

Aus dem Zentrum für Neurologie und Psychiatrie
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

Kinesin-5-Inhibition verbessert die Neuroregeneration in der experimentellen autoimmunen Neuritis

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der ärztlichen Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Robin Ackfeld
aus Paderborn

promoviert am 28. März 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Druckjahr 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Professorin Dr. med. C. Lehmann

2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. N. Kononenko

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen:

Herr Felix Kohle: Hilfe bei der Planung und Auswertung der Experimente. Durchführung der Erstellung der Grafiken.

Herr Barham Mohammed (DVM, MSc. PhD.): Durchführung und Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder im Rahmen der Mitochondrien/Faser-Morphologie.

Herr David Vilchez: Durchführung und Auswertung der Zellkultur-Versuche.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Felix Kohle zusammen mit mir selbst ausgeführt worden.

Die Betreuung und Messung der Versuchstiere sowie die Operationen an den Versuchstieren und die Aufarbeitung des Ischiadicus-Nervs wurden gemeinsam mit Herrn Felix Kohle durchgeführt. Hierunter fallen das tägliche Wiegen, tägliche Scoring sowie die elektrophysiologischen Messungen an Tag 0, 18 und 30.

Die Erstellung der Schnitte am Gefriermikrotom wurde nach Anleitung von mir durchgeführt. Die Färbung der jeweiligen Schnitte mit den verschiedenen Antikörpern wurde nach Anleitung von mir durchgeführt.

Die Durchführung der elektronenmikroskopischen Bilder der Mitochondrien und Fasern sowie die Auswertung erfolgte durch Barham Mohammed.

Die Durchführung der Zellkulturen sowie die Färbung der Neurone erfolgte im Rahmen einer Kooperation durch David Vildez.

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der statistischen Grafiken mit GraphPad erfolgte durch Felix Kohle und mir.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 20.10.2024

Unterschrift: 

Danksagung

Zu Beginn meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Helmar Lehmann danken. Seit Beginn meiner wissenschaftlichen Laufbahn in der Vorklinik konnte ich auf seine Unterstützung in der Planung, Umsetzung und Durchführung der wissenschaftlichen Experimente zählen. Durch ihn entdeckte ich mein Interesse an die Wissenschaft sowie an die Neurologie.

Als zweites möchte ich Herrn Dr. Felix Kohle für seine kontinuierliche Begleitung von Beginn bis Abschluss dieser Arbeit danken. Ohne seine fordernde und fördernde Art wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch den ehemaligen Mitgliedern der AG Neuroinflammation und Neuromuskuläre Erkrankungen danken, die mich zusammen mit Felix Kohle in die wissenschaftliche Arbeit und deren Methoden eingearbeitet haben. Sie standen zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

Dank gilt auch meinen Freunden Felix, Maximilian, Meike, Jorin, Franziska, Julia und Janina. Ohne ihre Unterstützung und motivierenden Worte wäre diese Arbeit nicht bis zu ihrem Ende gekommen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Renate und Wilfried sowie meinen Geschwistern Daniel und Theresa danke. Auf eure Unterstützung konnte ich immer zählen.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	12
2.1. Guillain-Barré-Syndrom	12
2.1.1. Geschichtlicher Hintergrund	12
2.1.2. Epidemiologie	12
2.1.3. Symptome	12
2.1.4. Phänotypen	13
2.1.5. Pathogenese	14
2.1.6. Diagnose	15
2.1.7. Prognose	16
2.1.8. Therapie	16
2.2. Experimentelle autoimmune Neuritis (EAN)	17
2.2.1. Einleitung	17
2.2.2. Induktion	17
2.2.3. Zelluläre Mechanismen	17
2.3. Medikamente	18
2.3.1. Monastrol	18
2.3.2. 2,4-Dinitrophenol (DNP)	19
2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Material	22

3.1.1.	Verbrauchsmaterialien	22
3.1.2.	Geräte	22
3.1.3.	Chemikalien und Anästhetika	23
3.1.4.	Verwendete Lösungen	23
3.1.5.	Primärantikörper	24
3.1.6.	Sekundärantikörper	25
3.2.	Methoden	26
3.2.1.	Induktion der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN)	26
3.2.2.	Klinischer Score	26
3.2.3.	Elektrophysiologische Untersuchung	27
3.2.4.	Behandlung mit Monastrol	28
3.2.5.	Behandlung mit 2,4-Dinitrophenol	28
3.2.6.	Transkardiale Perfusion	29
3.2.7.	Gefriermikrotom	29
3.2.8.	Immunhistochemie	29
3.2.9.	Transmissionselektronenmikroskopie	30
3.2.10.	Färbung des neuromuskulären Endplatte	30
3.2.11.	Verhältnis zwischen roten und weißen Blutkörperchen	31
3.2.12.	Statistische Untersuchung	31
4.	ERGEBNISSE	32
4.1.	Neuroregenerative Effekte von Kinesin-5-Inhibition in der EAN	32
4.1.1.	Monastrol verbessert die funktionelle Erholung	32
4.1.2.	Die Behandlung mit Monastrol führt zu einer stärkeren Erholung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit	33
4.1.3.	Kinesin-5 Inhibition verstärkt die Remyelinisierung und verringert die T-Zellinfiltration	35
4.1.4.	Kinesin-5-Inhibition verstärkt die Reinnervation von NMJs in der Erholungsphase der EAN	42

4.1.5.	Monastrol führt zu keiner Veränderung der Myeloproliferation	43
4.1.6.	Neuroregenerative Effekte von 2,4-DNP in der EAN 2,4-DNP hat keinen Einfluss auf die funktionelle Erholung in der EAN	44
4.1.7.	2,4-DNP-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Erholung der Nervenleitgeschwindigkeit und des Muskelaktionspotentials	45
4.1.8.	2,4-DNP als mitochondrialer Entkoppler induzierte ultrastrukturelle Veränderungen der myelinisierten und nicht-myelinisierten Nervenfasern und ihrer Mitochondrien	47
4.1.9.	2,4-DNP führt zu keiner Veränderung der histologischen Inflammation	51
4.1.10.	2,4-DNP hat keine Auswirkung auf die Remyelinisierung, induziert jedoch eine erhöhten BDNF-Expression	53
5.	DISKUSSION	56
5.1.	Therapeutische Wirkung von Monastrol	57
5.1.1.	Therapeutische Wirkung von 2,4-DNP	60
5.2.	Abbildungsverzeichnis	64
5.3.	Tabellenverzeichnis	66
6.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	67
7.	LITERATURVERZEICHNIS	68

Abkürzungsverzeichnis

2,4-DNP	2,4-Dinitrophenol
AChR	Acetylcholinrezeptoren
AIDP	Akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
AMAN	Akute motorische axonale Neuropathie
AMSAN	Akute motorische sensorische axonale Neuropathie
ATP	Adenosintriphosphat
Anti-GM1	Anti-Gangliosid-Antikörper
BDNF	Engl. Brain derived neurotrophic factor
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvanz
CIDP	Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
C. Jejuni	Campylobacter Jejuni
CMV	Zytomegalievirus
cMAP	Engl. compound muscle action potential = Summiertes Aktionspotenzial
EAN	Experimentelle Autoimmunneuritis
EAN	Engl. European Academy of Neurology = Europäische Akademie für Neurologie
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EFNS	Engl. European Federation of Neurological Societies = Europäischer Verbund der neurologischen Fachgesellschaften
FDA	Food & Drug Administration
GBS	Guillan-Barré-Syndrom
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
MADSAM	Multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie

mNCV	Engl. motor nerve conduction velocity = Motorische Nervenleitgeschwindigkeit
NMJ	Engl. neuromuscular junction = Neuromuskuläre Synapse
N. Ischiadicus	Nervus Ischiadicus
PBS	Eng. phosphat buffered Salin = Phosphatgepufferte Salzlösung
PNS	Engl. Peripheral Nerve Society = Periphere Nervengesellschaft
ROS	Engl. Reactive oxygen species = reactive Sauerstoffspezien

1. Zusammenfassung

Die Studie hatte zum Ziel, im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN) neue mögliche pharmakologische Behandlungsoptionen mit den zwei Medikamenten Monastrol und 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP, nachfolgend DNP genannt) zu prüfen. Die jeweils intraperitoneale Injektion erfolgt bei Monastrol in der Dosierung von 1mg/kg sowie bei 2,4-DNP in den Dosierungen 1/0,1/0,001mg/kg.

Die EAN wurde in 6-8 Wochen alte weiblichen Lewis-Ratten mittels subkutaner Injektion von einem P2-Peptid ausgelöst. Die Tiere wurden in Gruppen randomisiert und ihre neurologischen Ausfallerscheinungen täglich anhand eines Scoring-Systems beurteilt. Zur Beurteilung potenzieller neuro-regenerativer Effekte erfolgte nach voller Symptomausprägung an Tag 18 die Injektionen von Monastrol, DNP oder PBS (phosphat-buffered saline, Kontrolle). Diese wurden in Abstand von vier Tagen (Tag 22 und 26) wiederholt. Zur Beurteilung paraklinischer Effekte erfolgten an den Tagen 0, 18 und 30 nach der Immunisierung elektrophysiologische Untersuchungen (mNCV, F-Wellen, cMAP). Der Tag 30 stellte das Ende des Untersuchungszeitraumes dar. Die Tiere wurden unter Narkose getötet und perfundiert sowie anschließend der rechte Nervus Ischiadicus sowie der Musculus tibialis anterior entnommen und tiefgefroren. Mittels Kryoschnitten und anschließender immunhistochemischer Färbung (Makrophagen, T-Zell-Färbung, Fluoromyelin und NMJ) sowie elektronenmikroskopischer Untersuchung (Mitochondriengröße, Axondurchmesser) wurden die Unterschiede der Gruppen untersucht.

Die Experimente zeigen, dass die Kinesin-5-Inhibition mittels Monastrol die funktionelle Erholung der EAN verbessern und elektrophysiologisch als auch histologisch positiv den Krankheitsverlauf der EAN beeinflusst. Die Monastrol-Gabe führt zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik, verstärkt die Remyelinisierung und verhindert eine starke Invasion von Entzündungszellen in den Nerv.

Im Gegensatz dazu zeigt die mehrmalige Gabe von DNP in verschiedenen Dosierungen keine Effekte auf den Verlauf der EAN. Weder die klinische Symptomatik noch die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigen signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen. Somit konnte DNP den Verlauf der EAN nicht günstig beeinflussen. Auch eine Minderung der Entzündungsreaktion im Sinne einer Reduktion der T-Zellen und Makrophagen-Infiltration konnte nicht gezeigt werden. Ultrastrukturell zeigte sich durch die Gaben eine Reduktion der Mitochondriengröße in den mit DNP-behandelten Gruppen ohne funktionelle Effekte.

2. Einleitung

2.1. Guillain-Barré-Syndrom

2.1.1. Geschichtlicher Hintergrund

Die Bezeichnung Guillain-Barré-Syndrom (GBS) geht auf die französischen Ärzte Georges Charles Guillain und Jean-Alexandre Barré zurück, die während des 1. Weltkriegs zusammen mit André Strohl zwei Patienten mit schlaffen, aufsteigenden Lähmungen sowie einer Areflexie beschrieben. Liquorpunktionen zeigten dort eine erhöhte Proteinmenge bei normaler Zellzahl.

¹⁻³

2.1.2. Epidemiologie

GBS ist die führende Ursachen von akut auftretenden aufsteigenden Lähmungen in der Post-Polio Zeit.⁴ Die Inzidenz des GBS wird auf zwischen 0,81 und 1,89 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr geschätzt. Dabei steigt die Inzidenz mit dem Alter exponentiell an, so dass sie bei Kindern zwischen 0 und 9 Jahren ca. 0,62 beträgt und bei Menschen zwischen 80 und 89 Jahren auf 2,66 pro 100.000 ansteigt. Männer sind hierbei generell häufiger betroffen als Frauen.⁵⁻⁷

2.1.3. Symptome

Typischerweise beginnt das GBS mit einer aufsteigenden, distalen Schwäche der unteren Extremität. Fehlende Reflexe (Areflexie) und sensorische Symptome treten ebenso auf, meist distal beginnend. Das Krankheitsmaximum wird meist innerhalb von 4 Wochen erreicht, während die Rückbildung der Symptome deutlich länger andauern kann oder – abhängig von der Schwere der Erkrankung – persistiert. Es handelt es sich in fast allen Fällen um eine monophasische Krankheitsentität. Bei einer Krankheitsprogression über 4 Wochen hinaus, liegt definitionsgemäß nicht mehr die akute Form im Sinne eines GBS vor. Es muss dann differenzialdiagnostisch zwischen der subakuten und chronischen Form, der chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP), unterschieden werden. Dies ist teils erst retrospektiv möglich.^{6,8}

54-89% klagen in der Akutphase über Schmerzen in Form von Parästhesien, Rückenschmerzen oder Muskelschmerzen. Auch autonome Dysfunktionen durch eine Beeinträchtigung der autonomen Fasern kommen häufig vor (2/3 der Patienten).⁹

Klinisch zeigt sich dies in einem Ileus, Harnverhalt oder auch in Herzrhythmusstörungen. In diesen Fällen ist ein Monitoring der Vitalparameter zwingend notwendig. In circa der Hälfte der Fälle kommt es zu Hirnnervenausfällen, die sich durch Schluckstörungen, Augenmuskel-Lähmungen und Fazialispareesen zeigen.^{1,8}

Prognostisch wichtigstes Symptom ist eine respiratorische Insuffizienz durch Lähmung der Atem- und Atemhilfsmuskulatur. Bis zu 30% benötigen eine temporäre Unterstützung der Beatmung sowie Intensivmedizinische Betreuung. Die respiratorische Insuffizienz kann von leichter Minderung der Lungenfunktionstests bis zu einem kompletten Ausfall mit notwendiger Intubation reichen.¹⁰

2.1.4. Phänotypen

Klinisch lassen sich diverse Subtypen einteilen, wobei vier Subtypen klinisch relevant sind.¹¹

AIDP steht für akute inflammatorische demyelisierende Polyneuroradikuloneuropathie und beschreibt eine akut auftretende demyelinisierende Variante des GBS. Die maximale Symptomstärke lässt sich hierbei oftmals in den ersten vier Wochen beobachten.^{1,12}

Die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN) stellt eine weitere häufige Variante des GBS dar, bei der die axonale Schädigung der motorischen Neurone im Vordergrund steht.¹³ Während bei der AIDP die Demyelinisierung im Vordergrund steht, führt die AMAN vor allem zu axonalen Schäden.⁸

Seltenere Varianten sind die akute motorisch-sensorische Neuropathie (AMSAN) bei der gleichermaßen sensorische und motorische Nerven betroffen sind oder das Miller-Fisher-Syndrom, welches durch eine Triade aus Ophthalmoplegie, Ataxie und Areflexie ohne Schwäche der Extremitäten charakterisiert ist^{14,15}

Tabelle 1 modifiziert nach Hughes⁸, zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Subtypen bei GBS.

GBS-Subtyp	Symptomatik
Akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (AIDP)	Sensorisch und motorisch, oft autonome und Hirnnervenbeteiligung
Akute motorische axonale Neuropathie (AMAN)	Motorisch
Akute motorische, sensorische axonale Neuropathie (AMSAN)	Sensorisch und motorisch
Miller-Fisher-Syndrom	Ataxie Opthalmoplegie Areflexie

2.1.5. Pathogenese

Beim GBS liegt eine autoimmune Genese vor, bei der das Immunsystem körpereigene Nervenbestandteile angreift. Auslöser dieser Überreaktion ist meist eine Infektion. In zwei Drittel der Fälle lässt sich ein einige Wochen zuvor durchgemachter respiratorischer Atemwegsinfekt oder eine Durchfallerkrankung nachweisen. Häufigster Erreger ist *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), der in einem Drittel der Fälle nachgewiesen werden kann. Nichtsdestotrotz ist das Risiko, nach einer *C. jejuni* Infektion an einem GBS zu erkranken, gering. Lediglich in einem von 1.000 bis 5.000 Fällen kommt es zur Entstehung des GBS nach der Infektion mit *C. jejuni*.^{16,17} Andere häufige Erreger sind das Zytomegalievirus (CMV), Ebstein-Barr-Virus (EBV) oder das Zika-Virus. Ursächlich sind aufgrund der Infektion produzierte Antikörper, die ebenfalls Proteine der Nervenmembranen, sogenannte Ganglioside, erkennen. Dies führt zu einer weiteren Aktivierung des Immunsystems, einer Einwanderung von Immunzellen in die Nerven mit einer Schädigung der Blut-Nerven-Schranke und letztlich zu einem Nervenschaden und einem Verlust der Leitungsfähigkeit. Die Spezifität der Anti-Gangliosid-Antikörper entscheidet hierbei den Subtyp sowie den Verlauf der Erkrankung.⁹ Die Demyelinisierung wird durch verschiedene Bestandteile der Immunabwehr vermittelt, unter anderem durch Makrophagen, zytotoxische T-Zellen und Zytokine.

Da die Untersuchungen dieser Arbeit am Tiermodell experimentelle Autoimmune Neuritis durchgeführt werden, findet die genauere Beschreibung der Pathogenese dort statt.

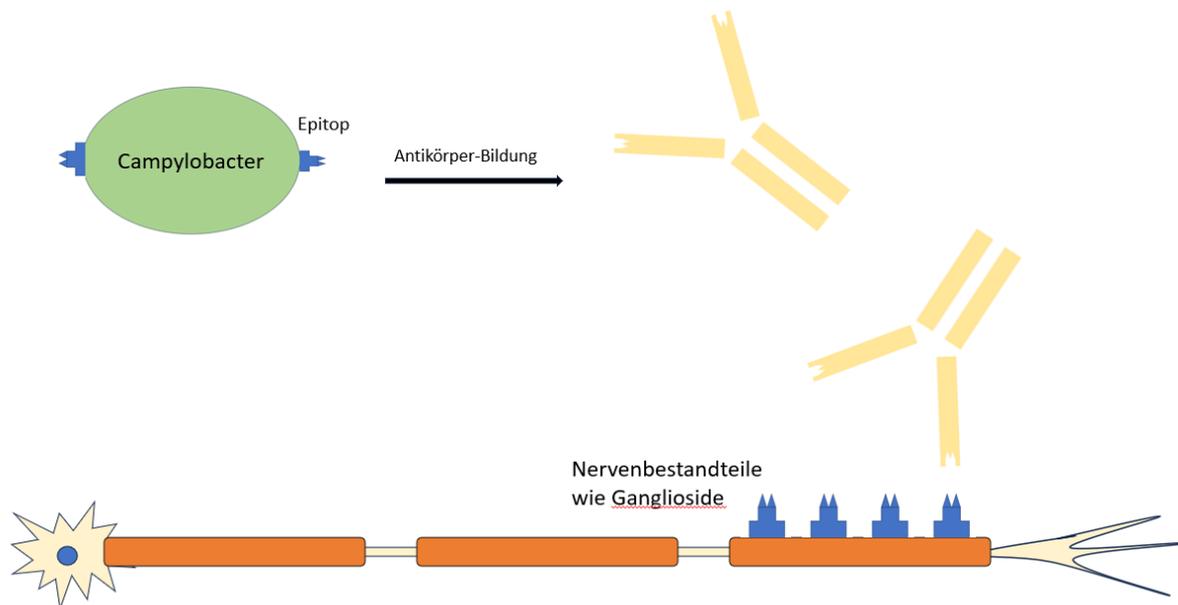


Abbildung 1: Modifiziert nach Koike et al.. Pathogene wie *Campylobacter jejuni* stellen Antigene (Epitope) dar, die zu einer Antikörperbildung führen. Nach dem Prinzip des molekularen Mimikrys binden diese Antikörper neben dem Pathogen selbst auch körpereigene Strukturen wie Ganglioside. Dies führt zu einer Entzündungsreaktion am Nerven und zum Abbau der Myelinscheiden.¹⁸

2.1.6. Diagnose

Die Diagnose GBS wird klinisch gestellt und durch Liquorbefunde sowie elektrophysiologische Befunde unterstützt. Es existieren verschiedene Diagnosekriterien, am häufigsten verwendet werden jedoch die Brighton Kriterien von Sejvar et al.¹⁹ Obligat für die Diagnose GBS ist einerseits die progrediente Parese von mehr als einer Extremität und andererseits die deutliche Verminderung oder Erlöschung der Muskeleigenreflexe in den betroffenen Extremitäten.²⁰ Weitere wichtige Kriterien sind die Progression der Symptome in einem Zeitraum von maximal 4 Wochen sowie der relativ symmetrische Befall der Extremitäten. Im Liquor zeigt sich typischerweise eine Eiweißerhöhung bei normaler Zellzahl nach der ersten Woche, eine sogenannte zytoalbuminäre Dissoziation. Häufige Befunde in der Elektrophysiologie sind Verzögerungen der Impulsleitung oder ein Leitungsblock. Ein anfänglicher Fieberschub, Monozyten im Liquor sowie ein asymmetrischer und langsamer Progress macht die Diagnose eines GBS unwahrscheinlicher.⁹ Ebenfalls hilfreich bei der Diagnose-Stellung kann der Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte Nervenbestandteile sein. Insbesondere Anti-GM1-Antikörper

gegen Ganglioside können bei einem Teil der Patienten nachgewiesen werden und somit die Diagnose erleichtern.²¹

2.1.7. Prognose

Die Prognose bei GBS ist sehr variabel und abhängig von Faktoren wie Alter, Symptomausprägung und Komorbiditäten.²²

Die Mortalität wird in verschiedenen Studien unterschiedlich angegeben und beträgt ca. 1-18%. Patienten im höheren Alter, mit pulmonalen und kardialen Komplikationen sowie die Notwendigkeit der mechanischen Ventilation und systemische Infektionen zeigten eine erhöhte Mortalitätsrate.^{9,23}

Auch Angaben zu Residuen und dauerhaften Behinderungen unterscheiden sich je nach Studie deutlich voneinander. So gibt Meyenthaler an, dass fast die Hälfte aller hospitalisierten Patienten mit GBS (40%) im Verlauf eine Rehabilitationsbehandlung benötigten.²⁴ Laut Dorn et al. Ist jeder 5. Patient nach 6 Monaten nicht fähig, ohne Hilfe zu Gehen. Trotz intensiver Therapien kommt es also bei einigen Patienten zu langfristigen neurologischen Residuen.²⁵ Vor allem in den frühen Stadien der Genesung kann darüber hinaus es zu weiteren Komorbiditäten wie tiefe Venenthrombosen, Gelenkkontrakturen sowie Dekubitus kommen, die die weitere Prognose verschlechtern können.²⁴

2.1.8. Therapie

Allgemein sollte die Behandlung der GBS-Patienten so schnell wie möglich beginnen. Es zeigte sich, dass Patienten, die früh eine Therapie erhielten, weniger Residuen zeigten.^{26,27} Mittel der ersten Wahl sind der Plasma-Austausch, die Immunadsorption oder die Gabe von intravenösen Immunglobulinen. Bei dem Plasma-Austausch wird Patienten-Plasma durch Spender-Plasma getauscht, wodurch die pathogenen Antikörper gegen Ganglioside aus dem Körper entfernt werden. Der Plasma-Austausch führt laut mehreren Studien zu einer schnelleren Erholung der Muskelstärke sowie zu einem besseren Outcome der Patienten.²⁷

Die Gabe von Immunglobulinen zeigte in Studien bei Kindern ein verbessertes Outcome gegenüber dem Einsatz von Placebos oder Kortison. Bei Erwachsenen wurden lediglich Studien zwischen Plasma-Austausch und intravenösen Immunglobulinen durchgeführt. Hier zeigte sich keine Überlegenheit bei einer der Therapie-Optionen. Die Dosierung von

Immunglobulinen wird mit 0,4g/Kg/Tag für einen Zeitraum von 5 Tagen angegeben. Alternativ kann 1g/Kg/Tag für 2 Tage gegeben werden.²⁸

2.2. Experimentelle autoimmune Neuritis (EAN)

2.2.1. Einleitung

Mithilfe der EAN lassen sich Symptome und elektrophysiologische Veränderungen des GBS und der CIDP in einem Tiermodell darstellen. Der monophasische Verlauf der EAN entspricht dem Verlauf der GBS, nicht jedoch dem Verlauf der CIDP. Durch das Tiermodell lassen sich die Auswirkungen neuer möglicher Therapie-Optionen beobachten und analysieren. Die EAN kann in diversen Tieren mithilfe von peripherem Myelin ausgelöst werden. Häufig dient die Lewis-Ratte als Versuchstier.²⁹ Bei der EAN kommt es nach einer Latenz von circa 2 Wochen zur Ausprägung der Symptome mit Punktum Maximum an Tag 18. Es kommt zu einem Verlust des Schwanztonus, Gewichtsverlusts sowie zu einer Paralyse der Hinterbeine. Nach circa 4 Wochen kommt es in der Regel zu einer vollständigen Erholung.³⁰

2.2.2. Induktion

Die Induktion der EAN erfolgt zumeist in weiblichen Lewis-Ratten. Dabei nutzt man zumeist PNS-Myelinproteine (z.B. P0, P2). Die Peptide werden subkutan in eine Hinterpfote sowie am Rückenfell injiziert. Dies führt zu einer Immunreaktion mit der Folge der Ausprägung der typischen Symptomatik. Prinzipiell kann eine EAN auch in Mäusen, Kaninchen oder Meerschweinchen induziert werden. Weibliche Lewis-Ratten gelten als zuverlässiges Tiermodell für die EAN und werden daher häufig verwendet.^{31,32}

Die Antigene verursachen in Kombination mit dem Freund'schen Adjuvanz eine immunologische Reaktion, bei der es nach Antigenpräsentation zur Bildung von autoimmun wirkenden T-Zellen kommt. Die ersten Symptome treten circa 10 Tage nach Immunisierung auf.

2.2.3. Zelluläre Mechanismen

Es handelt sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion auf die verabreichten Peptide. Nach der Injektion kommt es zu einer Antikörperbildung mit Aktivierung des Immunsystems. Die Anzahl an autoreaktiven T-Zellen korrelieren mit der klinischen Symptomatik. Die

Infiltration der T-Zellen führt zu einer Erhöhung der Permeabilität der Blut-Nerven-Schranke.^{33,34} Bei der EAN sowie beim GBS handelt es sich um eine durch Makrophagen und T-Zellen induzierte akute Demyelinisierung des peripheren Nervensystems. Histopathologisch erkennt man eine lymphozytäre Infiltration der Nerven. Die Folge ist eine Makrophagen-Aktivierung, die zum Abbau der Myelin-Schicht der Nervenzellen führt.³⁵

Mitochondrien spielen in der Funktionsfähigkeit von Neuronen eine wichtige Rolle. Durch Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) versorgen sie die Neurone mit Energie, sodass die Aufgaben der Zelle erfüllt werden können. Auch eine Elektrolytverschiebung, die den Zelltod zur Folge hat, wird verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass es beim EAN zu einer frühzeitigen Schädigung der Mitochondrien in den Axonen der Neurone kommt.³⁶ Es zeigte sich ebenfalls, dass Mitochondrien in peripheren Nerven insbesondere während Entzündungen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Myelinscheiden spielen.³⁷ Auch in der neuronalen Regeneration stellt die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien einen entscheidenden Faktor dar.³⁸

2.3. Medikamente

2.3.1. Monastrol

Monastrol ist ein kleines zell-durchlässiges Molekül, welches als spezifischer Kinesin-5-Inhibitor wirkt. Kinesin-5 gehört zur Gruppe der Kinesine, einer heterogenen Gruppe von ATP-abhängigen Motorproteinen. Kinesine sind in der Lage, zelluläre Transportvorgänge entlang der Mikrotubuli durchzuführen, aber auch die Architektur der Mikrotubuli zu verändern.³⁹ Zusammen mit Dynein sind die Gruppe der Kinesine in der Lage, Transportvorgänge über die Länge der Neuronen durchzuführen. Dabei erfolgt der Transport in Vesikeln an den Mikrotubuli der Zelle. Somit lassen sich neben Lipiden und Proteinen auch ganze Zellorganellen wie Mitochondrien an ihren Zielort transportieren.⁴⁰ Kinesin-5 interagiert mit benachbarten Mikrotubuli in den mitotischen Spindeln. Darüber hinaus befindet sich Kinesin-5 in postmitotischen Neuronen, dort reguliert es die Verzweigung der wachsenden Axone.^{41,42} Kinesin-5 fungiert als Bremse und verlangsamt andere Bewegungsabläufe, wodurch die Geschwindigkeit begrenzt wird.⁴³ Das Fehlen von Kinesin-5 führt unter experimentellen Bedingungen zu einem stärkeren Wachstum sowie zu einer stärkeren Verzweigung der Axone. Umgekehrt kommt es bei einer Überexpression von Kinesin-5 zu einem verkürzten Wachstum der Axone.⁴³ Monastrol ist in der Lage, Kinesin-5 allosterisch zu hemmen.⁴⁴ So wirkte es bereits im Tiermodell der Chemotherapie-induzierten Neuropathie neuroprotektiv.⁴⁵

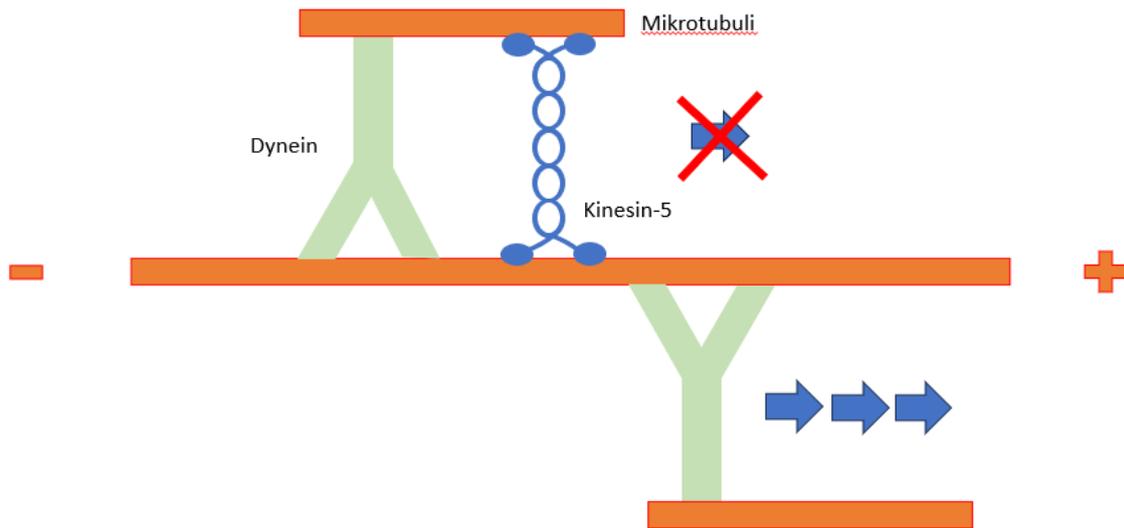


Abbildung 2: Nach Baas modifizierte Darstellung der Wirkungsweise von Kinesin-5. In den Axonen sind lange Mikrotubuli (Rote Linien) mit den positiven Enden distal zur Zellmitte ausgerichtet. Dynein (grünes Y) transportiert kurze Mikrotubuli in beide Richtungen (je nach Ausrichtung). Kinesin-5 (blaue Helix) wirkt hierbei wie eine Bremse und verlangsamt/stoppt die Transportvorgänge.⁴³

2.3.2. 2,4-Dinitrophenol (DNP)

Bei der Substanz 2,4-Dinitrophenol handelt es sich um einen Wirkstoff, der die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, also als mitochondrialer Entkoppler wirkt. Die bei der Atmungskette entstehende Energie wird nicht chemisch in Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert, sondern in Wärme freigesetzt. Vor über 80 Jahren, als der Wirkmechanismus noch nicht entdeckt wurde, gab es Versuche mit DNP zur Gewichtsabnahme bei adipösen Patienten. Aufgrund der schwerwiegenden Nebenwirkungen wurde das Medikament von der FDA (Food & Drug Administration) verboten.⁴⁶⁻⁴⁸ Zuletzt zeigten jedoch mehrere Studien bei deutlich niedrigeren Dosen neuroprotektive Wirkungen.^{49,50} Bei der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine neuroprotektive Wirkung.^{51,52} Auch im Tiermodell der multiplen Sklerose, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) konnte eine neuroprotektive Wirkung festgestellt werden.⁵³ Bei mitochondrialer Dysfunktion kann die sonst niedrige ROS-Produktion ansteigen, gleichzeitig sinkt die ATP-Produktion. DNP hingegen kann in geeigneten Dosen die ROS-Produktion (Reactive oxygen species) reduzieren.^{46,54} Diese Reduktion der freien Radikale, spielt in inflammatorischen Zuständen eine wichtige Rolle.⁵⁵ Niedrig dosiert, führte DNP zu einem moderaten oxidativen Stress, welcher eine Stimulation der Neuroprotektion in den Neuronen bewirkte.⁴⁶

Es konnte gezeigt werden, dass DNP in kortikalen Rattenneuronen zu einer Verringerung des oxidativen Stresses führt.⁵⁶ Darüber hinaus zeigte sich durch DNP eine dosisabhängige Erhöhung der mRNA, die für BDNF (brain derived neurotrophic factor) codiert.⁴⁶ BDNF fördert einerseits die Neuroregeneration und wirkt andererseits neuroprotektiv. In einem Tiermodell des Morbus Parkinson erhöhte es das Überleben von dopaminergen Neuronen.^{54,57}

2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung des neuro-regenerativen Potenzials von Monastrol und 2,4-Dinitrophenol auf die Regenerationsphase der EAN zu untersuchen. Wir erhoffen uns hierdurch neue Therapieansätze in der Behandlung von autoimmunvermittelten Radikuloneuropathien, insbesondere des GBS. Anhand von klinischer Symptomatik, elektro-physiologischen Untersuchungen, immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungsmethoden wurden die jeweiligen Effekte der Medikamente auf das Tiermodell hin beschrieben.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Braun Injekt-H 26G x ½	Braun, Melsungen, Deutschland
Braun Sterican Standard 26G	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe	Meditrade, Winstham/England
Falcon Tubes (15ml und 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland
Liquid Blocker (Pap-Pen)	Daido Sangyo Co., Tokyo/Japan
Objektträger Thermo Scientific Superfrost Plus	G. Menzel B.V. & Co. KG Braunschweig/Deutschland
Pipettenspitzen (Quality Tips)	Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland
Spritzen 1ml, 2ml, 5ml, 10ml	Braun, Melsungen, Deutschland

3.1.2. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Wärmekissen	TCAT Animal Heating Plate, Biosep
Elektrophysiologie	PowerLab signal acquisition set-up (ADInstruments).
Gefriermykrotom	Leica Biosystem, Wetzlar, Deutschland
BZ-9000 Mikroskops	Keyence, Japan
Zeiss EM109 (80kV, 200µm Kondensator)	Zeiss, Jena/Deutschland

3.1.3. Chemikalien und Anästhetika

Bezeichnung	Hersteller
Ketamin	Inresa, Freiburg, Deutschland
Xylazin	Xylazin Rompun, Aachen, Deutschland
P2 Peptid P2 ⁵³⁻⁷⁸	P253-78-Peptid (#AS-65472) Anaspect (Cat.-Number: AS-65472, California, USA)
Freudsches Adjuvanz	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tramadol	Gruenenthal, Aachen, Deutschland
Monastrol	Abcam (Cambridge, UK, #ab141087, CAS- Nummer: 329689-23-8
DNP	#STBJ2598, Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tissue-Tek OCT Compound	Sakura, Tokyo, Japan
Fluoromount G	ThermoScientific, massachusetts, USA
Epoxidharz	Epon, Fluka, Schweiz
2% Triton™ X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, MS, USA
Normal Goat Serum (5% in PBS, Selbsterstellung)	Linaris Biologische Produkte GmbH Dos- senheim, Deutschland
H2O2 30%	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Isopropanol >99,5%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA), (4% in PBS, Selbsterstellung)	Sigma Aldrich, St. Louis, MS, USA
Normal Rabbit Serum (5% in PBS, Selbsterstellung)	Linaris Biologische Produkte GmbH Dossenheim, Deutschland

3.1.4. Verwendete Lösungen

Bezeichnung	Inhalt
16 x PBS, anschließend mit aqua dest ver- dünnt	137 mM NaCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄

	4,3 mM Na_2HPO_4 2,7 mM KCL
Perfusionslösung	3% Glutaraldehyd + 1mM $CaCl_2$ in 0,1 M Cacodylatpuffer mit PH ,4
Nachfixierung	1% OsO_4
Dehydrierung	Aceton-Propylenoxid

3.1.5. Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Ia1	rabbit polyclonal, primär FUJIFILM Wako Shibayagi Cat# 019-19741, RRID:AB_839504, Osaka, Japan
Anti-CD3	1:500, rabbit-mAb, Abcam Cat# ab16669, RRID:AB_443425, Cambridge, UK)
Anti-Tubulin-Antikörper	1:300, Kaninchen mAB, Abcam Cat# ab68193, RRID:AB_2893226, Cambridge, UK)
Synaptophysin-Antikörper	1:200 Maus-mAb, Zellsignaltechnologie, Kat.-Nr. 9020, RRID:AB_2631095, Massachusetts, USA)
May-Grünwald-Giemsa-Färbung	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

3.1.6. Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
Sekundär fluorescein-labelled goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG)	Alexa Flour 488, Thermo Fisher Scientific Cat# A32731, RRID:AB_2633280, Massachusetts, USA
Anti-goat rabbit IgG	Alexa Flour 488, Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 305-545-003, RRID:AB_2339532, Cambridge, UK
Hoechst	33342 (1:500, Cell Signaling Technology Cat# 4082, RRID:AB_10626776), Massachusetts, USA
α -Bungarotoxin Alexa	488-Konjugat (1:500, #B13422, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
Goat-Anti-rabbit	1:500, Alexa Flour 568, Thermo Fisher Scientific Kat.-Nr. A-11011, RRID:AB_143157, Massachusetts, USA
Donkey-anti-mouse-Sekundärantikörper	Sekundärantikörper (1:500, Alexa-Mehl 568, Thermo Fisher Scientific Kat.-Nr. A-11057, RRID:AB_2534104, Massachusetts, USA).

3.2. Methoden

3.2.1. Induktion der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN)

Die Induktion der experimentellen Autoimmun Neuritis (EAN) erfolgte an 6-8 Wochen alten weiblichen Lewis-Ratten (160-200g, aus Charles River Co., Sulzfeld, Deutschland). Die Haltung der Ratten erfolgte unter Standardbedingungen in unserer örtlichen Tierhaltung. Die Immunisierung wurde unter Vollnarkose mit intraperitoneal verabreichten Ketamin und Xylazin (50/10mg/kg) durchgeführt. Dabei wurden 250µg P2⁵³⁻⁷⁸-Peptid aufgelöst in gleicher Menge an Freud'schen Adjuvanz subkutan in die Schwanzbasis injiziert. Um auftretende Schmerzen der EAN zu vermeiden, erfolgte eine analgetische Behandlung mit 0,5mg/ml per os Tramadol.

3.2.2. Klinischer Score

Die klinische Untersuchung der Krankheitsschwere der EAN erfolgte verblindet durch einen etablierten klinischen Score (s. Tabelle 2).⁵⁸ Die Untersuchung wurde täglich, bei schweren Symptomen zwei Mal täglich durchgeführt, vom Tag der Immunisierung bis zur Aufarbeitung der Tiere. Zusätzlich wurde eine täglich Gewichtsmessung durchgeführt.

Tabelle 2: Klinischer Score nach Enders et al.⁵⁹

Score	Klinisches Merkmal
0	Normal
1	Reduzierter Schwanztonus
2	Fehlender Schwanztonus
3	Fehlende Stellreflexe
4	Gangataxie
5	Leichte Paralyse der Hinterbeine
6	Mittlere Paralyse
7	Schwere Paralyse
8	Tetraplegie
9	Moribund
10	Tod

3.2.3. Elektrophysiologische Untersuchung

Die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgten zu Beginn (Tag 0), am Symptom-Maximum (Tag 18) sowie kurz vor Aufarbeitung der Tiere am Versuchsende (Tag 30). Die Ratten wurden mittels intraperitonealer Gabe von Xylazine/Ketamin (50/10mg pro kg Körpergewicht) vor der Untersuchung narkotisiert. Das jeweilige Versuchstier wurde auf eine Wärmematte platziert, um eine Unterkühlung und thermische Abweichungen in den Messungen zu verhindern und ein standardisiertes Protokoll wurde verwendet.⁶⁰ Die Bestimmung der motorischen Leitungsgeschwindigkeit (mNCV) erfolgte durch Einstechen der proximalen Stimulations-Elektrode an der Nervenwurzel des N. Ischiadicus in der Nähe des Os Pelvis sowie Platzierung der ableitenden Elektroden distal im Bereich der Achillessehne. Zur Bestimmung des summierten Muskelaktionspotenzials (cMAP) wurde eine weitere Elektrode subkutan im Bereich der Fußmuskeln gestochen. Zusätzlich wurde eine Erdungselektrode in die Schwanzbasis gestochen. Mithilfe von supramaximalen Schüben (0,05ms) wurde eine Stimulation durchgeführt. Anschließend wurde die Stimulations-Elektrode in die Poplitealregion verlegt und es erfolgte eine weitere Stimulation. Die mNCV ergibt sich, indem die Differenz der beiden Stimulationen geteilt wird durch die Differenz der Latenzen. Darüber hinaus wurden F-Wellen abgeleitet. Dies stellt die späte motorische Reizantwort da. Die Stimulation führt einerseits zu einer orthodromen Weiterleitung, also in Richtung des Nervs, und andererseits zu einer antidromen Weiterleitung, in Richtung der Nervenwurzel. Die F-Welle entsteht somit nach Reflexion der antidromen Weiterleitung an der Nervenwurzel und anschließender orthodromen Weiterleitung über den Nerven. Eine verzögerte F-Welle zeigt hierdurch vor allem die proximale Schädigung eines Nervens im Bereich der Nervenwurzel an.⁶¹

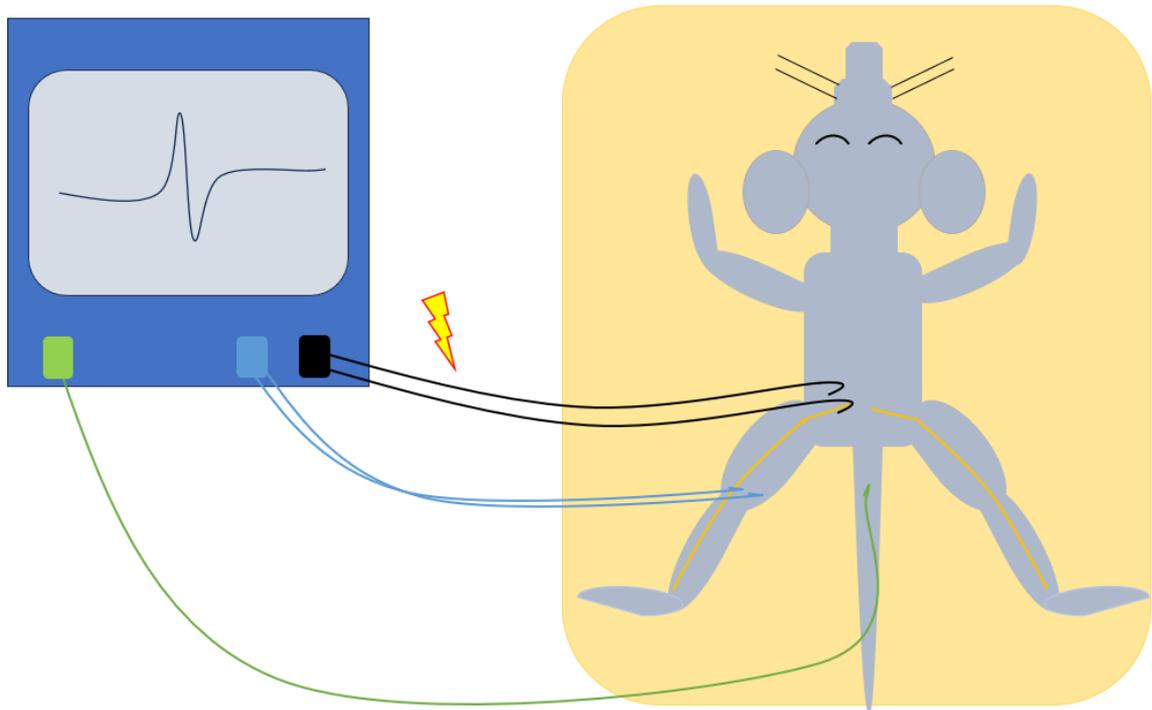


Abbildung 3: Aufbau der elektrophysiologischen Untersuchung. Die Ratte wird betäubt und auf einer Wärmeplatte platziert. Stimulationselektroden (schwarz) werden nah am Ursprung des N. Ischiadicus gestochen. Ableitungselektroden (hellblau) werden abwechselnd in der Kniekehle sowie distal am Knöchel platziert, Eine weitere Erdungselektrode (grün) wird an der Schwanzbasis gestochen. Mithilfe von supramaximalen Schüben (0,05ms) wurde eine Stimulation durchgeführt.

3.2.4. Behandlung mit Monastrol

Der Kinesin-5-Inhibitor Monastrol wurde als intraperitoneale Injektion verabreicht. In der Dosierung von 1mg/kg Körpergewicht (gelöst in 1 x phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) erfolgte die Injektion an Tag 18, 22 und 26 mit Beginn der Regenerationsphase. In der Kontrollgruppe wurde das identische Volumen injiziert, um Abweichungen durch den Stress der Injektionen zu verhindern.

3.2.5. Behandlung mit 2,4-Dinitrophenol

Die Medikamentengabe erfolgte analog zur Monastrol-Injektion. In den Dosierungen 1/0,1/0,001mg/kg Körpergewicht erfolgte die intraperitoneale Injektion an Tag 18, 22 und 26 nach der Immunisierung. Die Kontrollgruppe erhielt die identische Menge an PBS, um Abweichungen durch den Stress der Injektionen zu verhindern.

3.2.6. Transkardiale Perfusion

Nach der letzten elektrophysiologischen Untersuchung unter erneuter Narkose erfolgte die Aufarbeitung der Tiere. Nach transkardialer Perfusion mit PBS wurde der rechte Nervus ischiadicus präpariert und in 4 Segmente geteilt. Anschließend wurden die Segmente von proximal nach distal sortiert in Tissue-Tek OCT Compound eingebettet und in einem -80 °C Gefrierschrank eingefroren.

3.2.7. Gefriermikrotom

Die in Tissue-Tec eingelegten Nervenpräparate wurden mittels Gefriermykrotom in 12µm breite Präparate geschnitten. Die Schnitte wurden so auf einem Objektträger gesammelt, dass je vier Schnitte pro Hälfte auf den Objektträger passten.

3.2.8. Immunhistochemie

Um die T-Zellen darzustellen, wurden die Kryoschnitte 120 Minuten auf Raumtemperatur aufgewärmt und luftgetrocknet. Anschließend wurden sie 20 Minuten mittels Aceton fixiert. Nach dreimaligem waschen mit PBS (für je 5 Minuten) wurden die Nerven mithilfe eines PAP-Pens umrandet, sodass die Antikörper-Lösung nicht abfließen kann.

Um nicht-spezifische Bindungen von Antikörpern und anderen Reagenzien zu vermeiden, erfolgte das Blocken mit 10% Serum des Tieres des 2. Antikörper im nächsten Schritt für 1,5 Stunden.

Nach Ablauf der Zeit wurde das Serum entfernt und der Primärantikörper (anti-CD3) in einer 1:500 Verdünnung hinzugegeben. Über Nacht wurden die Schnitte mit der Antikörper-Lösung im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde erneut dreimalig mit PBS gewaschen, bevor der Primär-Antikörper entfernt und der Sekundär-Antikörper hinzugefügt wurde. Nach 1,5h erfolgte die Ko-Färbung mit Hoechst zur Darstellung der Zellkerne. Bei einer 1:500 Verdünnung wirkte die Zellkernfärbung für 10 Minuten ein. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurde Fluoromount G für die Eindeckelung der Objektträger verwendet. Die Signale der Fluoreszenzfärbung wurden dann mittels BZ-9000 Mikroskops abgelichtet. Die Auswertung von 5 zufällig ausgewählten Bildern pro Slide wurde semiquantitativ mithilfe der open-source rSoftware ImageJ (Fiji) durchgeführt.⁶²

Analog erfolgte die Färbung der Makrophagen und des Fluoromyelins jeweils nach Hersteller-Protokoll.

3.2.9. Transmissionselektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Mitochondrien wurden 4 Tiere an Tag 30 narkotisiert (200mg/kgKg Ketamin; 20mg/kgKg Xylazin). Nach Einsetzen der Narkose erfolgte die transkardiale Spülung mit einer Tyriode-Lösung (20 Sekunden) und anschließend wurde die Perfusionslösung eingeleitet. Danach wurden die Ischiasnerven präpariert und von proximal nach distal sortiert nachfixiert. Nach der Dehydrierung mit Aceton-Propylenoxid folgte die Einbettung in Epoxidharz. Mithilfe eines Diamantmessers wurden ultradünne Querschnitte (30nm) angefertigt und auf einem Formvar/Carbon-beschichtetem 200-Mesh Kupfergitter befestigt. Eine Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat wurde durchgeführt. Die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte an einem Zeiss EM109 (80kV, 200µm Kondensator) mithilfe eines 30µm Objektivs (2k TRS-Kamera). Ausgewertet wurden die Gesamtfläche der Nerven in µm², die geschätzte Anzahl myelinisierter Fasern pro 100.000 µm², Faserdurchmesser, Myelindicke, Axondurchmesser und „g“-Verhältnis („g“-Verhältnis = Axondurchmesser/Faserdurchmesser)⁶³ Die Auswertung erfolgte verblindet zu den jeweiligen Versuchsgruppen und die Zählungen wurden mittels ImageJ durchgeführt.

3.2.10. Färbung des neuromuskulären Endplatte

Die Färbung erfolgte aus muskulärem Gewebe des rechten M. Tibialis anterior. Nach transkardialer Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA) wurde die Präparation des Muskels an einer Gruppe von 4 Tieren je Gruppe durchgeführt. Nachdem die Muskeln über Nacht in 4% PFA fixiert wurden, erfolgte eine Kryoprotektion mit einer 30% Zuckerlösung bei 4°, anschließend folgte die Einbettung in OCT Compound. Jeweils 6 30µm breite Longitudinalschnitte wurden auf einer Deckscheibe angeordnet. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde das Gewebe 30 Minuten mit einer 2% Triton X-100 Lösung behandelt, bevor die Schnitte mit einer 3% Ziegen-Serum (mit 1% Triton X-100) geblockt wurden. Als nächstes wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper (Anti-B-II-Tubulin-Antikörper 1:300, Kaninchen mAb,) und dem Synaptophysin-Antikörper (1:200 Maus-mAb, Zellsignaltechnologie,) über Nacht bei 4° inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS am nächsten Tag wurden die Schnitte mit einer Mischung aus α-Bungarotoxin Alexa inkubiert 488-Konjugat (1:500,) und entsprechendes

Ziegen-Antikaninchen (1:500, Alexa Flour 568,) und Esel-Anti-Maus-Sekundärantikörper (1:500, Alexa-Mehl 568,). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte das Eindecken mit Fluoromount G und Deckplättchen. Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (BZ9000 Keyence) durchgeführt. Pro Tier wurden mindestens 20 NMJ auf die Integrität der Post- und Präsynapse hin analysiert. Die Unterscheidung erfolgte in „vollständig innerviert“, „teilweise innerviert“ und „denerviert“. Bei fehlender präsynaptischer Färbung, aber intakter Postsynapse aufgrund von axonaler Schädigung, wurde die NMJ als „nicht innervierte, intakte Acetylcholinrezeptoren (AChR) klassifiziert.“⁶⁴

3.2.11. Verhältnis zwischen roten und weißen Blutkörperchen

An Tag 30 erfolgte vor der Perfusion eine Blutentnahme an je 4 Tieren pro Gruppe. Es erfolgte eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) nach Hersteller-Protokoll. Mittels „Hellfeldmikroskopie“ (BZ9000) wurden die roten und weißen Blutkörperchen manuell ausgezählt. Genutzt wurde hierfür ein 12 × 8 mm² Gitter.

3.2.12. Statistische Untersuchung

Die statistische Analyse unserer Ergebnisse erfolgte mittels Prism-Software (GraphPad Prism 9). Im Regelfall erfolgte die Angabe als Mittelwert ± Standardabweichung. Der Students-T-Test testete die Unterschiede von zwei Paaren von Gruppen. Unterschieden zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mithilfe durch die Ein-Faktor-Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. In allen Experimenten wurde ein p-Wert von < 0,05 als signifikant und p < als 0,0001 als hochsignifikant definiert.

4. Ergebnisse

4.1. Neuroregenerative Effekte von Kinesin-5-Inhibition in der EAN

4.1.1. Monastrol verbessert die funktionelle Erholung

Der klinische Verlauf zeigte bei allen Tieren ein Beginn der Symptomatik ab Tag 11 nach Immunisierung (p.i.). Wie in Abbildung 4 zu sehen, wird das Maximum um den Tag 19 p.i. erreicht. Der durchschnittliche klinische Score betrug an Tag 19 p.i., also am Beginn der Regenerationsphase, 3,25 (SD \pm 0,92) in der Kontroll- sowie 3,3 (SD \pm 1,49) in der Monastrol-Gruppe und war somit vergleichbar. An Tag 30 p.i. hingegen zeigte sich ein signifikant niedriger klinischer Score in der Monastrol-Gruppe mit 0,95 (SD \pm 0,5) gegenüber der Kontrollgruppe 2,5 (SD \pm 1,72). Zur statischen Auswertung wurde die Fläche unter der Kurve (Abbildung 5) ab Tag 18 bis 30 p.i. (Area under the curve) berechnet, die der Monastrol-Gruppe 24,83 \pm 10,56 betrug gegenüber der Kontrollgruppe 37,68 \pm 13,04 (**p-Value 0,03**).

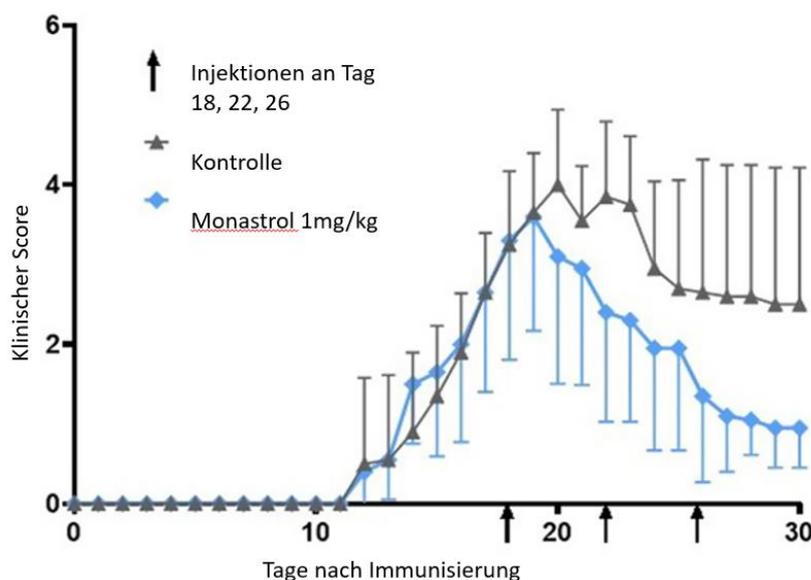


Abbildung 4: Durchschnittlicher klinischer Score von Tag 0 bis Tag 30 nach der Immunisierung der Lewis-Ratten mit P2-Peptid und CFA. Die Ratten erhielten an Tag 18, 22 und 26 jeweils eine intraperitoneale Injektion mit Monastrol (1mg/kgkg) (n = 10). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge PBS als intraperitoneale Injektion. Es handelt sich um zusammengeführte Werte aus drei unterschiedlichen Experimenten. Dargestellt sind die mittleren Werte und die Standardabweichung. Die mehrmalige Injektion von Monastrol (1mg/kgkg) führte zu einer stärkeren Erholung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

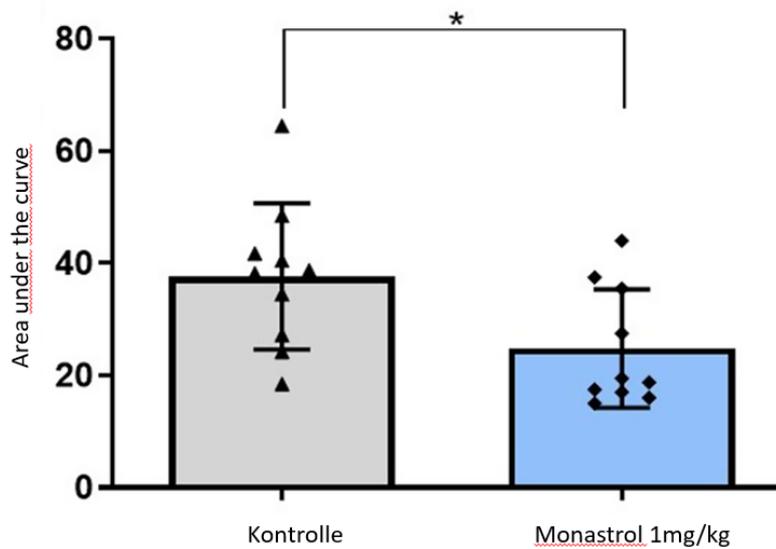


Abbildung 5: Dargestellt ist die „Area under the curve“. Die mehrmalige Injektion von Monastrol (1mg/kgKg) führte zu einer signifikanten Reduktion der „Area under the curve“. Für die Datenanalyse wurde ein t-Test bei einer Stichprobe und ein Mann-Whitney-Test für die AUC-Werte durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

4.1.2. Die Behandlung mit Monastrol führt zu einer stärkeren Erholung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit

Die im Rahmen der Entzündungsreaktion auftretende Demyelinisierung führt sowohl bei der EAN wie auch beim GBS zu einer Verlangsamung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (mNCV). In der Versuchsreihe wurde anhand des N. Ischiadicus die motorische Nervenleitgeschwindigkeit als Zeichen der Demyelinisierung sowie das Muskelaktionspotenzial (cMAP) als Zeichen des axonalen Schadens gemessen. Zu Beginn zeigte sich in beiden Gruppen eine vergleichbare mNCV (Kontrolle: 43.21 m/s \pm 8.2 SD; Monastrol 42.78 m/s \pm 6.68 SD) (siehe Abbildung 6). An Tag 18 p.i. lag dann eine deutlich reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit in beiden Gruppen vor (Kontrolle 31.3 m/s \pm 7.04 SD; Monastrol 28.76 m/s \pm 7.85 SD). Während die Gabe von Monastrol bis Tag 30 p.i. zu einer fast vollständigen Erholung der Nervenleitgeschwindigkeit im Vergleich zu Tag 0 p.i. führte (36.64 m/s (\pm 6.64 SD)), zeigte die Kontrollgruppe keinen Anstieg bzw. Erholung der mNCV (30.50 m/s \pm 7.3 SD).

Im Gegensatz dazu zeigte das Muskelaktionspotenzial (Abb. 7) keine signifikanten Veränderungen in den beiden Gruppen von Tag 0 zu Tag 18 p.i. (Kontrolle: Tag 0: 13.79 mV \pm 7.86 SD, Tag 18: 8.34 mV \pm 4.05 SD, Monastrol: Tag 0 12.53 mV \pm 7.48 SD, Tag 18 8.13 mV \pm 4.01 SD). Auch zeigte sich in der Erholungsphase keine signifikante Verbesserung der jeweiligen Gruppe im Vergleich zu Tag 18 p.i. (Kontrolle: 8.64 mV \pm 5.29 SD Monastrol: 7.94 mV \pm 2.91 SD).

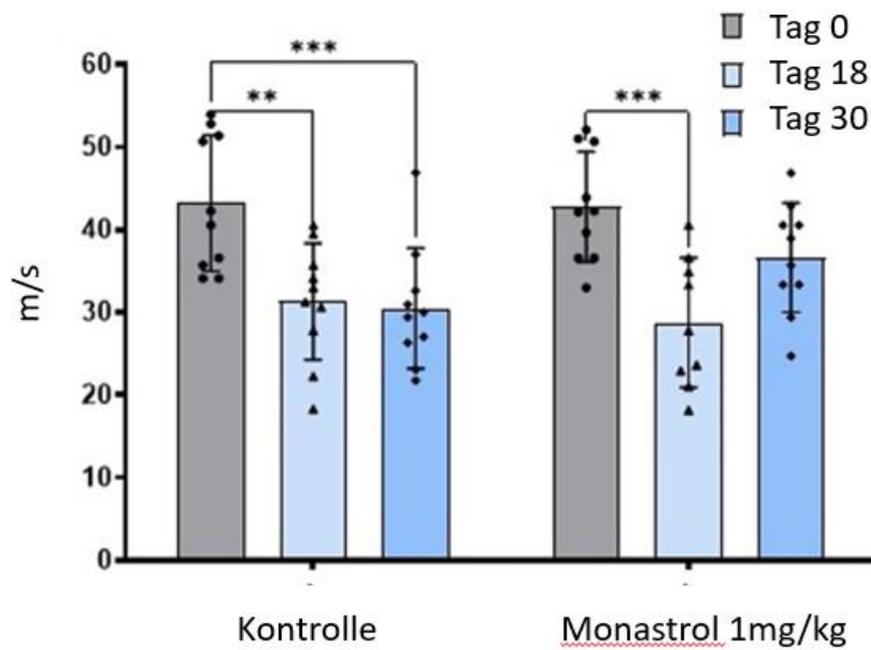


Abbildung 6: Darstellung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (mNCV in m/sec.). Diese wurde an Tag 0, 18 und an Tag 30 bestimmt. Die Ratten erhielten an Tag 18, 22 und 26 jeweils eine intraperitoneale Injektion mit Monastrol (1mg/kgkg) (N = 10). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge PBS als intraperitoneale Injektion. Es handelt sich um zusammengeführte Werte aus drei unterschiedlichen Experimenten. Dargestellt sind die mittleren Werte und die Standardabweichung. Die mehrmalige Injektion von Monastrol (1mg/kgKg) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Nervenleitgeschwindigkeit in der Erholungsphase. Es wurde ein Multiple 2-Way ANOVA Test mit Tukey's Mehrfachvergleichen durchgeführt.

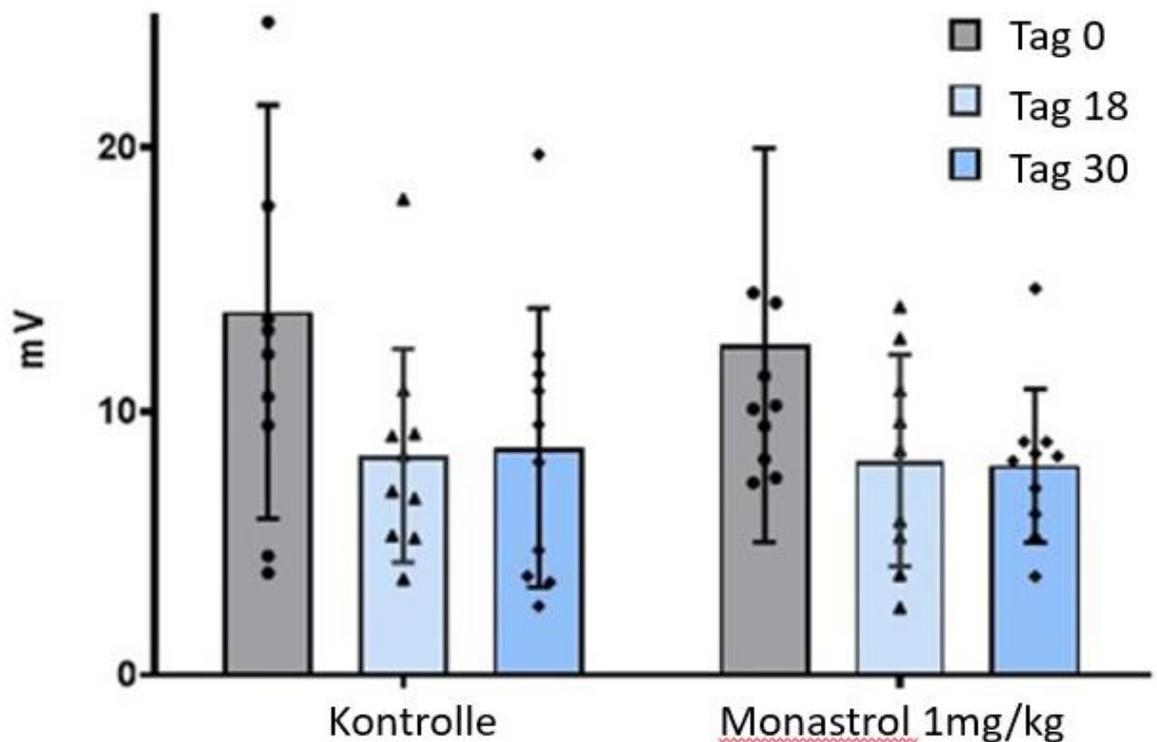


Abbildung 7: Darstellung der cMAP (in mV) als Teil der elektrophysiologischen Untersuchung. Diese wurde an Tag 0, 18 und an Tag 30 durchgeführt. Die Ratten erhielten an Tag 18, 22 und 26 jeweils eine intraperitoneale Injektion mit Monastrol (1mg/kgkg) ($n = 10$). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge PBS als intraperitoneale Injektion. Es handelt sich um zusammengeführte Werte aus drei unterschiedlichen Experimenten. Dargestellt sind die mittleren Werte und die Standardabweichung. Es zeigte sich keine signifikante Reduktion von Tag 0 zu Tag 18, ebenso zeigte sich keine signifikante Erholung im Vergleich von Tag 18 zu Tag 30. Kontrollgruppe: p -value des Vergleichs von Tag 0 und 18: 0,08, Tag 0 und 30: 0,11; entsprechende p -values der Monastrol-Gruppe: 0,21 und 0,17; multiple 2-Wege ANOVA mit Tukey's Mehrfachvergleichen

4.1.3. Kinesin-5 Inhibition verstärkt die Remyelinisierung und verringert die T-Zellinfiltration

Zur Darstellung der Inflammation sowie der immunologischen Erholung im N. Ischiadicus nutzen wir die zellulären Marker CD3+ und Iba1. Ersterer ist hierbei ein Marker für T-Lymphozyten, während sich mit Iba1 Makrophagen identifizieren lassen. In Abbildung 8 und 9 zeigte sich eine signifikante Reduzierung der CD3+-Zellen in der Monastrol-Gruppe (Mittlerer Wert Kontrolle: $0.31\% \pm 0.19$ SD, Monastrol: $0.14\% \pm 0.08$ SD, p -value: 0.001) an Tag 30 des Experiments. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Monastrol-Gruppe eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung der Iba1-positiven Zellen an Tag 30 (Kontrolle: $0.29\% \pm 0.154$, Monastrol: $0.37\% \pm 0.16$, p -value: 0.06).

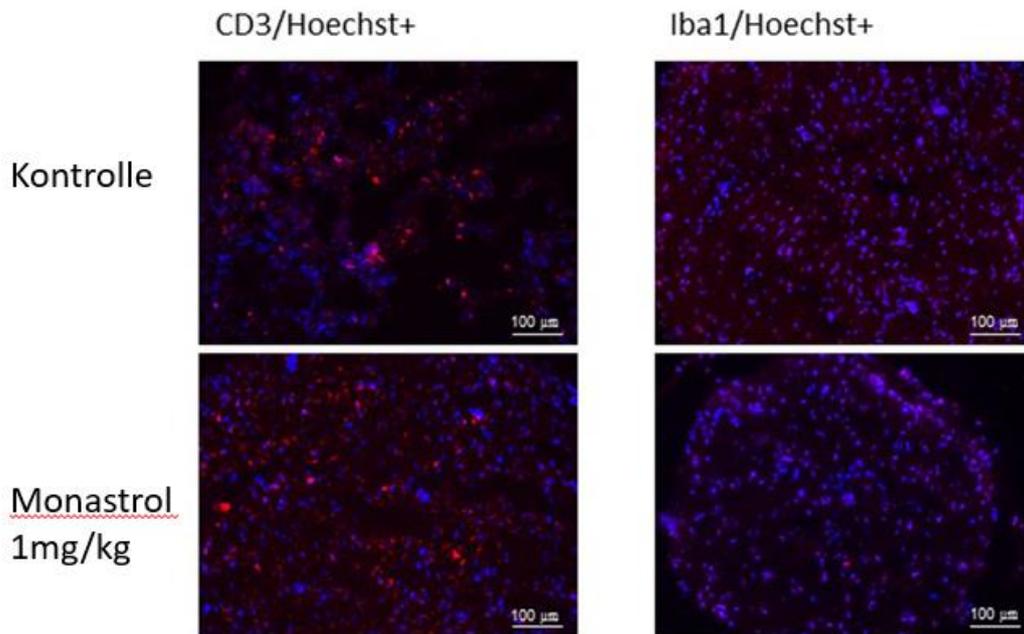


Abbildung 8: Beispielhaft wird hier die Immunhistochemie dargestellt. Zu sehen sind zwei Querschnitte des N. Ischiadicus aus der Monastrol-Gruppe (1mg/kgKg) und der Kontrollgruppe. Dargestellt in blau sind die Zellkerne mittels Hoechst und in rot die T-Zellen (mittels CD3-Antikörper angefärbt, linke Abbildung). In der rechten Abbildung (B) wurden zusätzlich zu den Zellkernen die Makrophagen mithilfe eines Iba1-Antikörpers (rot) angefärbt.

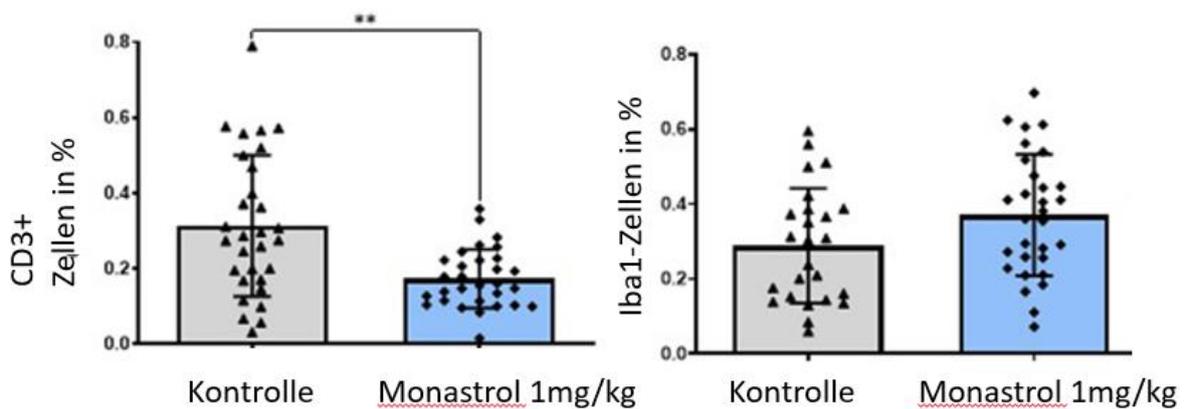
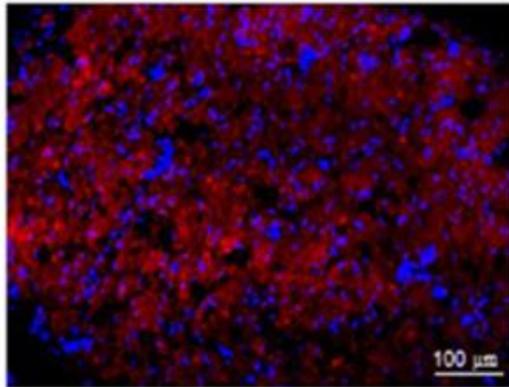


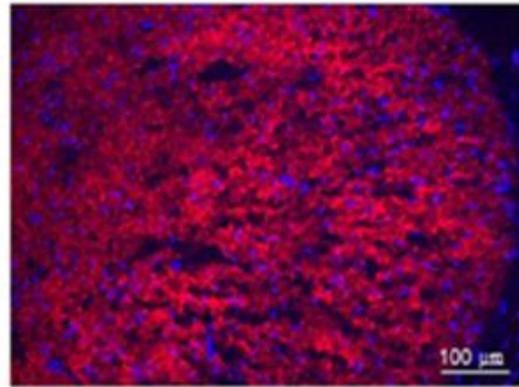
Abbildung 9: Statistische Auswertung der Immunhistochemie. In der linken Abbildung zeigt sich eine signifikant erniedrigte Anzahl an CD3 positiven Zellen in der Monastrol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Die rechte Abbildung zeigt eine nicht signifikante Erhöhung der Iba1-positiven Zellen in der Monastrol-Gruppe.

Zur Darstellung der Remyelinisierung wurde eine semi-quantitative Fluoromyelin-Färbung genutzt. In Abbildung 10 werden beispielhaft Färbungen der Kontrolle und der Monastrol-Gruppe abgebildet. Hierbei zeigte sich eine signifikant verstärkte Remyelinisierung in der Monastrol-Gruppe (Kontrolle: $0.49\% \pm 0.08$, Monastrol: $0.58\% \pm 0.1$, p-value: 0.0005).

Fluoromyelin/Hoechst+



Kontrolle



Monastrol 1mg/kg

Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung der Fluoromyelin-Färbung. Es erfolgte eine Co-Färbung der Zellkerne mittels Hoechst (blau).

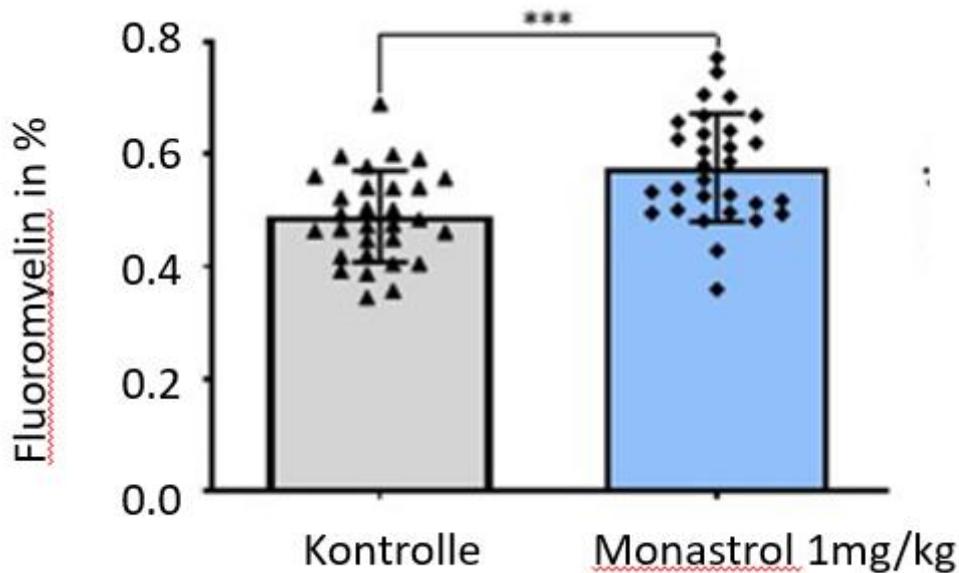


Abbildung 11: Statistische Auswertung der Fluoromyelin-Färbung. Es zeigt sich eine signifikant höhere Myelinisierung in der Gruppe der mit Monastrol behandelten Tiere. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche.

Elektronenmikroskopisch ließ sich dies bestätigen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der mittleren Faserdurchmesser (Mittlerer Durchmesser Kontrolle: $4494 \text{ nm} \pm 2218 \text{ nm}$, Monastrol: $4301 \text{ nm} \pm 2420 \text{ nm}$, p-value: 0.16), während der Axondurchmesser signifikant niedriger in der Kontrollgruppe war (im Durchschnitt $2976 \text{ nm} \pm 1587 \text{ nm}$ to $2629 \pm 1718 \text{ nm}$, p-value 0.0031) mit einer ebenfalls, jedoch nicht signifikant, geringerer Fläche der Nerven ($19.93 \pm 37.49 \mu\text{m}^2$ (Monastrol: $24.35 \pm 68.8 \mu\text{m}^2$). Die Myelinscheide des N. Ischiadicus war im Mittel signifikant breiter in der Monastrol-Gruppe (Kontrolle: 647.6 nm , Monastrol: 937.1 nm , p-value: 0.0002). Zusätzlich zeigte sich in der mit Monastrol-behandelten Gruppe eine erniedrigte „g-Ratio“ (mittlere Ratio in der Kontrolle: 0.66 ± 0.11 , Monastrol 1 mg/kg: 0.59 ± 0.15 , p-value < 0.0001), welches als indirektes Zeichen einer Remyelinisierung gewertet werden kann. In der Anzahl myelinisierter Fasern pro $100.000 \mu\text{m}^2$ zeigte sich kein Unterschied in beiden Gruppen (Kontrolle: 1907 ± 562 , Monastrol: 1561 ± 745 , p-value: 0.08).

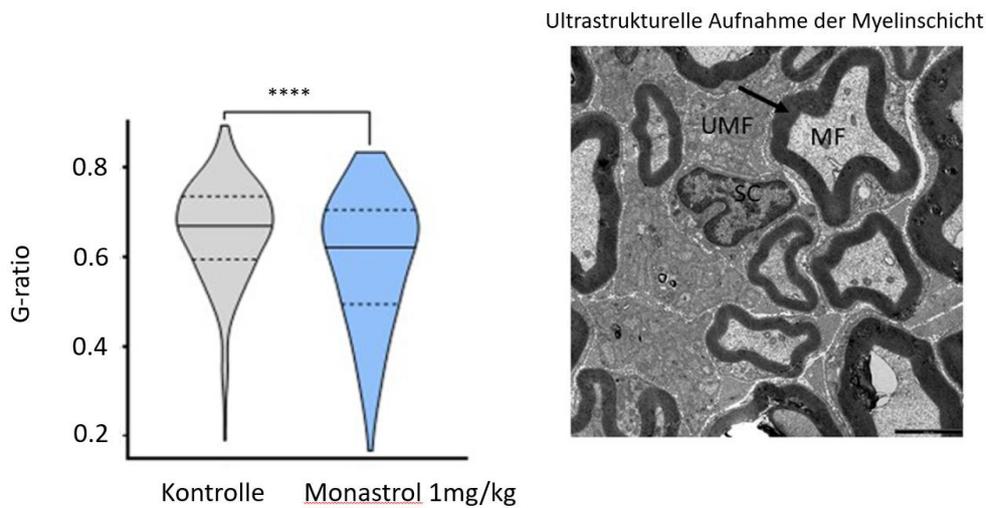


Abbildung 12: Das linke Bild zeigt eine ultrastrukturelle Aufnahme als Querschnitt des N. Ischiadicus. Exemplarisch wurde eine myelinisierte Faser mit MF markiert, eine unmyelinisierte Faser mit UMF. Der schwarze Pfeil zeigt auf eine Myelinschicht. Die Abbildung rechts zeigt die G-Ratio als abgeschnittenes Geigendiagramm mit Median und Quartilen). Zur statistischen Analyse wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test durchgeführt.

Zur mechanistischen Einordnung erfolgte in einem nächsten Schritt die Behandlung von menschlichen, pluripotenten, sekundären Motoneuronen. Diese wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit Monastrol behandelt (10 μ mol/100 μ mol). Der Kinesin-5-Inhibitor verstärkt signifikant das Wachstum von Motoneuronen. Die Arbeiten hierzu wurden in dem Labor von unserem Kooperationspartner David Vilchez durchgeführt.

Wir konnten dabei zeigen, dass die Hemmung von Kinesin-5 durch Monastrol zu einem hochsignifikanten und dosisabhängigen der Neuronenlänge führte.

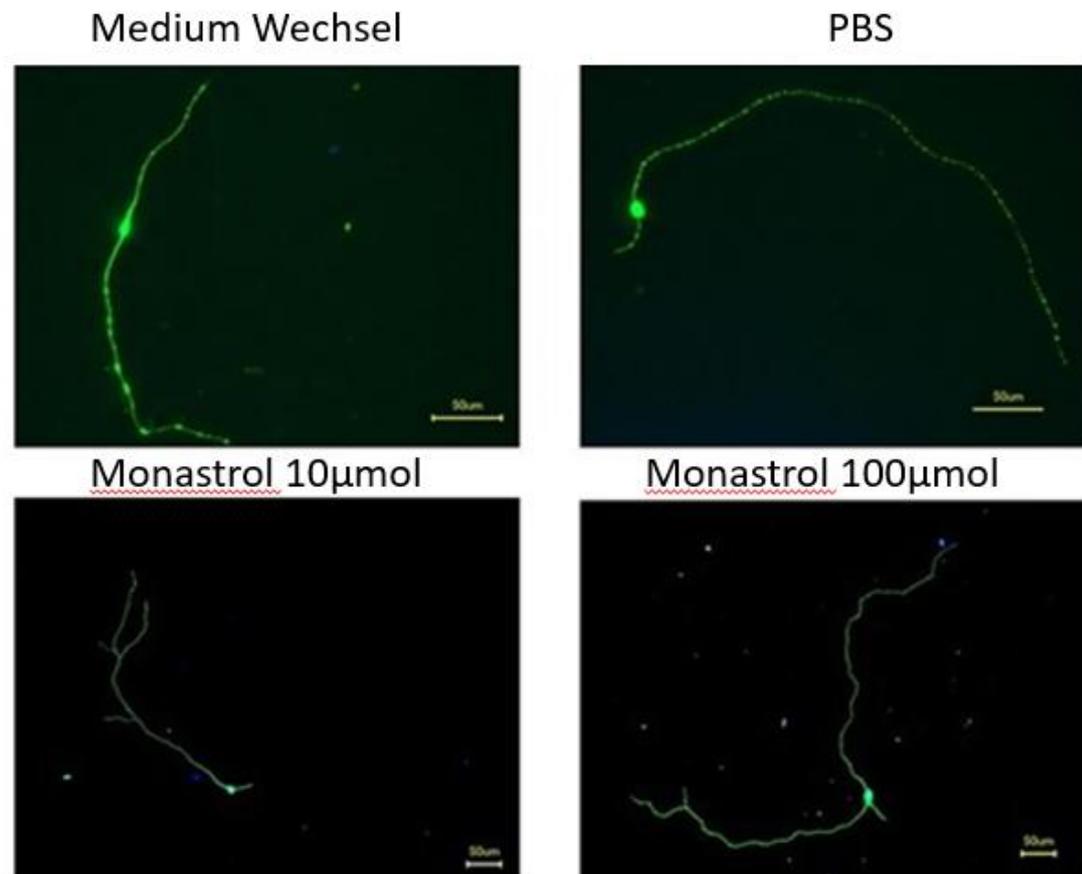


Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung der Immunhistochemischen Färbung der behandelten Zellkulturen. Die MAP2+-Färbung ermöglicht die morphologische Analyse der Neuriten. Darstellung der Zellkerne mittels Hoechst. Unten rechts im Bild jeweils im Größenverhältnis eine Strecke von 50µm.

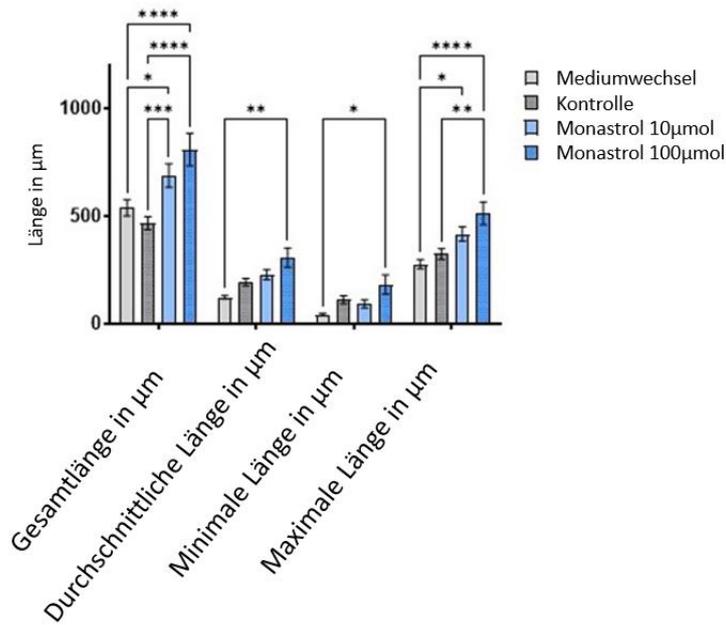


Abbildung 14: Darstellung der Länge der Neuriten in μm der einzelnen Gruppen. Unterschieden wird zwischen Gesamtlänge, durchschnittliche Länge, minimale und maximale Länge der Neuriten in μm . Die mit $100\mu\text{mol}$ behandelten Zellen zeigten hierbei in allen Wertungen die höchsten Werte an. Auch ein Dosisabhängiger Effekt zeigt sich mit insgesamt höheren Werten bei höher dosierten Monastrol.

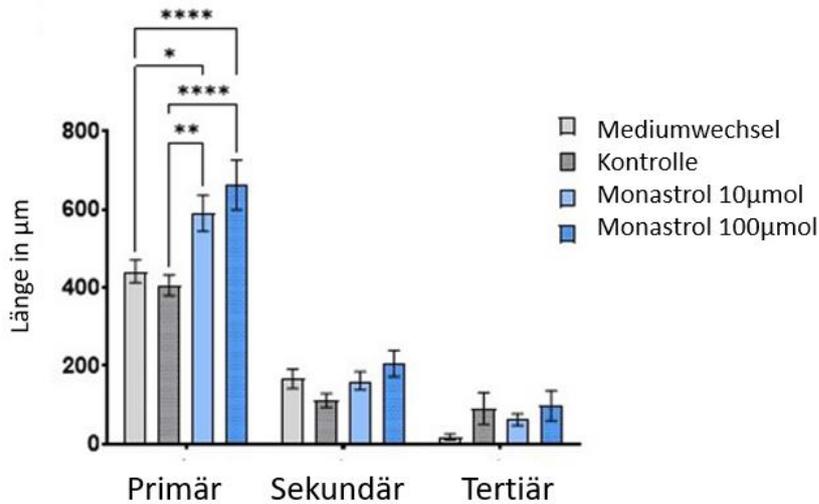


Abbildung 15: Darstellung der Länge in μm in Bezug auf primär, sekundär und tertiären Neuronen im Vergleich. Hier zeigen sich deutlich höhere Werte bei den primären Neuronen. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Monastrol und nicht-Monastrol-behandelten Zellen. Keine Signifikanz hingegen zeigt sich in sekundären oder tertiären Neuronen.

4.1.4. Kinesin-5-Inhibition verstärkt die Reinnervation von NMJs in der Erholungsphase der EAN

Bei den NMJs handelt es sich um die Brücke zwischen den Nerven und den Muskeln, in der die elektrischen Signale auf die Muskeln weitergeleitet werden.⁶⁵ Inzwischen gibt es erste Hinweise darauf, dass diese auch bei GBS betroffen sein könnten. NMJs enthalten viele Ganglioside, da sie außerhalb der Blut-Nerv-Schranke liegen, haben Antikörper leicht Zugang zu diesen Antigenen. Während das GBS häufig durch Anti-Gangliosid-Antikörper ausgelöst wird, erfolgt die Induktion der EAN durch P2-Peptide. Obwohl es bei der EAN ebenfalls zu einem Myelinverlust am terminalen Axon kommt, ist unklar, ob es auch bei der EAN zu einer Schädigung der NMJ kommt.⁶⁶ Die In-Vitro Hemmung von Kinesin-5 führt zu einem beschleunigten Wachstum sekundärer motorischer Neurone, sodass dies auf einen entscheidenden Einfluss auf die Muskelreinnervation schließen lässt.

An Tag 30 p.i. untersuchten wir daher den Zustand der NMJs anhand einer Färbung des muskulären Gewebes aus dem M. Tibialis Anterior (Abb. 16) aus beiden Gruppen.

Die Behandlung mit Monastrol führte in unseren Versuchen zu einer Erhöhung des relativen Anteils an intakten oder teilweise innervierten NMJs (Kontrolle: 65,05% vs. Monastrol: 76,4%, Abb. 16).

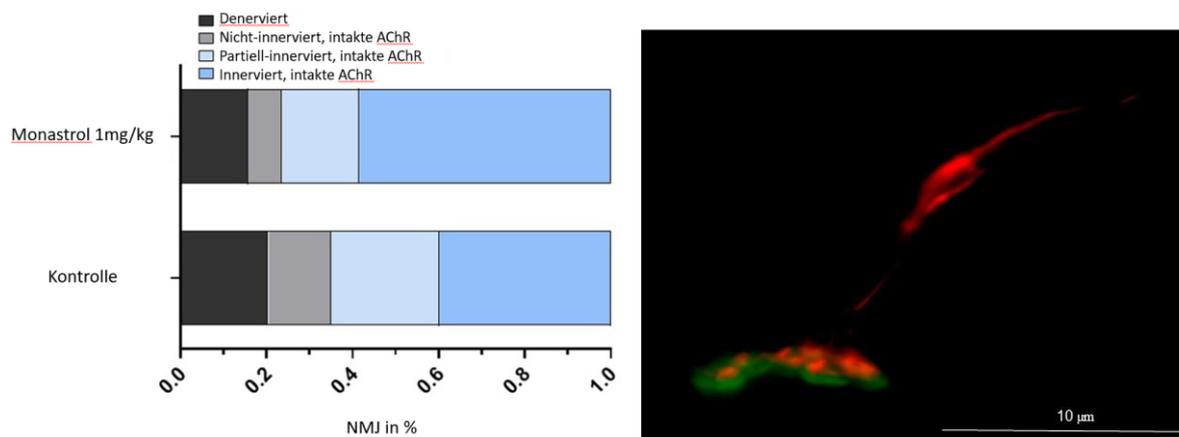


Abbildung 16: Die linke Abbildung zeigt die relative Verteilung von intakten, nicht innervierten (mit intakter AChR), und teilweise innervierten NMJs. Die rechte Abbildung zeigt beispielhaft eine intakte NMJ der Monastrol-Gruppe. Die prä- und postsynaptische Struktur überlappt fast vollständig. Insgesamt wurden 89-103 NMJs pro Gruppe untersucht (n=4 pro Gruppe). Die immunhistochemische Untersuchung wurde mittels Synaptophysin (Darstellung der Präsynapse) sowie alpha-Bungarotoxin (Darstellung der Postsynapse) durchgeführt.

4.1.5. Monastrol führt zu keiner Veränderung der Myeloproliferation

Potenziell kann Monastrol durch Hemmung der Mikrotubuli-Interaktion zu einer Zellteilungsstörung führen. Dies würde vorwiegend schnell-teilbare Zellen betreffen, sodass sich mögliche Nebenwirkungen im Rahmen einer Myelosuppression zeigen würden. Um die Auswirkungen auf die Blutbildung zu überprüfen, führten wir an Tag 30 p.i. bei 4 Ratten jeder Gruppe einen Blutausstrich durch. Anschließend berechneten wir das Verhältnis zwischen roten und weißen Blutkörperchen. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Mittelwert der Kontrolle: $0,0015 \pm 0,0005$ SD; Mittelwert für Monastrol: $0,0014 \pm 0,011$ SD; p-Wert 0,68, Abb. 17).

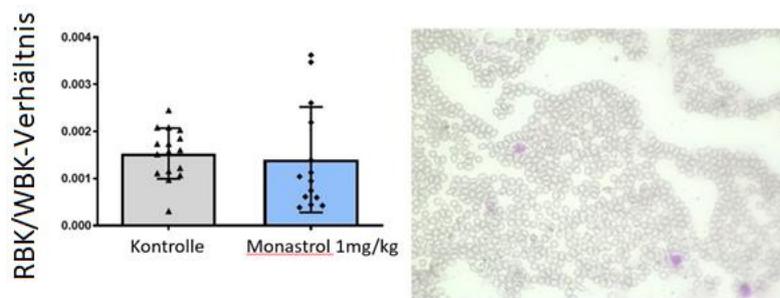


Abbildung 17: Die linke Abbildung zeigt das Verhältnis zwischen roten und weißen Blutkörperchen bei der Kontrollgruppe sowie bei der Monastrol-Gruppe an Tag 30 ($n=4$ pro Gruppe). Die Abbildung rechts zeigt beispielhaft eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung einer Ratte aus der Monastrol-Gruppe. Bei den zahlreichen kernlosen Zellen handelt es sich um Erythrozyten, während die Leukozyten lila gefärbt sind. Es wurde ein ungepaarter Zwei-Stichproben-t-Test durchgeführt.

4.1.6. Neuroregenerative Effekte von 2,4-DNP in der EAN 2,4-DNP hat keinen Einfluss auf die funktionelle Erholung in der EAN

Der klinische Verlauf zeigte bei allen Tieren ein Beginn der Symptomatik ab Tag 10 oder 11 nach Immunisierung (p.i.). Das Maximum wurde am Tag 19 erreicht. Die Injektionen mit 2,4-DNP in verschiedenen Dosierungen (1mg/kg Kg, 0,1mg/kg Kg, 0,01mg/kg Kg) oder PBS wurden zu Beginn der Erholungsphase ab Tag 18 p.i. gestartet, sowie an den Tagen 22 und 26 p.i. wiederholt. Der mittlere klinische Score an Tag 18 p.i. betrug 2,65 (SD \pm 0,75) in der Kontrollgruppe und in den DNP-Gruppen 2.75 (SD \pm 1.39) für 1 mg/kg, 3.38 (SD \pm 0.48) für 0.1 mg/kg and 3.0 für 0.01 mg/kg (SD \pm 0.82). Der mittlere klinische Score an Tag 30 p.i. betrug 2.5 (SD \pm 1.72), 2.38 (SD \pm 1.53), 2.235 (SD \pm 0.96) sowie 1.75 (SD 0.96). Die „area under the curve“ zeigte keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 18).

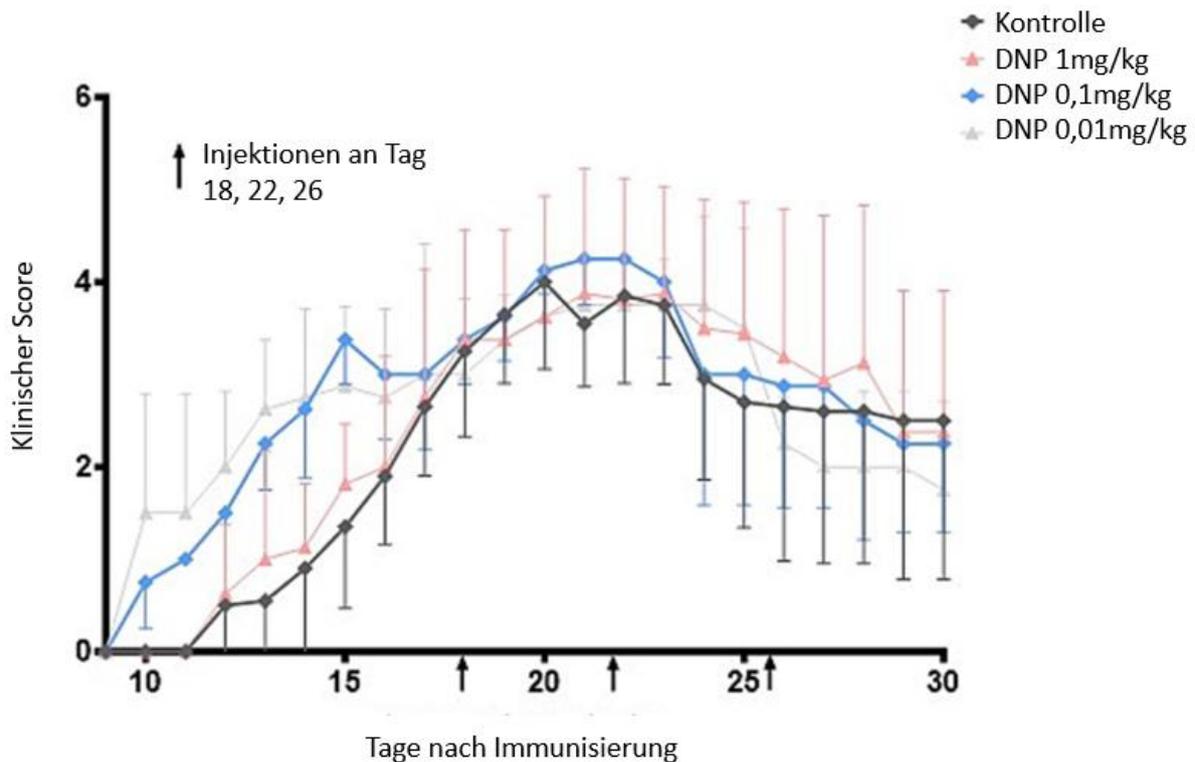


Abbildung 18: Durchschnittlicher klinischer Score von Tag 9 bis Tag 30 nach der Immunisierung der Lewis-Ratten mit P2-Peptid und CFA. Die Ratten erhielten an Tag 18, 22 und 26 jeweils eine intraperitoneale Injektion mit 2,4-Dinitrophenol in verschiedenen Konzentrationen (1/0,1/0,01mg/kg Kg) (N = 7/4/4). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge PBS als intraperitoneale Injektion (N= 10). Es handelt sich um zusammengeführte Werte aus drei unterschiedlichen Experimenten. Dargestellt sind die mittleren Werte und die Standardabweichung.

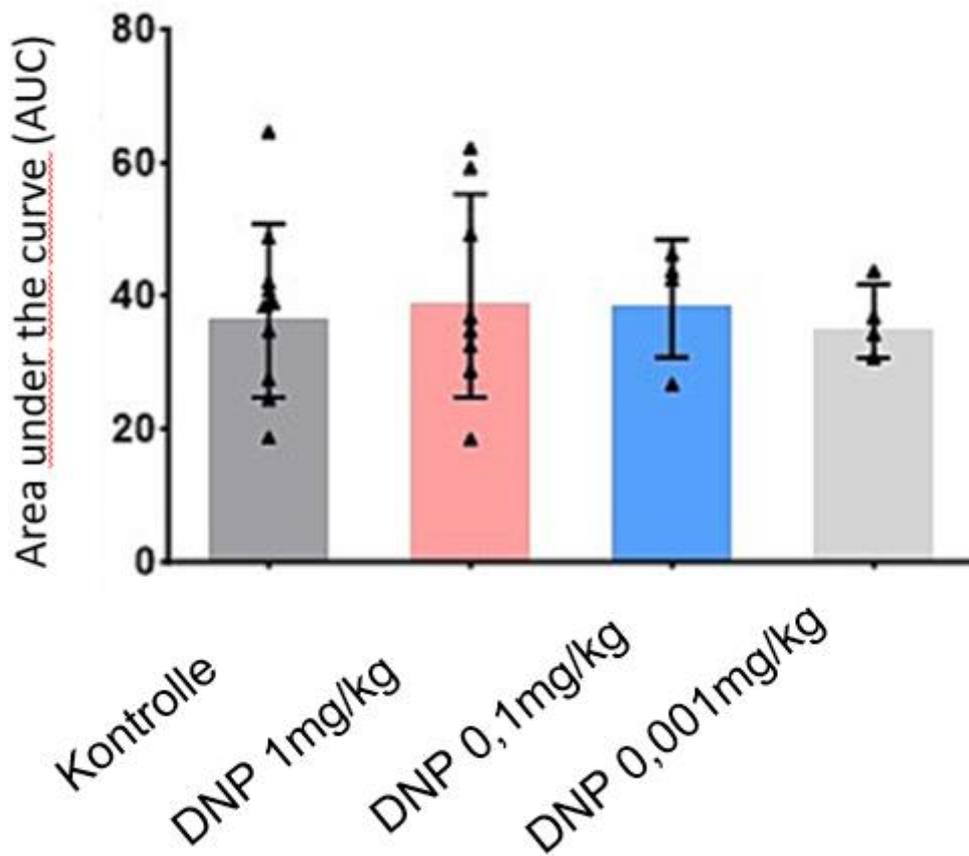


Abbildung 19: Dargestellt ist die „area under the curve“. Die mehrmalige Injektion von DNP (1/0,1/0,001mg/kg Kg) führte zu keiner signifikanten Reduktion der „area under the curve“. Für die Datenanalyse wurde ein t-Test bei einer Stichprobe und ein Mann-Whitney-Test für die AUC-Werte durchgeführt.

4.1.7. 2,4-DNP-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Erholung der Nervenleitgeschwindigkeit und des Muskelaktionspotentials

Die im Rahmen der Entzündungsreaktion auftretende Demyelinisierung führt sowohl bei der EAN wie auch beim GBS zu einer Verlangsamung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (mNCV). In der Versuchsreihe wurde anhand des N. Ischiadicus die motorische Nervenleitgeschwindigkeit als Zeichen der Demyelinisierung sowie das Muskelaktionspotenzial (cMAP) als Zeichen des axonalen Schadens gemessen. Zu Beginn zeigte sich in allen Gruppen eine vergleichbare mNCV. An Tag 18 p.i. kam es dann erwartungsgemäß zu einer signifikanten Reduktion der mNCV in allen Gruppen. An Tag 30 p.i. war die mittlere mNCV in allen Gruppen vergleichbar (DNP 0,01mg/kg Kg: 29.79 m/s (SD ± 5.01) vs. Kontrolle (30.7 m/s, SD ± 6.59 Abb. 20). Auch die cMAP zeigte keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 21). Lediglich zeigte sich eine signifikante Reduktion in der Kontrolle von Tag 0 zu Tag 18.

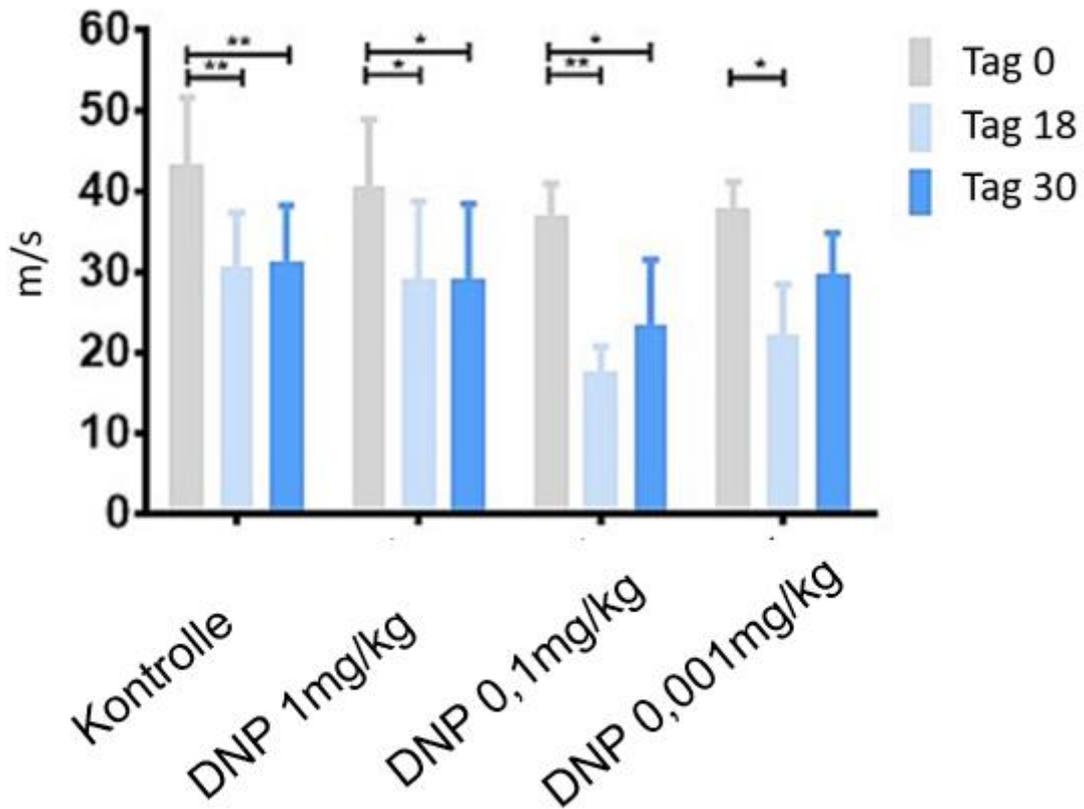


Abbildung 20: Darstellung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (mNCV in m/sec.). Diese wurde an Tag 0, 18 und an Tag 30 p.i. bestimmt. Die Ratten erhielten an Tag 18, 22 und 26 p.i. jeweils eine intraperitoneale Injektion mit 2,4-Dinitrophenol in verschiedenen Konzentrationen (1/0, 1/0,01mg/kg Kg) (N = 7/4/4). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge PBS als intraperitoneale Injektion (N= 10). Es handelt sich um zusammengeführte Werte aus drei unterschiedlichen Experimenten. Dargestellt sind die mittleren Werte und die Standardabweichung.

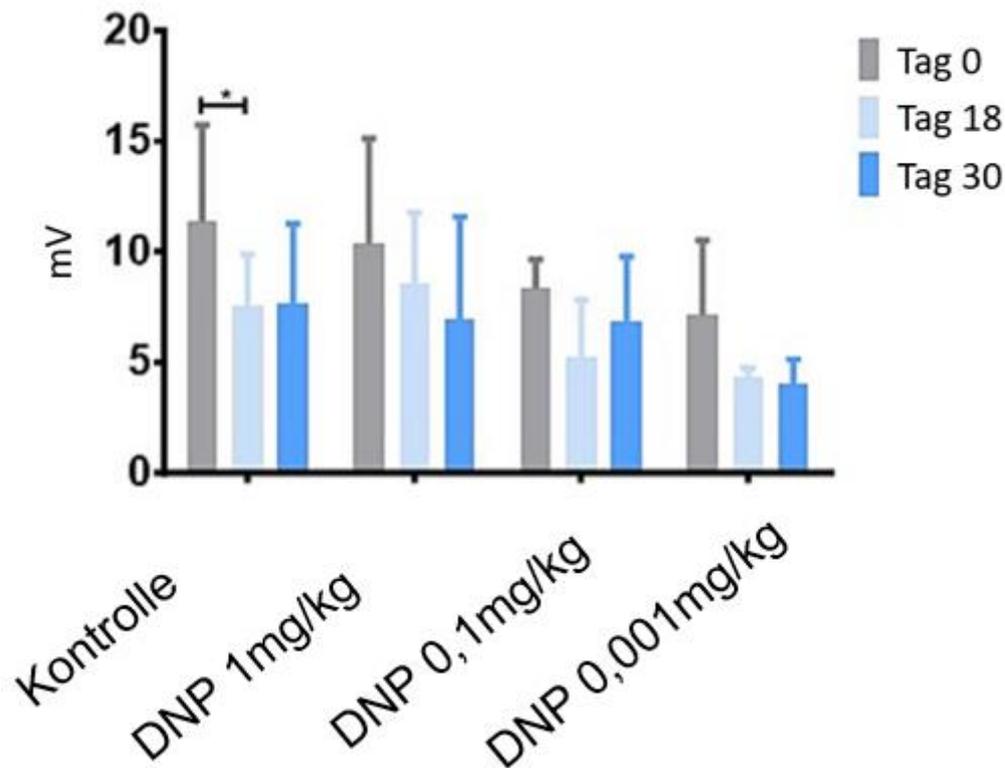


Abbildung 21: Darstellung der cMAP (in mV) als Teil der elektrophysiologischen Untersuchung. Diese wurde an Tag 0, 18 und an Tag 30 durchgeführt. Die Ratten erhielten an Tag 18, 22 und 26 jeweils eine intraperitoneale Injektion mit 2,4-Dinitrophenol in verschiedenen Konzentrationen (1/0,1/0,01mg/kg Kg) (N = 7/4/4). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge PBS als intraperitoneale Injektion. Es handelt sich um zusammengeführte Werte aus drei unterschiedlichen Experimenten. Dargestellt sind die mittleren Werte und die Standardabweichung. Es zeigte sich keine signifikante Reduktion von Tag 0 zu Tag 18, ebenso zeigte sich keine signifikante Erholung im Vergleich von Tag 18 zu Tag 30. Lediglich die Kontroll-Tiere zeigten eine signifikante Reduktion des cMAP im Vergleich von Tag 0 auf Tag 18.

4.1.8. 2,4-DNP als mitochondrialer Entkoppler induzierte ultrastrukturelle Veränderungen der myelinisierten und nicht-myelinisierten Nervenfasern und ihrer Mitochondrien

In unseren Versuchen haben wir die ultrastrukturellen Veränderungen in myelinisierten und nicht-myelinisierten Fasern sowohl von den proximalen als auch den distalen Teilen des N. Ischiadicus untersucht, da die Entzündungsreaktion der EAN auf ultrastruktureller Ebene zur einer Schwellung und Zunahme der Fasergröße und ihrer Mitochondrien führt.⁶⁷

In sämtlichen mit DNP behandelten Gruppen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gesamtgröße sowohl der myelinisierten als auch der nicht-myelinisierten Fasern. Die größte Wirkung zeigte sich hierbei bei den mit 0,01 mg/kg Kg behandelten Tieren.

Die myelinisierten Fasern der mit niedrig-dosierten DNP-behandelten Tiere zeigten einen signifikant kleiner Fläche (Mittelwert $2,89 \mu\text{m}^2$, SD $\pm 5,18$) im Vergleich zu den anderen Gruppen (Kontrolle: $5,84 \mu\text{m}^2$, SD $\pm 5,18$).

Auch bei der Mitochondriengröße zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Tiere, die mit DNP behandelt wurden, wiesen eine signifikant größere Fläche der Mitochondrien auf.

Insbesondere die Gruppe, welche mit niedrig-dosiertem 2,4-DNP behandelt wurde, wies einen hoch-signifikanten Anstieg der mitochondrialen Größe (Mittelwert $0,075 \mu\text{m}^2$, SD $\pm 0,036$ p-value $< 0,0001$), gefolgt von der Gruppe mit hohem DNP ($0,051 \mu\text{m}^2$, SD) $\pm 0,034$ p-value $< 0,0001$). Auch in den nichtmyelinisierten Fasern konnte eine Verkleinerung der Fläche der mitochondrialen Fasern beobachtet werden.

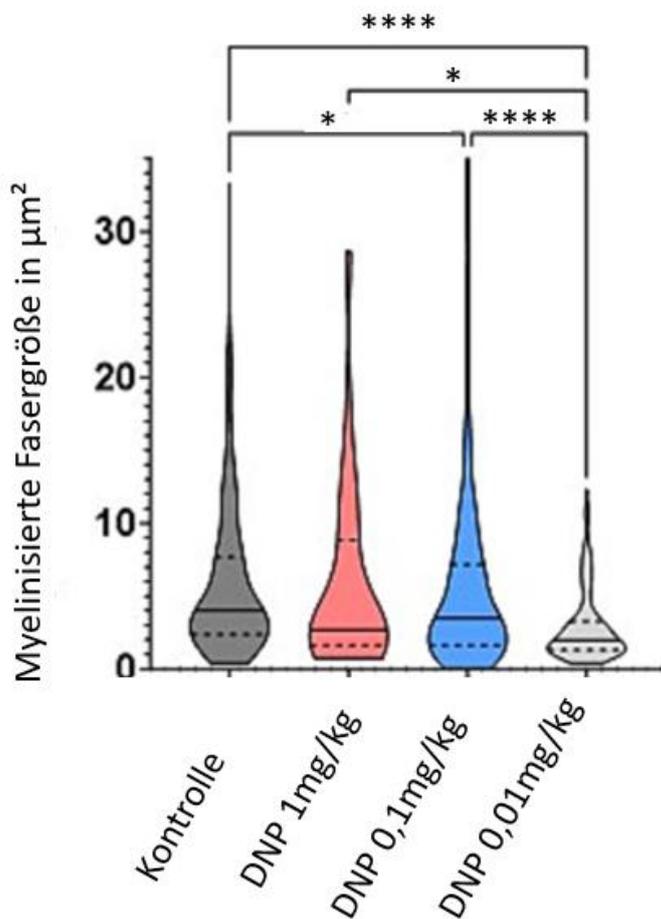


Abbildung 22: Ultrastrukturelle Charakterisierung der myelinisierten und nicht myelinisierten Fasern. Die Abbildung zeigt die Fasergröße der myelinisierten Axone in μm^2 swe jeweiligen Gruppen. Die Ergebnisse sind als iolinplot mit dem Median und den Quartilen und ihren relativen Anteilen, sortiert nach ihrer Fläche in μm^2 dargestellt. Insgesamt wurden für jeden Nerv $N \geq 40$ Fasern und $N \geq 100$ Mitochondrien in den proximalen und distalen Teilen analysiert ($n = 4$ pro Gruppe, 20-30 Sichtfelder pro Nerv und Fasertyp).

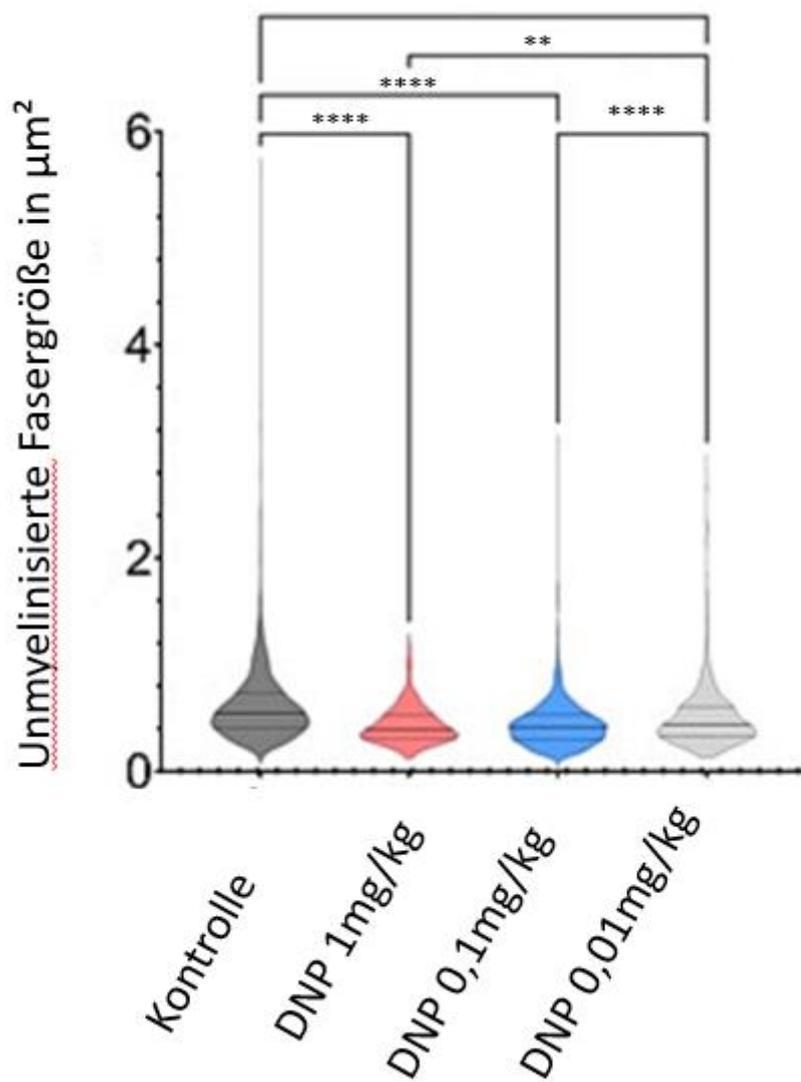


Abbildung 23: Ultrastrukturelle Charakterisierung der nicht-myelinisierten Fasern. Die Abbildung zeigt die nicht-myelinisierte Fasergröße der Axone in μm^2 in den jeweiligen Gruppen. Die Ergebnisse sind als abgeschnittener Violinplot mit dem Median und den Quartilen und ihren relativen Anteilen, sortiert nach ihrer Fläche in μm^2 , dargestellt. Insgesamt wurden für jeden Nerv $N \geq 40$ Fasern und $N \geq 100$ Mitochondrien in den proximalen und distalen Teilen analysiert ($N = 4$ pro Gruppe, 20-30 Sichtfelder pro Nerv und Fasertyp)

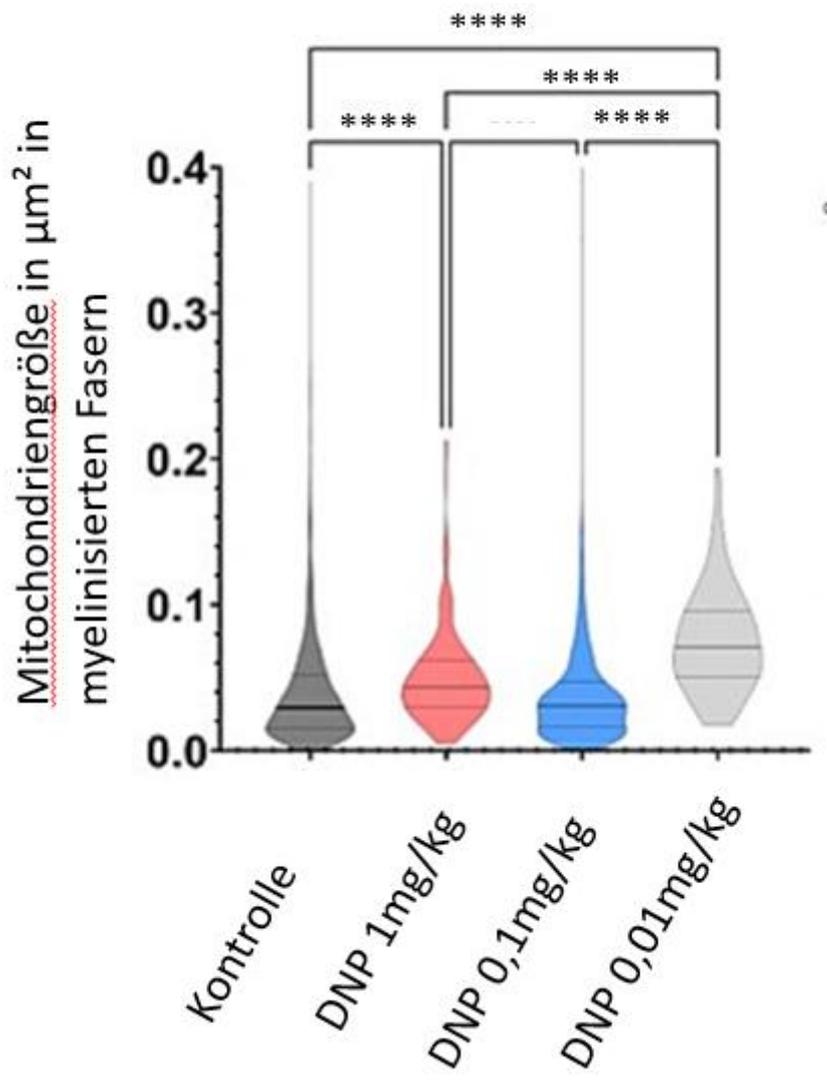


Abbildung 24: Ultrastrukturelle Charakterisierung der Mitochondriengröße. Die Ergebnisse sind als abgeschnittener Violinplot mit dem Median und den Quartilen und ihren relativen Anteilen, sortiert nach ihrer Fläche in μm^2 , dargestellt. Insgesamt wurden für jeden Nerv $N \geq 40$ Fasern und $N \geq 100$ Mitochondrien in den proximalen und distalen Teilen analysiert ($N = 4$ pro Gruppe, 20-30 Sichtfelder pro Nerv und Fasertyp).

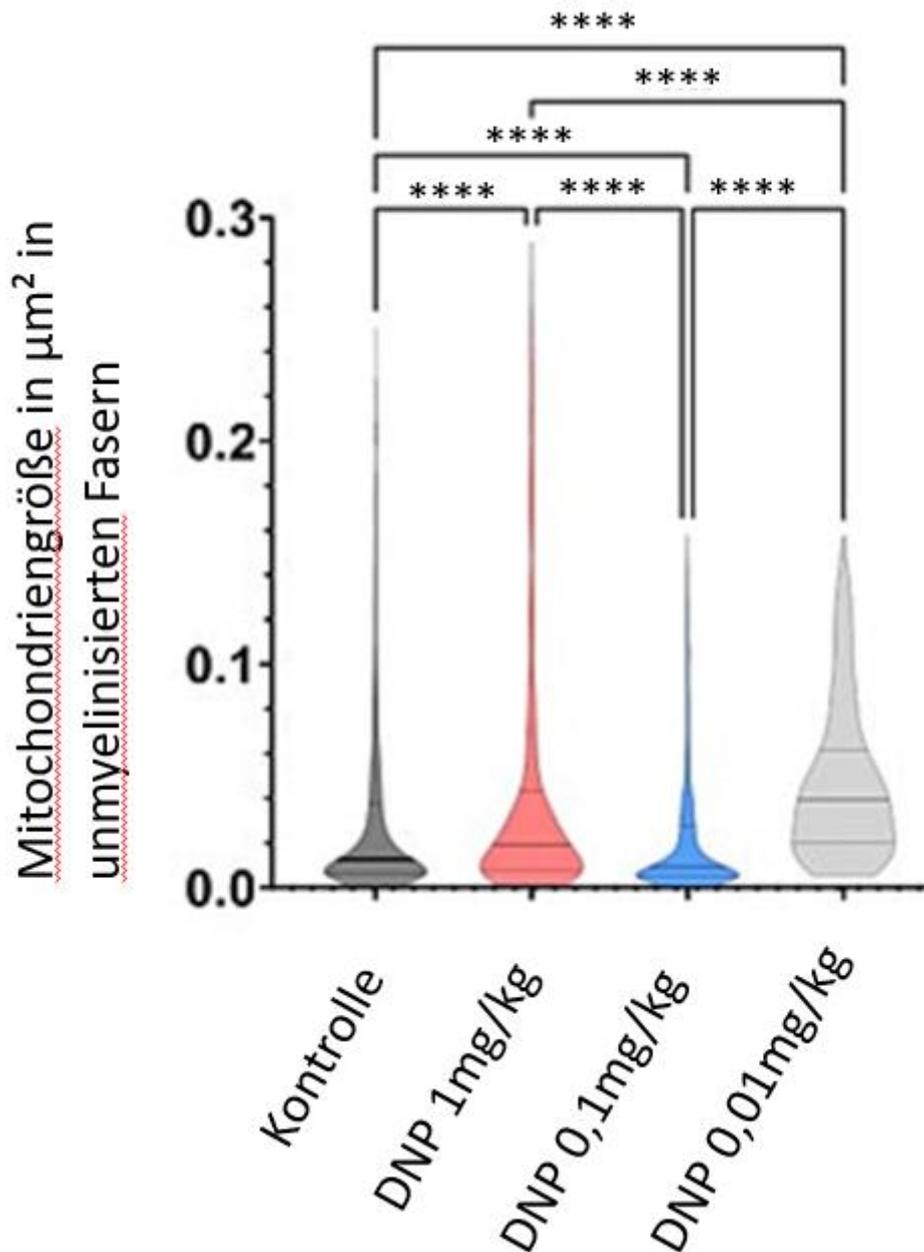


Abbildung 25: Ultrastrukturelle Charakterisierung der Mitochondriengröße dernicht-myelinisierten Fasern. Die Ergebnisse sind als abgeschnittener Violinplot mit dem Median und den Quartilen und ihren relativen Anteilen, sortiert nach ihrer Fläche in μm^2 dargestellt. Insgesamt wurden für jeden Nerv $N \geq 40$ Fasern und $N \geq 100$ Mitochondrien in den proximalen und distalen Teilen analysiert ($N = 4$ pro Gruppe, 20-30 Sichtfelder pro Nerv und Fasertyp).

4.1.9. 2,4-DNP führt zu keiner Veränderung der histologischen Inflammation

Zur Darstellung möglicher subklinischer Auswirkung auf die Entzündungsreaktion untersuchten wir in der Gruppe der mit 1 mg/kg Kg 2,4-DNP behandelten Tiere die histologische Entzündungsreaktion. Wir nutzten hierbei die Gruppe mit der höchsten Dosierung, um mögliche subklinische Veränderungen darzustellen. Anhand einer CD3+-Färbung zur Darstellung der T-

Zellen sowie anhand einer Iba1+-Färbung als Marker für Makrophagen verglichen wir die 2,4-DNP-Gruppe mit der Kontrollgruppe. In der mit 2,4-DNP-behandelten Gruppe zeigte sich eine leichtgradige, signifikante erhöhte Infiltration von Makrophagen 0,45 %, SD \pm 0,22, im Vergleich zur Kontrolle: 0,29,%, SD \pm 0,16)

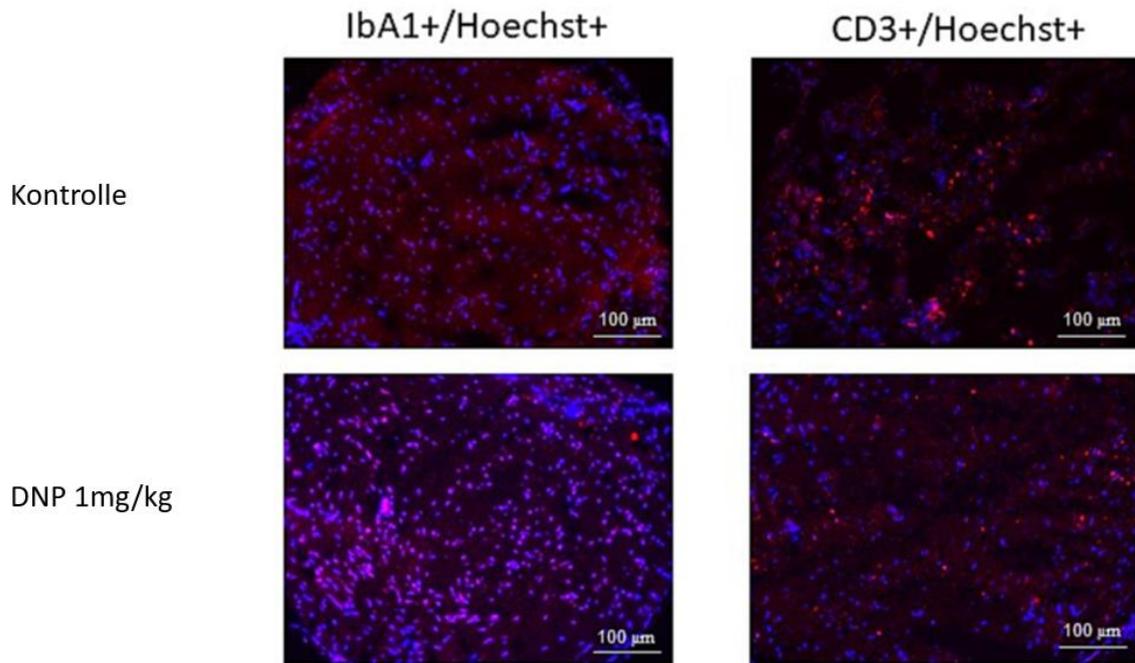


Abbildung 26: Beispielhafte Darstellung der Immunhistochemie. Zu sehen sind zwei Querschnitte des N. Ischiadicus aus der 2,4-DNP-Gruppe (1mg/kg Kg) und der Kontrollgruppe. In blau sind die angefärbten Zellkerne (Hoechst) dargestellt, die T-Zellen wurden mittels eines CD3-Antikörpers angefärbt (untere Abbildung rot) und die Makrophagen mittels eines Iba1-Antikörpers (Obere Abbildung rot).

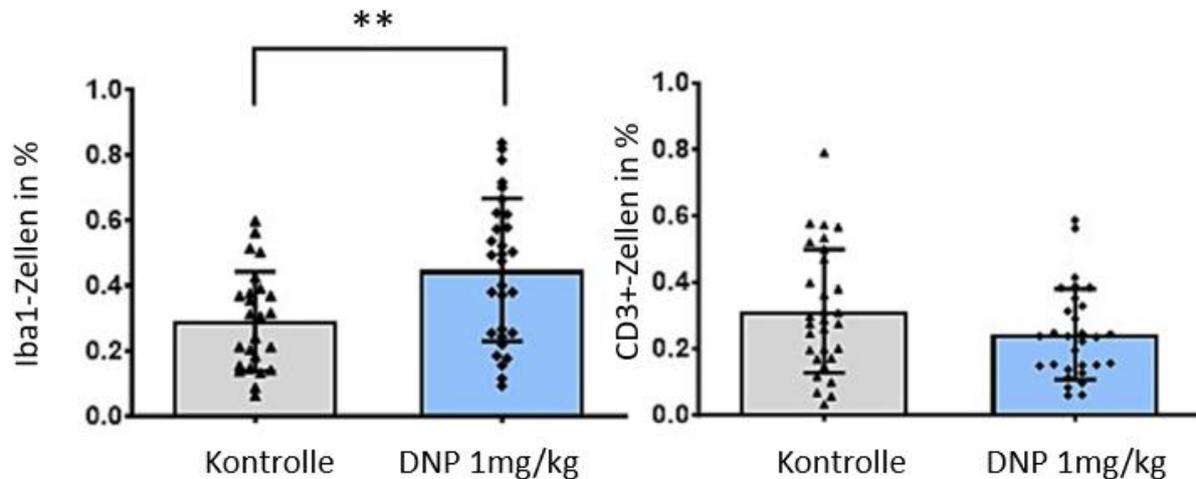


Abbildung 27: Für die Immunhistochemie wurden 7-10 Nerven pro Gruppe analysiert (N= 25-30). Durchgeführt wurde ein Mann-Whitney T-Test. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

4.1.10. 2,4-DNP hat keine Auswirkung auf die Remyelinisierung, induziert jedoch eine erhöhten BDNF-Expression

Zur Darstellung möglicher Auswirkung auf die Remyelinisierung wurde eine semi-quantitative Fluoromyelin-Färbung genutzt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Gruppen. Im Gegensatz dazu war die Anzahl an BDNF-exprimierenden Zellen in der 2,4-DNP-Gruppe (1mg/kg) signifikant erhöht. (Kontrolle: Mittelwert 0,009 % ± 0,16 SD; für DNP: 0,024 % ± 0,032 SD), p-value?.

Fluoromyelin+/Hoechst+

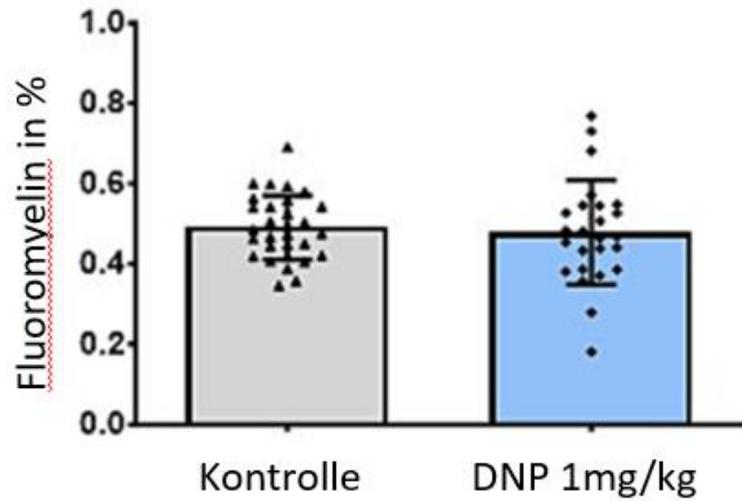
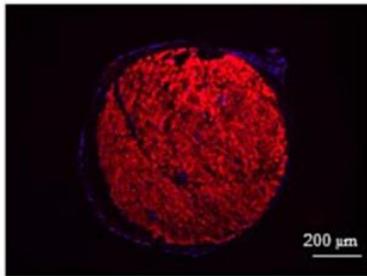
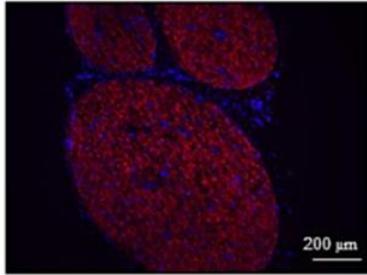


Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung der Fluoromyelin-Färbung und ihre semi-quantitative Auswertung (rechts).

BDNF+/Hoechst+

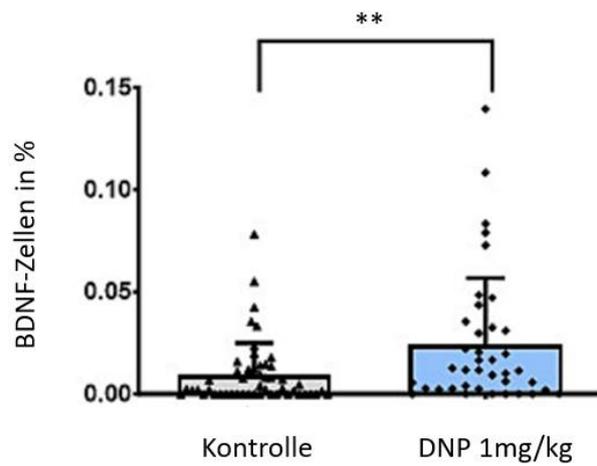
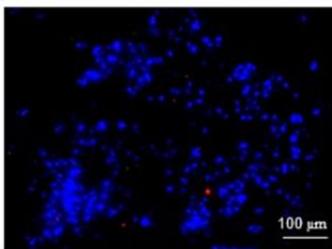
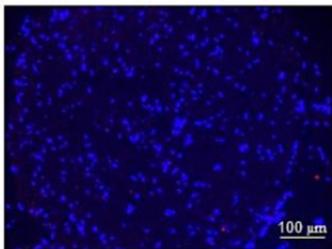


Abbildung 29: Beispielhafte Darstellung der BDNF-Färbung. Für jede Immunhistochemie wurden 4-5 Nerven pro Gruppe analysiert und ausgewertet (rechts).

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung der beiden neuro-regenerativen Substanzen Monastrol und 2,4-Dinitrophenol auf die Regenerationsphase der experimentellen Autoimmunen Neuritis zu beschreiben. Die Anwendung bereits bekannter Arzneimittel für neue Behandlungsfelder wird auch als „drug repurposing“ bezeichnet, welcher insbesondere bei seltenen und heterogenen Erkrankungen wertvoll ist.⁶⁸

Die Entdeckung und Entwicklung neuartiger Arzneimittel ist zeit- und kostenintensiv. Vor allem bei Erkrankungen mit niedriger Inzidenz kann dieser Faktor limitierend für die Entwicklung neuer Behandlungsoptionen sein. Auch die Rekrutierung für klinische Studien kann aufgrund der geringen Inzidenzen langwierig sein.⁶⁹ Insgesamt kann der Ansatz des „drug repurposing“, also der Umnutzung bereits bekannter Substanzen bei anderen Erkrankungen Gesamtentwicklungszeit und die Gesamtkosten bis zum Einsatz am Patienten reduzieren.⁷⁰

Bisherige Therapieoptionen bei GBS bestehen einerseits aus Immunadsorption/Plasmapharese sowie andererseits aus der Gabe von intravenösen Immunglobulinen. Beides zielt auf eine temporäre Suppression des Immunsystems ab. Hierbei wird versucht, den Schaden auf die Nerven durch die verschiedenen Komponenten des Immunsystems möglichst gering zu halten. In der Akut-Situation sind diese Therapieoptionen wichtige Bausteine im Heilungsprozess, indem sie die Krankheitsstärke abschwächen und den Schaden auf die Nerven reduzieren. Die Behandlung erfolgt also vor der Regenerationsphase.²⁶

Bei einem Teil der Patienten zeigt sich jedoch keine ausreichende Wirkung und Residuen verbleiben zurück. Dauerhafte neurologische Funktionsstörungen schränken stark die Lebensqualität der Betroffenen ein. In diesen Fällen erfolgt die Behandlung insbesondere durch Rehabilitationsmaßnahmen mit physiotherapeutischer Übungen.^{24,71}

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Gabe eines Kinesin-5-Inhibitors im Tiermodell den Verlauf der Regenerationsphase der experimentellen autoimmunen Neuritis positiv beeinflusst.⁶⁴ Wir beobachteten neben deutlichen klinischen Effekten eine schnellere Erholung der histologischen Inflammation und eine gesteigerte Remyelinisierung mit positiven elektrophysiologische Auswirkung.⁶⁴ Auch im neuromuskulären Übergang konnten positive Effekte beobachtet werden.

Die in den GBS-Patienten beobachtete Synaptopathie wird als ein Faktor der auftretenden Muskelschwäche gesehen.⁶⁵ Die Abminderung dieser Synaptopathie könnte also mit zur klinischen Besserung beigetragen haben. Dies würden einen Behandlungsansatz ermöglichen.

Häufig besteht die Schwierigkeit in Versuchen, eine neuroprotektive Wirkung von einer neuroregenerativen Wirkung abzugrenzen. In unserem Versuchsaufbau konnten wir gezielt die neuroregenerative Wirkung beobachten, indem wir die Injektionen nahe am Krankheitsmaximum begonnen haben. Die Medikamentengabe konzentriert sich also ausschließlich auf die Erholungsphase.

Unsere Versuchsreihe erfolgte mithilfe des Tiermodells der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN). Durch die Immunisierung von PNS Myeline (P0, P2) kommt es zu einem zumeist monophasischen Verlauf mit Ataxie und Lähmung nach ca. 2 Wochen Latenzzeit.⁷² Prinzipiell lässt sich die EAN in verschiedenen Tieren (Meerschweinchen, Kaninchen, Mäuse) auslösen, zumeist werden jedoch wie in unseren Versuchen Ratten genutzt. Dabei handelt es sich insgesamt um ein weit anerkanntes Tiermodell für die AIDP.^{29,32} Doch auch dieses Tiermodell hat seine Limitationen. Neben dem molekularen Mimikry als Ursache für die Entstehung von GBS nach Infektionen mit *C. Jejuni*, begünstigen auch eine Reihe von genetischen Faktoren die Entstehung von Autoimmunerkrankungen.³² Diese Faktoren wurden bisher außen vor gelassen. Gene wie das NOD1 spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunantwort. So konnte gezeigt werden, dass NOD1 bei der Entstehung im Tiermodell der multiplen Sklerose, dem EAE beteiligt ist. Darüber hinaus zeigte sich, dass Tiere mit einer NOD-Defizienz nach Immunisierung eine geringere Symptomatik zeigten.^{31,73} Weitere Versuche mit genetisch veränderten Versuchstieren wie dem NOD1-knock-out könnten neue Erkenntnisse über die Wirkweise von Monastrol im Rahmen der EAN bringen.

5.1. Therapeutische Wirkung von Monastrol

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen eine therapeutische Wirkung von Monastrol in der Erholungsphase bei der EAN. Die wiederholten Injektionen ab Tag 18 zeigten signifikante Verbesserungen in der klinischen Symptomatik sowie bei den elektrophysiologischen Untersuchungen. Ultrastrukturelle, immunhistochemische und elektrophysiologische Untersuchungen legen eine schnellere Remyelinisierung des Nervens nahe, ebenso kommt es zu einer besseren Reinnervation der neuromuskulären Endplatte an Tag 30. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass Monastrol signifikant und dosisabhängig das Nervenwachstum *in vitro* beschleunigt. Hierbei wurde der Effekt vor allem durch eine Längenzunahme des Axons generiert und nicht vermehrte Dendritenbildung.⁶⁴ Dieses wachstumsfördernde Potenzial konnte auch in einer anderen Studie gezeigt werden. Monastrol wirkt als allosterischer Hemmer von Kinesin-5 in den Neuronen. Dieses wirkt physiologischerweise dem Vordringen der Mikrotubuli

entgegen, welches für das Wachstum von Axonen erforderlich ist. Durch eine Hemmung von Eg5 kommt es zu einem stärkeren Transport von Mikrotubuli mittels Dynein in Richtung des Axons, wodurch das Wachstum verstärkt wird.⁷⁴

Mittels immunhistochemischer Färbungen konnten wir auch einen signifikanten Rückgang der CD3+ Zellen beobachten, bei gleichbleibender Makrophageninfiltration. Insbesondere in der Krankheitsinduktionsphase spielen die Antigen-spezifischen T-Zellen eine wichtige Rolle, während die Makrophagen vor allem in der späteren Effektorphase dominant sind.^{75,76} Während die T-Zellen vor allem proinflammatorisch wirken und durch Übertragung zu einer EAN mittels passiver Immunisierung führen, zeigt sich bei Makrophagen inzwischen ein ambivalenteres Bild. Während die proinflammatorischen M1 Makrophagen die Demyelinisierung fördern, spielt die Subpopulation der antiinflammatorischen M2 Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Erholung der experimentellen autoimmunen Neuritis.^{77,78} Unsere Ergebnisse könnten daher hinweisend sein auf eine schnelleren immunologischen Erholung der Nerven. Hierfür sind jedoch weitere Studien notwendig.

Kinesin-5 spielt als molekulares Motorprotein auch in der Zellteilung eine wichtige Rolle. Die Zellzyklusabhängige Phosphorylierung von Kinesin-5 reguliert die Lokalisation der mitotischen Spindel.⁷⁹ Die vollständige Blockierung von Kinesin-5 führt zu einem Stillstand der Mitose und zur Auslösung einer Apoptose der Zelle.⁸⁰ Daher wäre denkbar, dass der Rückgang der CD3+ Zellen weniger durch einen Rückgang der Immunantwort, als vielmehr durch eine Zelltoxizität durch die Kinesin-5-Inhibierung erklärbar wäre. Insgesamt zeigt sich in adulten, nicht proliferierendem Gewebe nur eine vernachlässigbare geringe Expression von Kinesin-5.⁸⁰ Bei Zellen aus der lymphatischen Reihe hingegen zeigen sich deutlich erhöhte Expressionen von Kinesin-5, sodass hier durch die Hemmung von Monastrol eine Beeinträchtigung entstehen könnte.⁸¹ Auch unsere Arbeitsgruppe konnte in Vergangenheit eine Veränderung der weißen Blutkörperchen durch Monastrol zeigen. Es zeigte sich eine Verringerung der Leukozyten bei kombinierter Gabe von Bortezomib und Monastrol gegenüber der alleinigen Gabe von Bortezomib.⁴⁵ Dies spricht für eine relevante Beeinflussung der Leukozyten durch Monastrol, zumindest in Kombination mit anderen zytotoxischen Medikamenten. Auch in unserer Versuchreihe führten wir Blutuntersuchungen durch, um eine eventuelle Veränderung des Blutbildes durch alleinige Monastrol-Gaben zu untersuchen. Hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen bei den Leukozyten/Erythrozyten im Blut bei den mit Monastrol behandelten Tieren.

Dennoch ist es wichtig und notwendig, eine mögliche Knochenmarkssuppression mithilfe von weiteren Versuchen zu überprüfen, da es sich hierbei um eine prinzipiell therapielimitierende Nebenwirkung handelt. Neben einer Kontrolle des Blutbildes durch einen Blutausschrieb wäre

auch die Durchführung einer Knochenmarksuntersuchung denkbar. Hierbei zeigt sich ein deutlich genaueres Bild der Blutbildung. Insbesondere die Darstellung einer kompletten Ausreifung wäre hier möglich.⁸²

Der etablierte klinische Score zur Erfassung der Erkrankungsschwere der EAN beruht insbesondere auf motorischen Symptomen. Sensible Symptome, wie Schmerz (mechanische und thermische Hyperalgesie) und Hypästhesien wurden in dieser Versuchsreihe jedoch nur unzureichend erfasst. Sie sind jedoch ebenso typische Symptome des GBS und der EAN.

Wei et. Al beschreiben jedoch, dass die Hemmung von Kinesin-5 *in vitro* und *in vivo* in Neuronen der Spinalganglia den PI3K/Akt-Signal-vermittelten VR1-Plasmamembrantransport aufhob und so pathologische Schmerzen umkehrte. Der Vanilloidrezeptor-Subtyp-1 (VR1) spielt insbesondere in der Vermittlung von neuropathischen Schmerzen eine zentrale Rolle.⁸³ Dies lässt die Vermutung zu, dass auch Monastrol als Kinesin-5-Inhibitor einen positiven Effekt auf die sensorischen Symptome haben könnte. Hier fehlen jedoch noch ausreichende Daten.⁸³

Insbesondere die positiven und negativen sensiblen Symptomen schränken neben dem häufig auftretenden Fatigue-Symptom bei GBS-Patienten die Lebensqualität ein, sodass die Notwendigkeit weiterer Studien mit Fokus auf diesen Bereich der Symptomatik besteht.

Auch ist wenig über die weiteren Wirkungen von Monastrol bekannt. Potenziell kann es zu Veränderungen bei Gliazellen und Schwann-Zellen kommen. Ebenso besteht die Möglichkeit einer Wirkung auf zerebralen Neurone. So konnte gezeigt werden, dass die *in-vitro*-Gabe von Monastrol bei unreifen primären kortikalen Neuronenkulturen zu einer Verlängerung von Dendriten sowie zu einer Verkürzung der Axone führt. Dies könnte zu einer gewissen Neurotoxizität führen, insbesondere jedoch zu Veränderung bei der Hirnentwicklung führen.⁸⁴ Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Kinesin-5 eine wichtige Rolle in der Feinabstimmung der Dendriten spielt. So kommt es bei der Neurodegeneration im Rahmen von Alzheimer zu einer Beta-Amyloid-induzierten Kinesin-5-Hemmung im Tiermodell.⁸⁵ Insgesamt zeigen Studien im Bereich der Krebstherapie mit Monastrol jedoch wenig systemische Nebenwirkungen.⁸⁰ Auch konnte kein Hinweis für negative Effekte postmitotische Effekte gefunden werden.⁷⁴

Insgesamt konnten wir zeigen, dass Monastrol einen positiven Effekt auf den neuro-regenerativen Verlauf der EAN hat zur Beurteilung einer möglichen neuroprotektiven Wirkung müssten weitere Versuche durchgeführt werden, welche die präventive, d. h. direkt nach Immunisierung und vor Symptombeginn umfassen.

5.1.1. Therapeutische Wirkung von 2,4-DNP

Auch hier erfolgten die Injektionen als Gabe an Tag 18, 22 und 26 in der Erholungsphase der EAN.

Mehrere Studien zeigten in Vergangenheit eine neuroprotektive bzw. neuroregenerative Wirkung von DNP im Tiermodell. In einem Modell für Parkinson führte die Gabe von 2,4-DNP zu einer Protektion von dopaminergen Neuronen. Auch bei Parkinson wird vermutet, dass der Untergang der dopaminergen Neurone im Zusammenhang mit einer mitochondrialen Dysfunktion steht. Der mitochondriale Entkoppler DNP entfaltet hier eine neuroprotektive Wirkung auf die Nerven, sodass der neurodegenerative Prozess verlangsamt wird.^{49,51} Auch bei einem Schlaganfall-Modell konnte eine funktionelle Besserung nachgewiesen werden. Während in der einen Studie die DNP-Gruppe eine einmalige Injektion mit einer Dosis von 5mg/kgKg erhielt, erfolgte in der anderen Studie eine tägliche Injektion von 0,5mg/kgKg über fast 6 Wochen. Daher ist insbesondere die Wahl der adäquaten Dosierung eine mögliche Hürde bei der Untersuchung von 2,4-DNP. Eine falsch-gewählte Dosierung kann eine klinische Wirkung vertuschen und ein falsch-negatives Ergebnis liefern.

Eine vorherige Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es während der EAN zu ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien kommt. Im Maximum der Krankheit kam es hierbei zu einem Anschwellen der Mitochondrien im Sinne einer Vergrößerung des mittleren Durchmessers sowie zu einer Verringerung der Mitochondrienzahl in den Axonen, insbesondere in den unmyelinisierten Fasern. Auch in den Schwann-Zellen kam es zu diesen Veränderungen, die sogar noch in der Erholungsphase persistierten.⁶⁷

Morphologische Veränderungen wie beispielsweise ein Anschwellen in Mitochondrien ist ein typische Reaktion auf von Zellen auf Stress, die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen werden.⁸⁶ Die Veränderungen werden durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials erklärt.⁸⁷

Die neuroprotektive Wirkung von 2,4-DNP ist in mehreren Studien belegt worden. Eine der Wirkweisen beruht auf dem Kalziumhaushalt der Zelle bzw. der Mitochondrien. Die Entkopplung durch 2,4-DNP führt zytoplasmatisch zu einer Erhöhung des Kalziumspiegels, intramitochondrial jedoch zu einer Verringerung des Kalziumspiegels. Dies führt zu einem verringertem oxidativem Stress in den Mitochondrien.⁵⁴ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 2,4-DNP Mitochondrien von Neuronen vor Glucose- und Sauerstoffmangel schützt und freie Radikale von intramitochondrial nach extramitochondrial führen konnte. All dies mündete in einer

Neuroprotektion mit Verhinderung der Apoptose von Neuronen durch eine verbesserte mitochondriale Funktion.⁸⁸

Ein neuroregenerativer Effekt hingegen konnte in einem N. Ischiadicus Crush-Modell gezeigt werden, bei dem die 2,4-DNP-Gabe erst nach Durchführung der Nervenverletzung gegeben worden ist.⁸⁹

Bei uns in der Versuchsreihe führte die 2,4-DNP-Gabe nach Beginn der Symptomatik zu keiner relevanten Verbesserung des klinischen oder elektrophysiologischen Verlaufs.

In Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Neuroinflammation die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigen kann und somit zur Apoptose der Neuronen führen kann.⁹⁰

In Vergangenheit führte die Gabe von 2,4-DNP bereits zu dosisabhängigen morphologischen Veränderungen in Mitochondrien. Die Daten bei niedriger Dosierung hierfür sind widersprüchlich, teilweise wird jedoch eine Schwellung von Mitochondrien durch eine milde Entkopplung beobachtet.^{91,92} Höhere Dosierungen führten ebenfalls zu einer Schwellung der Mitochondrien. Hierbei wird jedoch eine komplexe Wirkung vermutet, die mehr über eine einfache Entkopplung hinaus geht.⁹¹

Grundsätzlich kann eine veränderte Morphologie der Mitochondrien (Schwellung, Fragmentierung etc.) auch durch oxidativen Stress auf die Zelle entstehen.⁸⁶ Auch durch Temperaturveränderungen oder im Prozess der Alterung verändert sich die ultrastrukturelle Gestalt der Mitochondrien.⁹³

Bei unserer Auswertung zeigte sich eine Verringerung des axonalen Durchmessers sowohl in den myelinisierten als auch in den nicht-myelinisierten Fasern. Da axonale Schwellung bei Entzündung und neuronalem Stress auftritt, kann dies als indirektes Zeichen einer Verringerung der Entzündung bzw. des neuronalen Stress gewertet werden.^{94,95}

In Bezug auf die Mitochondrienmorphologie zeigten sich uneindeutige Ergebnisse. In mehreren Studien wurden bereits Veränderungen der Mitochondrienmorphologie durch 2,4-DNP beobachtet. Einige Autoren berichten von einer Schwellung der Mitochondrien aufgrund der milden Entkopplung⁹². In einer anderen Studie hingegen wird der verringerte Kalziumeinstrom in die Mitochondrien als Grund für eine unveränderte Morphologie gesehen⁹⁶.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die DNP-Behandlung das Potenzial der Mitochondrienmembran verringert, den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel erhöht und den oxidativen Stress in Neuronen der Großhirnrinde reduziert. Dies mündete auch in einer Erhöhung der BDNF-Konzentration.⁵⁶

Die Regulierung von BDNF erfolgt zu Teilen durch die Erhöhung von cyclischem Adenylatmonophosphat (cAMP). Da dieses wiederum durch den Kalziumspiegel der Zellen beeinflusst wird, kann BDNF auch durch 2,4-DNP gesteigert werden. Dies konnte in vergangenen Studien bestätigt werden.⁹⁷ Auch hier zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt.⁵⁴

Auch in unseren Versuchen zeigte sich eine Hochregulierung von BDNF bei den mit DNP behandelten Tieren. Als neurotropher Faktor spielt BDNF eine wichtige Rolle in der Neuroregeneration und Neuroprotektion.⁹⁸ Studien zeigen, dass BDNF allein in der Lage ist, den Verlauf der EAN positiv zu modulieren.⁹⁹ Möglicherweise reicht die Hochregulierung von BDNF hier nicht aus, um eine signifikante Veränderung in der Symptomatik sowie in den elektrophysiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen zu zeigen.

Es ist nicht auszuschließen, dass (noch) höhere Dosierung des Entkopplers DNP zu einer sichtbaren neuroregenerativen Wirkung führt.

In unseren Versuchen nutzten wir Dosierungen, die sich in anderen Studien als wirksam erwiesen haben. Zumeist erfolgten Dosierungen im Bereich von 0,01-5mg/kg 2,4-DNP.¹⁰⁰ Bei einmaliger Injektion wurden zumeist höhere Dosierungen bis 20mg/kg gewählt, wobei die Dosis die der mehrtägigen kumulativen Dosis vergleichbar ist.⁵¹ Höhere Dosierungen bergen jedoch die Gefahr von toxischen Nebenwirkungen.^{48,101}

Zusammenfassend zeigte sich in unseren Experimenten kein Einfluss von 2,4-DNP auf den klinischen oder den elektrophysiologischen Verlauf der EAN in der Erholungsphase. Prinzipiell ist denkbar, dass höhere Dosierungen zu einer klinischen oder elektrophysiologischen Verbesserung der EAN führen. In Vergangenheit zeigten sich jedoch toxische Nebenwirkungen mit Todesfolgen bei höheren Dosierungen, sodass wir aufgrund der 3R-Regel auf weitere Experimente verzichteten.¹⁰²

Bisher gibt es jedoch keine ernstzunehmende Therapieoption, die auf eine neuroregenerative Wirkung basiert. Hierbei würde die Heilung der bereits entstandenen Nervenschäden im Fokus stehen.²⁶ Denn nicht bei allen Patienten gelingt die vollständige Heilung mithilfe der Plasmapheresen und/oder den IVIGs. Ein Teil der Patienten klagt über sensible Defizite wie Schmerzen einerseits, aber auch motorische Einschränkungen andererseits. Dies kann zu schweren Einschränkungen der Lebensqualität bei GBS-Patienten führen. Auch ein auftretendes Fatigue-Syndrom kann die Lebensqualität deutlich mindern. Vor allem bei jungen Patienten zwischen 30 und 50 Jahren kommt es häufig zu dauerhaften Behinderungen durch die Erkrankung. Aus diesem Grund sind weitere Studien zur Verbesserung der neurologischen Funktion

in EAN und GBS nötig. Insbesondere Monastrol halten wir für eine vielversprechende Substanz, mit der weitere Studien neue Erkenntnisse bringen können.

5.2. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PATHOGENESE	15
ABBILDUNG 2: WIRKUNGSWEISE KINESIN-5	19
ABBILDUNG 3: AUFBAU DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG.	28
ABBILDUNG 4: DURCHSCHNITTLICHER KLINISCHER SCORE VON TAG 0 BIS TAG 30	32
ABBILDUNG 5: AREA UNDER THE CURVE	33
ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG DER MOTORISCHEN NERVENLEITGESCHWINDIGKEIT (MNCV IN M/SEC.)	34
ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DER CMAP (IN MV)	35
ABBILDUNG 8 IMMUNHISTOCHEMIE	36
ABBILDUNG 9: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE	36
ABBILDUNG 10: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG DER FLUOROMYELIN-FÄRBUNG	37
ABBILDUNG 11: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER FLUOROMYELIN-FÄRBUNG	38
ABBILDUNG 12: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG DER BEHANDELTEN ZELLKULTUREN	40
ABBILDUNG 13: DARSTELLUNG DER LÄNGE DER NEURITEN IN μM DER EINZELNEN GRUPPEN	41
ABBILDUNG 14: DARSTELLUNG DER LÄNGE IN μM IN BEZUG AUF PRIMÄR, SEKUNDÄR UND TERTIÄREN NEURONEN IM VERGLEICH	41
ABBILDUNG 15: ULTRASTRUKTURELLE AUFNAHME	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
ABBILDUNG 16: NMJ	42
ABBILDUNG 17: BLUTAUSSTRICH	43
ABBILDUNG 18: DURCHSCHNITTLICHER KLINISCHER SCORE VON TAG 9 BIS TAG 30 NACH DER IMMUNISIERUNG	44
ABBILDUNG 19: AREA UNDER THE CURVE DNP	45
ABBILDUNG 20 DARSTELLUNG DER MOTORISCHEN NERVENLEITGESCHWINDIGKEIT (MNCV IN M/SEC.) BEI DNP	46
ABBILDUNG 21: DARSTELLUNG DER CMAP (IN MV) BEI DNP	47
ABBILDUNG 22: ULTRASTRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DER MYELINISIERTEN UND NICHT MYELINISIERTEN FASERN	48
	64

ABBILDUNG 23: : ULTRASTRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DER UNMYELINISIERTEN UND NICHT MYELINISIERTEN FASERN	49
ABBILDUNG 24: : ULTRASTRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIENGRÖÙE IN MYELINISIERTEN FASERN	50
ABBILDUNG 25: ULTRASTRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIENGRÖÙE IN UNMYELINISIERTEN FASERN	51
ABBILDUNG 26: IMMUNHISTOCHEMIE DNP	52
ABBILDUNG 27: STATISTISCHE AUSWERTUNG IMMUNHISTOCHEMIE DNP	53
ABBILDUNG 28: FLUOROMYELIN-FÄRBUNG	54
ABBILDUNG 29: BDNF-FÄRBUNG	54

5.3. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: SUBTYPEN GBS	14
TABELLE 2: KLINISCHER SCORE EAN	26

6. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

2,4-Dinitrophenol does not exert neuro-regenerative potential in experimental autoimmune neuritis.

Kohle F, Ackfeld R, Klein I, Svačina MKR, Schneider C, van Beers T, Grandoch A, Fink GR, Lehmann HC, Barham M.

Neurosci Lett. 2023 Sep 25;814:137456. doi: 10.1016/j.neulet.2023.137456. Epub 2023 Aug 28. PMID: 37648059

Kinesin-5 inhibition improves neural regeneration in experimental autoimmune neuritis.

Kohle F, Ackfeld R, Hommen F, Klein I, Svačina MKR, Schneider C, Fink GR, Barham M, Vilchez D, Lehmann HC.

J Neuroinflammation. 2023 Jun 9;20(1):139. doi: 10.1186/s12974-023-02822-w. PMID: 37296476

7. Literaturverzeichnis

1. Dimachkie MM, Barohn RJ. Guillain-Barre syndrome and variants. *Neurol Clin* 2013; **31**(2): 491-510.
2. Mathis S, Soulages A, Vallat JM, Le Masson G. History of acute polyradiculoneuropathy (part 1): The prehistory of Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 2020; **94**(19): 828-35.
3. Skalski P, Owecki MK, Magowska AM. Jean Baptiste Octave Landry (1866-1940). *J Neurol* 2019; **266**(9): 2341-3.
4. Malek E, Salameh J. Guillain-Barre Syndrome. *Semin Neurol* 2019; **39**(5): 589-95.
5. Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW. Population incidence of Guillain-Barre syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 2011; **36**(2): 123-33.
6. Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 2016; **388**(10045): 717-27.
7. Walling AD, Dickson G. Guillain-Barré syndrome. *Am Fam Physician* 2013; **87**(3): 191-7.
8. Hughes RA, Cornblath DR. Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 2005; **366**(9497): 1653-66.
9. van den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barre syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol* 2014; **10**(8): 469-82.
10. Shang P, Feng J, Wu W, Zhang HL. Intensive Care and Treatment of Severe Guillain-Barré Syndrome. *Front Pharmacol* 2021; **12**: 608130.
11. Jasti AK, Selmi C, Sarmiento-Monroy JC, Vega DA, Anaya JM, Gershwin ME. Guillain-Barre syndrome: causes, immunopathogenic mechanisms and treatment. *Expert Rev Clin Immunol* 2016; **12**(11): 1175-89.
12. Alessandro L, Pastor Rueda JM, Wilken M, et al. Differences between acute-onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and acute inflammatory demyelinating polyneuropathy in adult patients. *J Peripher Nerv Syst* 2018; **23**(3): 154-8.
13. Feasby TE, Gilbert JJ, Brown WF, et al. An acute axonal form of Guillain-Barré polyneuropathy. *Brain* 1986; **109 (Pt 6)**: 1115-26.
14. Al Othman B, Raabe J, Kini A, Lee AG. Update: the Miller Fisher variants of Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Ophthalmol* 2019; **30**(6): 462-6.
15. Kaida K. Guillain-Barré Syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2019; **1190**: 323-31.
16. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. Campylobacter species and Guillain-Barré syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**(3): 555-67.
17. Tam CC, Rodrigues LC, Petersen I, Islam A, Hayward A, O'Brien SJ. Incidence of Guillain-Barré syndrome among patients with Campylobacter infection: a general practice research database study. *J Infect Dis* 2006; **194**(1): 95-7.
18. Koike H, Chiba A, Katsuno M. Emerging Infection, Vaccination, and Guillain-Barré Syndrome: A Review. *Neurol Ther* 2021; **10**(2): 523-37.
19. Sejvar JJ, Kohl KS, Gidudu J, et al. Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine* 2011; **29**(3): 599-612.
20. Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1990; **27 Suppl**: S21-4.
21. Thomma RCM, Fokke C, Walgaard C, et al. High and Persistent Anti-GM1 Antibody Titers Are Associated With Poor Clinical Recovery in Guillain-Barré Syndrome. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2023; **10**(4).
22. Visser LH, Schmitz PI, Meulstee J, van Doorn PA, van der Meché FG. Prognostic factors of Guillain-Barré syndrome after intravenous immunoglobulin or plasma exchange. Dutch Guillain-Barré Study Group. *Neurology* 1999; **53**(3): 598-604.
23. Netto AB, Taly AB, Kulkarni GB, Rao UG, Rao S. Mortality in mechanically ventilated patients of Guillain Barre Syndrome. *Ann Indian Acad Neurol* 2011; **14**(4): 262-6.

24. Meythaler JM. Rehabilitation of Guillain-Barré syndrome. *Arch Phys Med Rehabil* 1997; **78**(8): 872-9.
25. van Doorn PA. Diagnosis, treatment and prognosis of Guillain-Barré syndrome (GBS). *Presse Med* 2013; **42**(6 Pt 2): e193-201.
26. Liu S, Dong C, Ubogu EE. Immunotherapy of Guillain-Barré syndrome. *Hum Vaccin Immunother* 2018; **14**(11): 2568-79.
27. Chevret S, Hughes RA, Annane D. Plasma exchange for Guillain-Barre syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; **2**(2): CD001798.
28. Hughes RA, Brassington R, Gunn AA, van Doorn PA. Corticosteroids for Guillain-Barre syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; **10**(10): CD001446.
29. Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 2000; **6**(2): 88-91.
30. Shin T, Ahn M, Matsumoto Y, Moon C. Mechanism of experimental autoimmune neuritis in Lewis rats: the dual role of macrophages. *Histol Histopathol* 2013; **28**(6): 679-84.
31. Mäurer M, Gold R. Animal models of immune-mediated neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2002; **15**(5): 617-22.
32. Soliven B. Animal models of autoimmune neuropathy. *Ilar j* 2014; **54**(3): 282-90.
33. Schroeter M, Kieseier BC, Köller H, Hartung H-P. 19 - Immune-Mediated Neuropathies. In: Gilman S, ed. *Neurobiology of Disease*. Burlington: Academic Press; 2007: 205-15.
34. Harvey GK, Toyka KV, Hartung HP. Effects of mast cell degranulation on blood-nerve barrier permeability and nerve conduction in vivo. *J Neurol Sci* 1994; **125**(1): 102-9.
35. Craggs RI, King RH, Thomas PK. The effect of suppression of macrophage activity on the development of experimental allergic neuritis. *Acta Neuropathol* 1984; **62**(4): 316-23.
36. Sajic M, Ida KK, Canning R, Gregson NA, Duchen MR, Smith KJ. Mitochondrial damage and "plugging" of transport selectively in myelinated, small-diameter axons are major early events in peripheral neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2018; **15**(1): 61.
37. Areti A, Yerra VG, Komirishetty P, Kumar A. Potential Therapeutic Benefits of Maintaining Mitochondrial Health in Peripheral Neuropathies. *Curr Neuropharmacol* 2016; **14**(6): 593-609.
38. Han SM, Baig HS, Hammarlund M. Mitochondria Localize to Injured Axons to Support Regeneration. *Neuron* 2016; **92**(6): 1308-23.
39. Hunter B, Allingham JS. These motors were made for walking. *Protein Sci* 2020; **29**(8): 1707-23.
40. Prokop A. The intricate relationship between microtubules and their associated motor proteins during axon growth and maintenance. *Neural Dev* 2013; **8**: 17.
41. Chen Y, Hancock WO. Kinesin-5 is a microtubule polymerase. *Nat Commun* 2015; **6**: 8160.
42. Myers KA, Baas PW. Kinesin-5 regulates the growth of the axon by acting as a brake on its microtubule array. *J Cell Biol* 2007; **178**(6): 1081-91.
43. Baas PW, Matamoros AJ. Inhibition of kinesin-5 improves regeneration of injured axons by a novel microtubule-based mechanism. *Neural Regen Res* 2015; **10**(6): 845-9.
44. Maliga Z, Kapoor TM, Mitchison TJ. Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Chem Biol* 2002; **9**(9): 989-96.
45. Bobylev I, Peters D, Vyas M, et al. Kinesin-5 Blocker Monastrol Protects Against Bortezomib-Induced Peripheral Neurotoxicity. *Neurotox Res* 2017; **32**(4): 555-62.
46. Geisler JG. 2,4 Dinitrophenol as Medicine. *Cells* 2019; **8**(3).
47. Cohen PA, Goday A, Swann JP. The return of rainbow diet pills. *Am J Public Health* 2012; **102**(9): 1676-86.
48. Grundlingh J, Dargan PI, El-Zanfaly M, Wood DM. 2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J Med Toxicol* 2011; **7**(3): 205-12.
49. Kishimoto Y, Johnson J, Fang W, et al. A mitochondrial uncoupler prodrug protects dopaminergic neurons and improves functional outcome in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2020; **85**: 123-30.

50. Korde AS, Pettigrew LC, Craddock SD, Maragos WF. The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2005; **94**(6): 1676-84.
51. Lee Y, Heo G, Lee KM, et al. Neuroprotective effects of 2,4-dinitrophenol in an acute model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2017; **1663**: 184-93.
52. Wasilewska-Sampaio AP, Silveira MS, Holub O, et al. Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound. *Faseb j* 2005; **19**(12): 1627-36.
53. Bando Y, Geisler JG. Disease modifying mitochondrial uncouplers, MP101, and a slow release ProDrug, MP201, in models of Multiple Sclerosis. *Neurochem Int* 2019; **131**: 104561.
54. Geisler JG, Marosi K, Halpern J, Mattson MP. DNP, mitochondrial uncoupling, and neuroprotection: A little dab'll do ya. *Alzheimers Dement* 2017; **13**(5): 582-91.
55. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 2014; **20**(7): 1126-67.
56. Liu D, Zhang Y, Gharavi R, et al. The mitochondrial uncoupler DNP triggers brain cell mTOR signaling network reprogramming and CREB pathway up-regulation. *J Neurochem* 2015; **134**(4): 677-92.
57. Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G. BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(3).
58. King RH, Craggs RI, Gross ML, Thomas PK. Effects of glucocorticoids on experimental allergic neuritis. *Exp Neurol* 1985; **87**(1): 9-19.
59. Enders U, Lobb R, Pepinsky RB, Hartung HP, Toyka KV, Gold R. The role of the very late antigen-4 and its counterligand vascular cell adhesion molecule-1 in the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis of the Lewis rat. *Brain* 1998; **121 (Pt 7)**: 1257-66.
60. Kohle F, Sprenger A, Klein I, Fink GR, Lehmann HC. Nerve conduction studies in experimental models of autoimmune neuritis: A meta-analysis and guideline. *J Neuroimmunol* 2021; **352**: 577470.
61. Tuck RR, Antony JH, McLeod JG. F-wave in experimental allergic neuritis. *J Neurol Sci* 1982; **56**(2-3): 173-84.
62. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**(7): 676-82.
63. Chomiak T, Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* 2009; **4**(11): e7754.
64. Kohle F, Ackfeld R, Hommen F, et al. Kinesin-5 inhibition improves neural regeneration in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroinflammation* 2023; **20**(1): 139.
65. Plomp JJ, Willison HJ. Pathophysiological actions of neuropathy-related anti-ganglioside antibodies at the neuromuscular junction. *J Physiol* 2009; **587**(Pt 16): 3979-99.
66. Auld DS, Robitaille R. Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *Neuroscientist* 2003; **9**(2): 144-57.
67. Muke I, Sprenger A, Bobylev I, et al. Ultrastructural characterization of mitochondrial damage in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* 2020; **343**: 577218.
68. Kohle F, Dalakas MC, Lehmann HC. Repurposing MS immunotherapies for CIDP and other autoimmune neuropathies: unfulfilled promise or efficient strategy? *Ther Adv Neurol Disord* 2023; **16**: 17562864221137129.
69. Roessler HI, Knoers N, van Haelst MM, van Haften G. Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2021; **42**(4): 255-67.
70. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 2019; **18**(1): 41-58.
71. Sung EJ, Kim DY, Chang MC, Ko EJ. Prediction of Functional Outcome in Axonal Guillain-Barre Syndrome. *Ann Rehabil Med* 2016; **40**(3): 481-8.
72. Gabriel CM, Hughes RA, Moore SE, Smith KJ, Walsh FS. Induction of experimental autoimmune neuritis with peripheral myelin protein-22. *Brain* 1998; **121 (Pt 10)**: 1895-902.

73. Shaw PJ, Barr MJ, Lukens JR, et al. Signaling via the RIP2 adaptor protein in central nervous system-infiltrating dendritic cells promotes inflammation and autoimmunity. *Immunity* 2011; **34**(1): 75-84.
74. Haque SA, Hasaka TP, Brooks AD, Lobanov PV, Baas PW. Monastrol, a prototype anti-cancer drug that inhibits a mitotic kinesin, induces rapid bursts of axonal outgrowth from cultured postmitotic neurons. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004; **58**(1): 10-6.
75. Mausberg AK, Szepanowski F, Odoardi F, et al. Trapped in the epineurium: early entry into the endoneurium is restricted to neurotogenic T cells in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroinflammation* 2018; **15**(1): 217.
76. Heininger K, Schäfer B, Hartung HP, Fierz W, Linington C, Toyka KV. The role of macrophages in experimental autoimmune neuritis induced by a P2-specific T-cell line. *Ann Neurol* 1988; **23**(4): 326-31.
77. Shen D, Chu F, Lang Y, et al. Beneficial or Harmful Role of Macrophages in Guillain-Barré Syndrome and Experimental Autoimmune Neuritis. *Mediators Inflamm* 2018; **2018**: 4286364.
78. Spies JM, Westland KW, Bonner JG, Pollard JD. Intraneural activated T cells cause focal breakdown of the blood-nerve barrier. *Brain* 1995; **118 (Pt 4)**: 857-68.
79. Ferenz NP, Gable A, Wadsworth P. Mitotic functions of kinesin-5. *Semin Cell Dev Biol* 2010; **21**(3): 255-9.
80. Wang Y, Wu X, Du M, et al. Eg5 inhibitor YL001 induces mitotic arrest and inhibits tumor proliferation. *Oncotarget* 2017; **8**(26): 42510-24.
81. Exertier P, Javerzat S, Wang B, et al. Impaired angiogenesis and tumor development by inhibition of the mitotic kinesin Eg5. *Oncotarget* 2013; **4**(12): 2302-16.
82. Seiler T, Dreyling M. [Bone marrow histology from the clinical point of view]. *Pathologe* 2012; **33**(6): 490-5.
83. Wei N, Yu Y, Yang Y, et al. Inhibitions and Down-Regulation of Motor Protein Eg5 Expression in Primary Sensory Neurons Reveal a Novel Therapeutic Target for Pathological Pain. *Neurotherapeutics* 2022; **19**(4): 1401-13.
84. Yoon SY, Choi JE, Huh JW, et al. Monastrol, a selective inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, induces a distinctive growth profile of dendrites and axons in primary cortical neuron cultures. *Cell Motil Cytoskeleton* 2005; **60**(4): 181-90.
85. Kahn OI, Sharma V, González-Billault C, Baas PW. Effects of kinesin-5 inhibition on dendritic architecture and microtubule organization. *Mol Biol Cell* 2015; **26**(1): 66-77.
86. Wu S, Zhou F, Zhang Z, Xing D. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *Febs j* 2011; **278**(6): 941-54.
87. Miyazono Y, Hirashima S, Ishihara N, Kusakawa J, Nakamura KI, Ohta K. Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. *Sci Rep* 2018; **8**(1): 350.
88. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, et al. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 2003; **9**(8): 1062-8.
89. da Costa RF, Martinez AM, Ferreira ST. 2,4-Dinitrophenol blocks neurodegeneration and preserves sciatic nerve function after trauma. *J Neurotrauma* 2010; **27**(5): 829-41.
90. Russell AE, Doll DN, Sarkar SN, Simpkins JW. TNF- α and Beyond: Rapid Mitochondrial Dysfunction Mediates TNF- α -Induced Neurotoxicity. *J Clin Cell Immunol* 2016; **7**(6).
91. Bottrill D, Hanson J. The Action of 2,4-Dinitrophenol on Corn Root Mitochondria. *Australian Journal of Biological Sciences* 1969; **22**(4): 847-56.
92. Chappell JB, Greville GD. Effects of 2:4-dinitrophenol and other agents on the swelling of isolated mitochondria. *Nature* 1959; **183**(4677): 1737-8.
93. Witter RF, Mink W. Effect of synthetic detergents on the swelling and the ATPase of mitochondria isolated from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* 1958; **4**(1): 73-82.
94. Grillo FW, Canty AJ, Bloomfield P, De Paola V. Chapter 11 - In Vivo Visualization of Single Axons and Synaptic Remodeling in Normal and Pathological Conditions. In: Rockland KS, ed. *Axons and Brain Architecture*. San Diego: Academic Press; 2016: 221-43.

95. Wu YT, Gilpin K, Adnan A. Effects of Focal Axonal Swelling Level on the Action Potential Signal Transmission. *J Comput Neurosci* 2020; **48**(3): 253-63.
96. Pandya JD, Pauly JR, Nukala VN, et al. Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. *J Neurotrauma* 2007; **24**(5): 798-811.
97. De Felice FG, Wasilewska-Sampaio AP, Barbosa AC, Gomes FC, Klein WL, Ferreira ST. Cyclic AMP enhancers and Abeta oligomerization blockers as potential therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2007; **4**(3): 263-71.
98. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 2013; **138**(2): 155-75.
99. Felts PA, Smith KJ, Gregson NA, Hughes RA. Brain-derived neurotrophic factor in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* 2002; **124**(1-2): 62-9.
100. Wu B, Jiang M, Peng Q, et al. 2,4 DNP improves motor function, preserves medium spiny neuronal identity, and reduces oxidative stress in a mouse model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 2017; **293**: 83-90.
101. Tainter ML, Cutting WC, Stockton AB. Use of Dinitrophenol in Nutritional Disorders : A Critical Survey of Clinical Results. *Am J Public Health Nations Health* 1934; **24**(10): 1045-53.
102. Colman E. Dinitrophenol and obesity: an early twentieth-century regulatory dilemma. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007; **48**(2): 115-7.