlobter Michael Barthels. Ihm ein besonders großes Dankeschön für den Halt und die Geduld mit mir. Auch meinen Freunden die mich immer begleiten ein Dankeschön. Ohne die Unterstützung der Freunde und der Familie wäre die Erstellung der Arbeit nicht möglich gewesen.