Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Neurologie

Die Rolle von Biotin bei der Myelinisierung im peripheren Nervensystem

I n a u g u r a l -D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Cansu Güngör
aus Osnabrück
2024

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

ub universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/84122
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20250825-110807-6

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Stettner
2. Gutachterin:	Frau Univ.-Prof. Dr. med. K Keyvani

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2025

PUBLIKATION

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Szepanowski F, Steubing RD, **Güngör C**, Zipfel J, Mausberg AK, Kleinschnitz C, Stettner M. High-dose biotin neither fosters remyelination nor stimulates malonyl coenzyme A synthesis in the regenerating nerve. Neural Regen Res. 2023 Jul;18(7):1623-1624.

Für meinen Großvater Yusuf Güngör.

INHALTSVERZEICHNIS

PUBLIKATION **3**

1 EINLEITUNG **7**

1.1 DAS NERVENSYSTEM – ZNS VERSUS PNS 7
1.2 AUFBAU EINES PERIPHEREN NERVS 8
1.3 SCHWANNZELLEN (SCS) UND MYELINISIERUNG 9
1.4 NERVENVERLETZUNG / WALLER'SCHE DEGENERATION / REGENERATION 13
1.5 BIOTIN UND CARBOXYLASEN 18
1.6 POSTULIERTE WIRKUNG VON BIOTIN IN BEZUG AUF MYELINISIERUNG 20
1.7 ZIEL DER ARBEIT 21

2 MATERIAL UND METHODEN **22**

2.1 ZELLKULTURTECHNIKEN 22
2.1.1 Beschichtung der Zellkulturschalen 25
2.1.2 Isolierung muriner embryonaler Dorsalwurzelganglien (DRGs) 25
2.2 MYELINISIERUNGSVERSUCHE MIT DRGS 27
2.3 FÄRBUNG DER DRG-KULTUREN MIT SUDANSCHWARZ UND MIKROSKOPIE 27
2.4 QUETSCHUNG DES NERVUS ISCHIADICUS – SCIATIC NERVE CRUSH 29
2.5 ENTFERNUNG DES NERVUS ISCHIADICUS UND PRÄPARATION DER SEMIDÜNNSCHNITTE 30
2.6 BEHANDLUNG MIT HOCHDOSIERTEM BIOTIN 31
2.7 GEWICHT 31
2.8 BEWERTUNG DER NERVENFUNKTIONALITÄT MITTELS GRIFF-STÄRKE-ANALYSE 31
2.9 BEWERTUNG MORPHOMETRISCHER DATEN 31
2.10 BESTIMMUNG DER MALONYL-COA-SPIEGEL 32
2.11 BILD- UND STATISTISCHE DATENANALYSE 32

3 ERGEBNISSE **33**

3.1 EINFLUSS DER BIOTINZUGABE AUF DIE NEURONEN- UND INTERNODIENZAHL 33
3.2 EFFEKTE VON BIOTIN NACH NERVENVERLETZUNG 35
3.2.1 Einfluss der Biotinzugabe auf das Gewicht 35
3.2.2 Einfluss der Biotinzugabe auf die Griffkraft 36
3.2.3 Einfluss der Biotinzugabe auf den Malonyl-CoA-Gehalt des Nervus ischiadicus 37
3.3 EINFLUSS DER BIOTINZUGABE AUF DEN AXON-DURCHMESSER UND DIE G-RATIO 37

4 DISKUSSION **40**

5 ZUSAMMENFASSUNG **46**

6 SUMMARY **47**

7 LITERATURVERZEICHNIS **48**

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 64

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 68

10 TABELLENVERZEICHNIS 70

11 DANKSAGUNG 71

12 LEBENSLAUF 72

1 EINLEITUNG

1.1 Das Nervensystem – ZNS versus PNS

Das menschliche Nervensystem ist ein komplexes Netzwerk, das für die Verarbeitung und Übertragung von Informationen im Körper verantwortlich ist (Sousa et al., 2017). Es kann in zwei Hauptkomponenten unterteilt werden: das Zentralnervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) (Thau et al., 2023).

Das Zentralnervensystem besteht aus dem Gehirn und dem Rückenmark. Das Gehirn ist das Steuerzentrum des Körpers und verarbeitet sensorische Informationen, koordiniert motorische Funktionen und steuert alle höheren kognitiven Prozesse wie Gedächtnis, Lernen, Sprache und Emotionen (Ludwig et al., 2023). Das Rückenmark dient als Kommunikationsbrücke zwischen dem Gehirn und dem Rest des Körpers. Es überträgt sensorische Informationen vom PNS zum Gehirn und motorische Befehle vom Gehirn zum PNS (Schünke et al., 2018).

Das periphere Nervensystem umfasst alle Nerven außerhalb des Zentralnervensystems. Es verbindet das ZNS mit den sensorischen Organen, Muskeln und Drüsen im Körper (Catala & Kubis, 2013). Das PNS kann weiter in das somatische und das autonome Nervensystem unterteilt werden. Das somatische Nervensystem kontrolliert die willkürlichen Bewegungen der Skelettmuskulatur und empfängt sensorische Informationen aus der Umgebung (Sternini, 1997). Das autonome Nervensystem hingegen steuert die unwillkürlichen Funktionen des Körpers wie Herzschlag, Atmung und Verdauung. Es kann weiter in das sympathische und das parasympathische Nervensystem unterteilt werden (Schünke et al., 2018).

Obwohl das ZNS und das PNS unterschiedliche Funktionen und Strukturen haben, arbeiten sie eng zusammen, um eine effektive Kommunikation und Koordination im Körper zu gewährleisten (Goldstein, 2001). Die Nervenzellen, oder Neuronen, sind die Grundbausteine beider Systeme. Diese spezialisierten Zellen sind in der Lage, elektrische Impulse zu erzeugen und zu leiten, die Informationen übertragen. Im ZNS sind die Neuronen hauptsächlich für die Informationsverarbeitung zuständig, während im PNS die Neuronen die sensorischen Informationen zum ZNS übertragen und die motorischen Befehle vom ZNS zu den Geweben leiten (Schünke et al., 2018).

1.2 Aufbau eines peripheren Nervs

Ein peripherer Nerv ist ein Nerv, der außerhalb des Zentralnervensystems (Gehirn und Rückenmark) liegt. (Catala & Kubis, 2013)

Ein peripherer Nerv besteht aus mehreren Nervenfasern, auch als Axone bekannt, die in einem Schutzgewebe gebündelt sind (Rigoard et al., 2009). Das Axon ist von einer Schicht von spezialisierten Zellen, den Schwann-Zellen, umgeben. Diese Zellen exprimieren Myelin, welches das Axon umhüllt und als Myelinscheide bezeichnet wird. Myelin ist von entscheidender Bedeutung für die effiziente Übertragung von Nervenimpulsen entlang des Axons (Schünke et al., 2018). Ein Axon und seine umgebende Myelinscheide werden gemeinsam als Nervenfaser bezeichnet. Jede Nervenfaser wird zusätzlich von einer dünnen Bindegewebsschicht, dem Endoneurium, umgeben. Mehrere Nervenfasern sind zu Bündeln, sogenannten Faszikeln, gruppiert, die jeweils von einer weiteren Schicht von Bindegewebe, dem Perineurium, umgeben sind (Catala & Kubis, 2013). Schließlich umgibt das Epineurium das gesamte Nervenbündel und bietet eine zusätzliche Schutzschicht (Topp & Boyd, 2012). Nicht alle Nervenfasern sind myelinisiert. Die nicht-myelinisierten Nervenfasern werden von spezialisierten Schwann-Zellen, bekannt als Remak-Zellen, umgeben, die nicht die typische Myelinscheide bilden. Diese Zellen gruppieren mehrere nicht-myelinisierte Nervenfasern in sogenannten Remak-Bündeln. Obwohl sie keine Myelinscheide bilden, bieten Remak-Zellen einen gewissen Grad an Isolierung und spielen eine wesentliche Rolle bei der Unterstützung und Ernährung der umgebenen Nervenfasern. (Schünke et al., 2018).

Innerhalb eines peripheren Nervs können die Nervenfasern entweder sensorisch, motorisch oder autonom sein. Sensorische Fasern leiten Informationen über Temperatur, Schmerz und andere sensorische Stimuli von den sensorischen Rezeptoren im Körper zum Zentralnervensystem (R. M. G. Menorca et al., 2013). Motorische Fasern übertragen Signale vom Zentralnervensystem zu den Muskeln, um Bewegungen zu steuern. Autonome Fasern übertragen Signale an die inneren Organe und steuern Funktionen wie Herzschlag, Verdauung und Atmung (Catala & Kubis, 2013). Der Aufbau eines peripheren Nervs ist also ein komplexer Prozess, bei dem eine Vielzahl von Strukturen und Zellen beteiligt sind, um die schnelle und effiziente Übertragung von Informationen zwischen dem Zentralnervensystem und der Peripherie zu ermöglichen.

1.3 Schwannzellen (SCs) und Myelinisierung

Die Myelinscheide ist eine evolutionäre Anpassung der Wirbeltiere, die wahrscheinlich die Entwicklung großer, komplexer Nervensysteme ermöglichte, indem sie eine schnelle, effiziente Nervenleitung ermöglichte. Aufgrund des Auftretens mehrerer Schlüsselproteine während der Evolution geht man davon aus, dass sich das Myelin in frühen Gnathostomata in einem gemeinsamen glialen Vorläufer entwickelt hat, aus dem später die verschiedenen Schwann-Zell- und Oligodendrozytenlinien hervorgingen (Gould, 2008). Die Gesamtorganisation der myelinisierten Axone im zentralen Nervensystem und im peripheren Nervensystem ist ähnlich, was mit ihrer konservierten Rolle bei der saltatorischen Erregungsleitung übereinstimmt. Allerdings gibt es erhebliche Unterschiede bei der Entwicklung und dem Aufbau von Myelin durch Schwann-Zellen und Oligodendrozyten. So unterscheiden sich die extrinsischen Signale, die die Myelinisierung bewirken, die Transkriptionskaskaden, die sie auslösen und die Veränderungen des Zytoskeletts, die die Myelinschicht der Axone steuern (Oudejans et al., 2021; Salzer, 2015).

Jede Schwann-Zelle bildet eine einzige Myelinscheide um ein peripheres Axon, wobei jede nachfolgende Myelinscheide von einer anderen Schwann-Zelle gebildet wird, so dass zahlreiche Schwann-Zellen erforderlich sind, um die Länge eines Axons zu myelinisieren. Diese Anordnung steht im Gegensatz zu den Oligodendrozyten, den myelinisierenden Zellen des Zentralnervensystems, die Myelinhüllen für mehrere umliegende Axone bilden.
Abbildung 1 illustriert die Myelinisierung durch eine Schwann-Zelle.

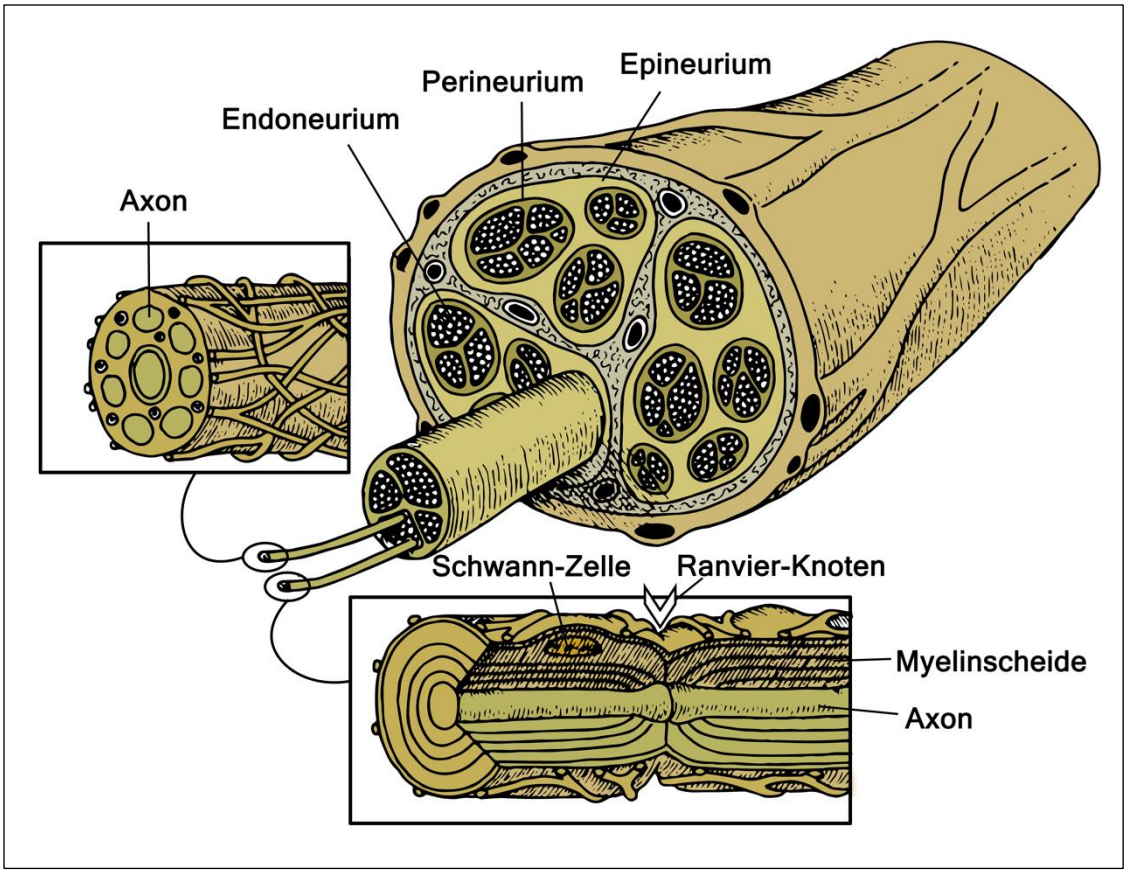

Abbildung 1: Querschnitt eines peripheren Nervs Der linke Ausschnitt zeigt eine nicht- myelinisierte Schwann-Zelle (Remak-Zelle). Das untere Vergrößerungsfenster präsentiert eine myelinisierende Schwann-Zelle, dessen Myelin ein Axon mehrmals umgibt. Eigene Abbildung inspiriert durch S. K. Lee & Wolfe, 2000.

Schwann-Zellen sind von einer Basallamina umgeben, Oligodendrozyten hingegen nicht. Zwischen benachbarten Myelinscheiden gibt es Lücken von etwa 1 Mikrometer, die sogenannten Ranvier-Schnürringe (Schünke et al., 2018). An den Ranvier-Schnürringen konzentrieren sich spannungsgesteuerte Natriumkanäle, welche die saltatorische Erregungsleitung ermöglichen (Abe, 2004). Der Prozess der saltatorischen Erregungsübertragung ist in Abbildung 2 illustriert. Schmidt-Lantermann-Inzisuren sind zytoplasmatische Ausstülpungen, die das kompakte Myelin in stark myelinisierten Axonen unterbrechen. Sie enthalten eine hohe Dichte an Gap Junctions und anderen Zellverbindungen, die eine Rolle bei der Kommunikation und auch der Funktion und Stabilität der Schwann-Zellen spielen (Armstrong, 1987).

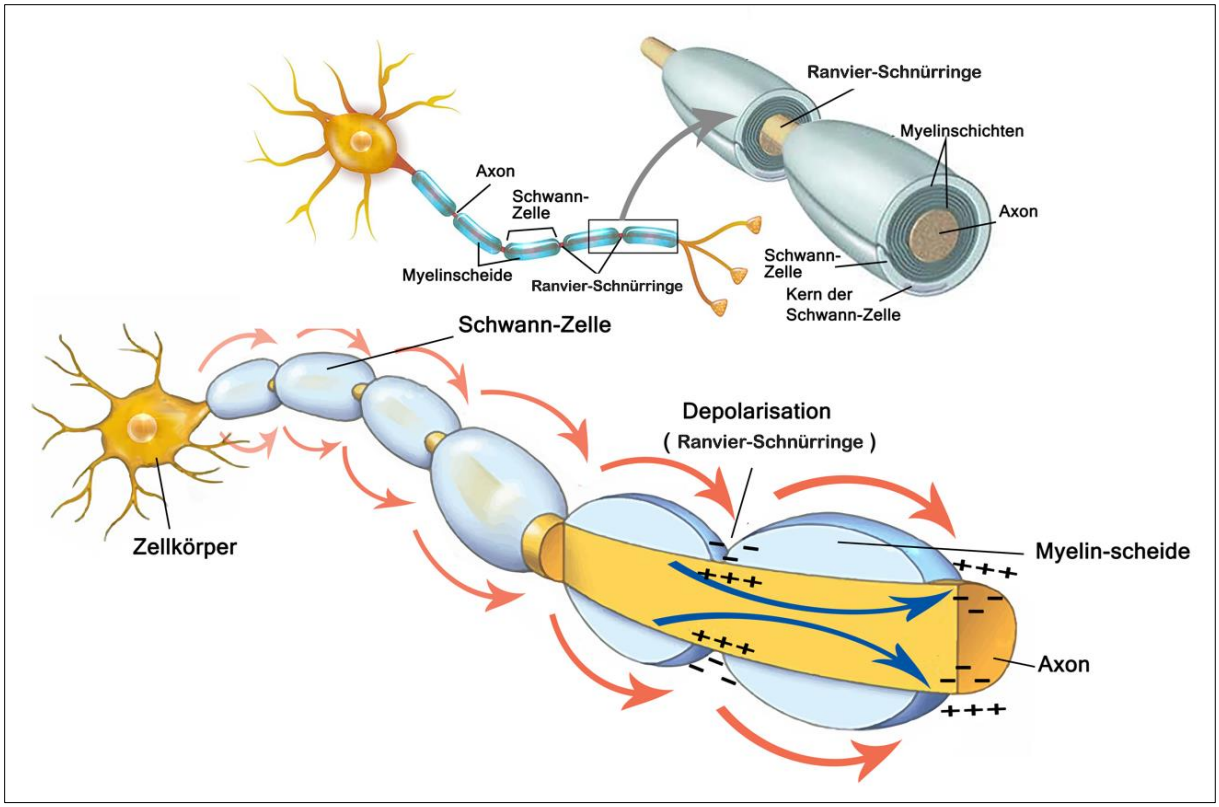

Abbildung 2:. Übertragung von Nervenimpulsen mittels saltatorischer Leitung. Die Darstellung illustriert ein Neuron, dessen Axon von einem Myelinmantel bedeckt ist. Der Myelinmantel, weist regelmäßige Unterbrechungen auf (Ranvier-Schnürringe). Die Myelinisierung trägt dazu bei, dass Aktionspotenziale entlang des Axons weitergeleitet werden (saltatorische Erregungsleitung). Eigene Abbildung inspiriert durch N. A. Campbell et al., 2019.

Myelinisierende Schwann-Zellen sind Zellen, die sowohl radial als auch längst polarisiert sind. Während der Myelinisierung organisieren sich verschiedene Bereiche der Zellmembran von Schwann-Zellen in spezialisierte Zonen. Jede dieser Zonen hat eine spezifische Anordnung von Proteinen und enthält miteinander verbundene zytoplasmatische Kompartimente, die für die Funktionen und Kommunikation der Zelle wichtig sind (Masaki, 2012). Die Organisation der myelinisierenden Schwann-Zelle und des Axons ist in nodale, paranodale, juxtaparanodale und internodale Bereiche unterteilt. Die radiale Polarität zeigt sich durch die verschiedenen inneren (adaxonalen) und äußeren (abaxonalen) Membranoberflächen, die sich an den entgegengesetzten Enden der Zelle befinden. Zwischen diesen beiden Membrandomänen befinden sich die kompakten Membranen der Myelinscheide. Die innere, adaxonale Membran ist vom Axolemma durch eine Lücke von etwa 15 nm (den periaxonalen Raum) getrennt (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Sie enthält Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren, die Interaktionen mit passenden Liganden auf dem Axon vermitteln. Diese halten den periaxonalen Raum Aufrecht und transduzieren Signale. Die adaxonale Membran ist weiter in die paranodalen, juxtaparanodalen und internodalen Domänen organisiert. Die äußere, abaxonale

Membran vermittelt Interaktionen mit Laminin in der Basallamina, insbesondere den Integrinen, die mit der Myelinisierung hochreguliert werden (Masaki, 2012; Salzer, 2015). Im Gegensatz zum inneren zytoplasmatischen Kompartiment, das gleichmäßig verteilt ist, wird das äußere zytoplasmatische Kompartiment durch periodische Anlagerungen zwischen der abaxonalen Membran und der äußeren „Umschlagung“ der kompakten Myelinscheide unterbrochen. Zwischen diesen beiden Membranen befindet sich die mehrschichtige, kompakte Myelinscheide, die sich aus der zirkulären „Umschlagung“ der Schwann-Zellplasmamembran ergibt. Myelin bietet eine hochresistente, kapazitätsarme Hülle, die für die Impulsübertragung durch saltatorische Leitung unerlässlich ist (Stassart et al., 2018).

Die Entstehung der Myelinscheide wird maßgeblich von Schwann-Zellen vermittelt. Diese Zellen sind für die Bildung der spezialisierten Membranstruktur verantwortlich, welche eine rasche Nervenleitung ermöglicht (Decker et al., 2006). Die Entwicklung von Schwann-Zellen und der Beginn der Myelinisierung werden durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren gesteuert, zu denen die POU-Proteine Oct6 (SCIP) und Brn2, das High-Mobility-Group-Protein Sox10 und das Zinkfingerprotein Krox20 (auch bekannt als Egr2) zusammen mit seinen Kofaktoren, den Nab-Proteinen, gehören (Decker et al., 2006). Krox20 spielt dabei die Rolle eines Masterregulators (Ghislain & Charnay, 2006): Es wird in Schwann-Zellen nach dem Axonkontakt und vor der Myelinisierung aktiviert. Mutationen, die zu einem Verlust oder einer Verringerung von Krox20 führen, blockieren die Myelinisierung im promyelinisierenden Stadium, in dem Schwann-Zellen bereits in einem 1:1-Verhältnis mit den Axonen stehen, (Le et al., 2005). Die Expression von Krox20 in Schwann-Zellen führt zur Aktivierung von Genen, die strukturelle Myelinproteine und Enzyme für die Lipidsynthese kodieren (Nagarajan et al., 2001).

Im Gegensatz dazu sind die Schmidt-Lantermann-Inzisuren kurze Unterbrechungen in der kompakten Myelinscheide, die entlang des Internodaliums verteilt sind und in stark myelinisierten, großen Nervenfasern am häufigsten vorkommen (Schünke et al., 2018). Diese Spalten entwickeln sich, nachdem sich die Myelinscheide gebildet hat, was auf einen aktiven Prozess der Dekompaktierung der Myelinlamellen hinweist (Small, 1987). Die Schmidt-Lantermann-Inzisuren wurden als mögliche Kommunikationswege angesehen, insbesondere durch das Vorhandensein von Gap Junctions zwischen benachbarten Membranen (Terada, 2012). Diese strukturellen Merkmale und die beteiligten molekularen Komponenten,

einschließlich des PAR-3/PAR-6/aPKC-Komplexes, sind entscheidend für die Myelinbildung und -struktur (Goldstein, 2007).

1.4 Nervenverletzung / Waller'sche Degeneration / Regeneration

Die Degeneration und Regeneration von Axonen peripherer Neuronen umfasst eine Reihe von aufeinander folgenden Ereignissen, die nach einer peripheren Nervenverletzung auftreten. Die Axon-Degeneration umfasst den Abbau von Axonen und Myelin distal zur Verletzungsstelle, eine Voraussetzung für die anschließende Auswachsen von Axonen. Eine besondere Betrachtung erfordern die Interaktion von Axonen mit ihrer Mikroumgebung während der Regenerationsprozesse. Bevor Axone sich nach einer Verletzung wieder mit einem distalen Nerven verbinden, ist es wichtig, dass das vorherige Material von degenerierenden Axonen und Myelin entfernt und dass Basalmembranwege, sogenannte Büngner-Bänder, für sie vorbereitet werden (Klimovich et al., 2021).

Im Jahr 1850 beschrieb Augustus Waller eine Reihe von morphologischen Veränderungen, die sich in den Axonen peripherer Nerven nach einer Durchtrennungsverletzung zeigten. Die Abfolge von Ereignissen wurde später als Waller'sche Degeneration (WD) bezeichnet (Stoll et al., 2002). Im strengen Sinne bezieht sich die WD auf Ereignisse, die einer Nervendurchtrennung, auch bekannt als Neurotmesis oder Sunderland Typ V Verletzung eines Nervenstamms, folgen (Coleman & Freeman, 2010). Bei dieser Verletzung sind die proximalen und distalen Stümpfe des Nervenstamms vollständig getrennt. Eine ähnliche Form (sog. „Wallerian-like Degeneration"; WLD) beschreibt ähnliche Ereignisse und gemeinsame Mechanismen, die nach unterschiedlichen traumatischen Nervenverletzungen auftreten, bei denen die Verletzung nicht so schwerwiegend sein mag, z. B. Quetschungen oder stumpfe Verletzungen. Sie tritt auch bei Neuropathien auf. Im Zentralnervensystem ist die WLD ebenfalls eine wesentliche Vorstufe zum Axonwachstum, aber sie verläuft viel langsamer und weniger vollständig (Griffin et al., 1996).

Die WD umfasst den Abbau von Axonen und Myelin distal zur Verletzungsstelle. Es wurde angenommen, dass die WD aufgrund des Verlustes des axoplasmatischen Proteins eine passive distale Degeneration ist. Mittlerweile wird die WD als aktiver Prozess angesehen, der durch einen anfänglichen Kalziuminflux ausgelöst wird (Pellegatta & Taveggia, 2019). Die darauffolgenden Signale beinhalten das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Inhibitoren des UPS können die WD verzögern. Ein zusätzlicher Mechanismus, der an der WD beteiligt ist,

wurde durch Untersuchungen eines spontanen Mausmutanten namens WldS identifiziert (Coleman & Freeman, 2010). Diese Maus hat Axone, die über lange Zeiträume überleben und bestehen bleiben, nachdem sie durchtrennt wurden. Sie scheinen der Degeneration zu widerstehen. Die WldS-Mutation ist eine Triplikation, die ein Fusionsprotein bildet, das UFD2/E4 (ein Protein, das an der Proteinubiquitination beteiligt ist) und Nikotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase (NMNAT, ein Enzym, das am Nikotinamidstoffwechsel beteiligt ist) umfasst. Infolge dieser Mutation und Überexpression des Fusionsproteins erhöhen sich die NMNAT-Aktivität und die Spiegel von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD), einem Axonprotektivum. NAD wirkt seinerseits über eine Protein-Deacetylase namens SIRT1 (ein Mitglied der Sir-Familie der Protein-Deacetylasen). Die Entdeckung dieser Mechanismen der WD bietet Möglichkeiten, Axonale Schädigung z. B. im Rahmen von Neuropathien, zu unterbrechen (Coleman & Freeman, 2010).

Die nächsten Schritte der WD beinhalten die Auflösung von Axon-Mikrotubuli, den Abbau des Neurofilament-Axon-Gitters und im Falle von myelinisierten Axonen eine Änderung im Phänotyp der mit diesen Fasern assoziierten SCs. "Aktivierte" SCs exprimieren eine Vielzahl von Proteinmarkern, darunter GFAP (Glialfibrilläres saures Protein), N-CAM, A5E3, Ran-2 und p75, lösen ihr Myelin auf und verhalten sich wie Phagozyten (Schuh et al., 2020). Ein Schlüsselelement dieses Prozesses der zellulären Umprogrammierung, der etwa 4 Stunden nach Nervenverletzung im Zellkern beginnt, ist die Aktivierung des Leucin-Zipper Zinkfinger-Transkriptionsfaktors c-Jun, einer Schlüsselkomponente des AP-1-Transkriptionskomplexes und des terminalen Effektors des JNK-Signalwegs (Tricaud & Park, 2017). Die Zellumprogrammierung bedeutet, dass spezialisierte Zellen in einen pluripotenten Zustand zurückversetzt werden können. c-Jun wird bereits 4 Stunden nach Nervenverletzung stark hochreguliert, mit einer maximalen Aktivierung nach 12 Stunden (Lee et al., 2014). Die Reduktion der c-Jun-Expression in Schwann-Zellen verzögert signifikant die Demyelinisierung und beeinträchtigt die funktionelle Erholung nach Nervenverletzung (Arthur-Farraj et al., 2012). c-Jun fungiert als Schlüsselfaktor in den Schwann-Zellen für die Expressionssteigerung von Genen, die mit neuronalem Wachstum und Regeneration in Verbindung stehen, und die Expression myelinbezogener Gene wie Egr2, Mpz, Mbp, Periaxin und E-Cadherin herunterreguliert (Arthur-Farraj et al., 2012; Fontana et al., 2012). Ein weiterer Regulator für die zelluläre Umprogrammierung ist der Notch-Signalweg. Der Notch-Signalweg unterstützt die Expression von Sox2 (Shi et al., 2008). Sox2 ist ein Transkriptionsfaktor, der dafür bekannt ist, diese Umwandlung in pluripotente Stammzellen aus erwachsenen Zellen zu unterstützen

(Surzenko et al., 2013). Während der Waller-Degeneration wird Sox2 in Schwann-Zellen vermehrt produziert. Diese erhöhte Produktion von Sox2 deutet darauf hin, dass das Chromatin (die DNA und ihre Verpackungsproteine in der Zelle) flexibler und anpassungsfähiger wird, was wiederum die Fähigkeit der Zelle zur Umprogrammierung unterstützt (Tricaud & Park, 2017). Interessanterweise bleibt Sox2 auch in verletzten Nerven von Mäusen, denen c-Jun fehlt, was darauf hindeutet, dass ein zusätzlicher Mechanismus die Sox2-Expression und -transkriptionelle Plastizität in demyelinisierenden Zellen aktivieren kann (Parkinson et al., 2008).

Um Axone effektiv abzubauen und Myelindebris zu beseitigen, ist eine entzündliche Kaskade erforderlich. Diese Kaskade führt zur Invasion von Blut-Makrophagen innerhalb der ersten 3-5 Tage nach der Verletzung. Parallel zur Infiltration der entzündlichen Zellen produzieren aktivierte SC und gewebeständige Makrophagen, die eine WD durchlaufen, eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen. Dazu gehören IL-1β, IL-6, IFN-γ, TNF-α, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) und MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein 1α) (Conforti et al., 2014; Salzer, 2015). Diese Moleküle sind primär für die Koordination der Infiltration durch Entzündungszellen verantwortlich und fördern den Abbau von Axonen und Myelin. Zytokine und Chemokine haben eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Regulation der entzündlichen Antwort und neurotrophe Faktoren, die auch von Schwann-Zellen und anderen Zelltypen im Nervensystem produziert werden, sind direkt am Überleben, Wachstum und der Differenzierung von Neuronen beteiligt. Neurotrophe Faktoren wie NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) und NT-3 (Neurotrophin-3) spielen eine essenzielle Rolle in der Unterstützung der Regeneration und Reparatur von verletzten Nervenfasern (Rotshenker, 2007). Eine Unterbrechung ihrer Expression kann die WD und die nachfolgende Regeneration verzögern (Rotshenker, 2007).

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Schlüsselmolekül bei der WD und wird von der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in SCs und Makrophagen synthetisiert. NO erweitert lokale Blutgefäße, um den Abbau zu fördern und trophische Faktoren zum verletzten peripheren Nervenstamm zu transportieren (Conforti et al., 2014). Durch Lipidperoxidation fördert NO den Abbau von Myelin. In Mäusen, denen induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) fehlt, wird eine verlangsamte Waller-Degeneration und nachfolgende Regeneration beobachtet, was die Bedeutung dieses Prozesses für eine effiziente Nervenheilung unterstreicht (Levy et al., 2001). Eine Überexpression von iNOS und eine übermäßige Bildung von NO können jedoch

der Regeneration schaden. Während schwerer Entzündungen oder lokaler Infektionen freigesetztes NO kann die Regeneration unterbrechen und das Wachstum verhindern (Hess et al., 1993).

Nach einer Durchtrennung „vernaben“ Axone schnell und verändern die Konfiguration ihrer Mikrotubuli, was den Wechsel des axoplasmatischen Transports beeinflussen kann. Dieser Wechsel bezieht sich auf die Umstellung des Transports von anterograd zu retrograd. An den proximalen Enden der durchtrennten Axone bilden sich knospenähnliche Strukturen. Diese Strukturen, die sich von Wachstumskegeln unterscheiden, akkumulieren axoplasmatisches Material, einschließlich depolymerisierter Neurofilamente, Peptide, Ionenkanäle, Enzyme und anderer Moleküle (Conforti et al., 2014). Während diese Strukturen degenerieren, können einige ihrer Bestandteile in die Mikroumgebung der Verletzung austreten und lokale Gliazellen, andere Axone oder lokale Mikrogefäße beeinflussen. Das freigesetzte Neuropeptid „Calcitonin-Gen-verwandtes Peptid“ (CGRP) kann lokale Mikrogefäße erweitern und zur Hyperämie oder zum Anstieg des Nervenblutflusses an Verletzungsstellen beitragen (Toth et al., 2009). Es können sich auch funktionale Opioidrezeptoren, Natriumkanäle und Stickstoffmonoxid-Synthasen ansammeln, die NO im Verletzungsmilieu produzieren. Axonale Stümpfe können daher die Entwicklung von ektopischen Entladungen am Axon beeinflussen, die mit neuropathischen Schmerzen in Verbindung stehen (Contreras et al., 2022).

Axonales Aussprossen bildet sich an den distalen Enden von beschädigten Axonen oder an Ranvier'schen Schnürringen, die proximal zur Verletzungsstelle in myelinisierten Fasern liegen. Typischerweise wird das Aussprossen durch nodale Moleküle reguliert und kann durch diese unterdrückt werden (Marshall & Farah, 2021). Damit ein früher Spross jedoch zu einem reifen und wachsenden neuen Axon wird, ist eine Verbindung zum Perikaryon erforderlich. Tatsächlich geht eine Verletzung an einem Axon mit morphologischen Veränderungen im Zellkörper einher, die dessen Phänotyp von einem "stabilen" übertragenden Neuron zu einem widerstandsfähigen regenerierenden Neuron ändern (Verge et al., 1996). Die Expression der Gene, die sich in Verbindung mit Verletzung und Regeneration ändert, sind als RAGs (Regenerations-assoziierte Gene) bekannt (Ma & Willis, 2015). Obwohl das Ausmaß dieser Veränderungen umfangreich ist, umfassen die Schlüsselveränderungen die Herunterregulation von Neurofilament-Untereinheiten, die Hochregulation von Tubulin, das Mikrotubuli bildet, die Hochregulation von GAP43/B50 (Growth Associated Protein 43), einem Aktin-Montagemolekül, die Hochregulation von nNOS (neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase) und

die Hochregulation von HSP27 (Heat Shock Protein 27), ein Chaperon-Protein, das beim Wiederaufbau von Axonen hilft (Zochodne, 2009).

Zur Unterstützung der Regeneration müssen sich die SCs dedifferenzieren, proliferieren und migrieren (Zochodne, 2009). SCs sind essenzielle Partner für die Erhaltung und das Wachstum von Axonen im peripheren Nervensystem. Die SCs begleiten eng wachsende Axone und nehmen an einem bidirektionalen Austausch von Molekülen teil (Jessen et al., 2015). SCs sekretieren adhäsive Substrate der extrazellulären Matrix wie Laminin und Fibronectin und liefern zudem Gradienten von Wachstumsfaktoren. Axone hingegen senden signifikante Signale für SCs, die zum Beispiel zu einer Veränderung des Phänotyps, der mit einem intakten myelinisierten Axon assoziiert ist, zu einem "reaktiven" SC führen (Balakrishnan et al., 2021). Reaktive SCs exprimieren Marker wie GFAP und andere Marker. Interessanterweise werden viele dieser Marker fortlaufend in SCs von Remak-Bündeln exprimiert, den Strukturen, die unmyelinisierte Axone in peripheren Nervenstämmen umhüllen. Neureguline (NRGs), welche ein entscheidendes Signal für SCs, sind Produkte des alternativen Spleißens des NRG-1-Gens und gehören zu einer Familie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. NRGs werden von Axonen freigesetzt, um auf SC-Rezeptoren erbB2 und erbB3 zu wirken, um eine intrazelluläre zweite Botenstoffkaskade zu aktivieren (Zochodne, 2009). NRGs unterstützen somit das neue Axonwachstum, können aber auch während der WD und Myelinisierung agieren. SCs können die NRG-Freisetzung von Axonen durch das Bereitstellen von Wachstumsfaktoren an sie stimulieren. Die Bedeutung dieser Beziehung wird durch Experimente veranschaulicht, in denen die SC-Proliferation durch Strahlung oder einen Mitose-Inhibitor gehemmt wird. Die Regeneration ist stark eingeschränkt, weil ohne die Proliferation der SCs keine ausreichende Unterstützung für das Axonwachstum und die Bildung von Büngner-Bändern stattfinden kann. Bei Verletzungen, wie zum Beispiel einer Nervenquetschung, bilden aktivierte proliferierende SCs Büngner-Bänder, Leitbahnen für das Nachwachsen von Axonen in den distalen denervierten Stumpf (Balakrishnan et al., 2021; Jessen et al., 2015).

Es existieren viele weitere relevante Prädiktoren für das Nervenwachstum. Dazu gehört die Rolle der Vasa nervorum beim Nachwachsen von Nervenstämmen. Die Vasa nervorum sind kleine Blutgefäße, die Nerven versorgen und eine entscheidende Rolle in der Regeneration spielen, da sie die notwendige Durchblutung und Nährstoffversorgung sicherstellen. Von besonderer Bedeutung ist die Thematik der Innervation von Zielgeweben. Zu diesen

Zielgeweben gehören die neuromuskuläre Endplatte mit ihrem Endköpfchen von terminalen SCs sowie die Haut, wo sowohl dermale als auch epidermale Faserinnervation erforderlich sind. Nachwachsende Axone müssen die Architektur eines Nervenstammes wiederherstellen, unterbrochene Blut-Nerven-Schranken wiederherstellen und eine Myelinscheide ausbilden (Zochodne, 2009). Die Wiederherstellung der Blut-Nerven-Schranke (BNS) geschieht durch die Förderung der Reparatur und Wiederherstellung der endothelialen Zellen und der perineuralen Barrieren, die für die Aufrechterhaltung der selektiven Permeabilität der BNS verantwortlich sind (Weerasuriya & Mizisin, 2011). Die Interaktion zwischen nachwachsenden Axonen und den Zellen, die die BNS bilden, einschließlich Perizyten und endothelialen Zellen, führt zur Sekretion von Faktoren, die die Regeneration der Schrankenfunktion unterstützen. Diese Interaktionen fördern die Angiogenese, verbessern die lokale Blutzirkulation und tragen zur strukturellen und funktionellen Wiederherstellung der BNS bei (Malong et al., 2023). Zudem gibt es zahlreiche aktuelle Forschungsberichte zur bedeutenden Rolle des Sekretoms und zu Wachstumsfaktoren und ihrer nachgeschalteten intrazellulären Signale (Schuh et al., 2020). Die Liste hat sich weit über die klassische Neurotrophin-Familie des Nervenwachstumsfaktors hinaus erweitert, der vor fast 50 Jahren von Levi-Montalcini entdeckt wurde. Weitere Neuronen-beeinflussende Wachstumsfaktoren, die ursprünglich in anderen Geweben beschrieben wurden, sind identifiziert worden, darunter Erythropoetin, GDNF-Familienmitglieder und Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs, Bone Morphogenetic Proteins) und vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGFs) (Önger et al., 2017). Schließlich sind adhäsive Moleküle, die mit Axon- und Schwannzellen-Integrinrezeptoren interagieren, wesentlich für den Regenerationsprozess. Diese Interaktionen schaffen nicht nur Wachstums- und Leitpfade, sondern erzeugen auch eigenständig intrazelluläre Signale und wirken zusammen mit Wachstumsfaktoren (Klimovich et al., 2021). Zusammenfassend ist die periphere Nervenregeneration eine koordinierte Abfolge von Ereignissen, die verschiedene Zelltypen und eine Vielzahl molekularer Interaktionen umfasst. Besonders wichtig ist dabei die Zusammenarbeit zwischen Axonen und Schwann-Zellen sowie ihr wechselseitiger Austausch.

1.5 Biotin und Carboxylasen

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, das in allen Organismen vorkommt und als Cofaktor von Enzymen fungiert, die als biotinabhängige Carboxylasen bekannt sind (Wood, 1977). Biotin in Carboxylasen dient als Träger für den Carboxylgruppentransfer zwischen Donor- und Akzeptormolekülen während der Carboxylierungsreaktion. Die kovalente Anlagerung von

Biotin an diese Proteine wird durch Biotin-Ligasen katalysiert, die in Prokaryonten als BirA-Protein (Eisenberg, 1982) und in Eukaryonten als Holocarboxylase-Synthetase (HCS) bekannt sind (Wood, 1977). Sowohl bei BirA als auch bei HCS erfolgt die Biotin-Addition in einer ATP-abhängigen, zweistufigen Reaktion, bei der im ersten Schritt das Zwischenprodukt Biotinyl-5′-AMP (B-AMP) synthetisiert wird (Sundaram, 1971). Im zweiten Schritt ist B-AMP ein Substrat für die Übertragung von Biotin, wobei AMP an einem spezifischen Lysinrest in einer hochkonservierten Region in Apocarboxylasen freigesetzt wird (Chapman-Smith, 1999). Abbildung 3 zeigt die Strukturformel des Biotins.

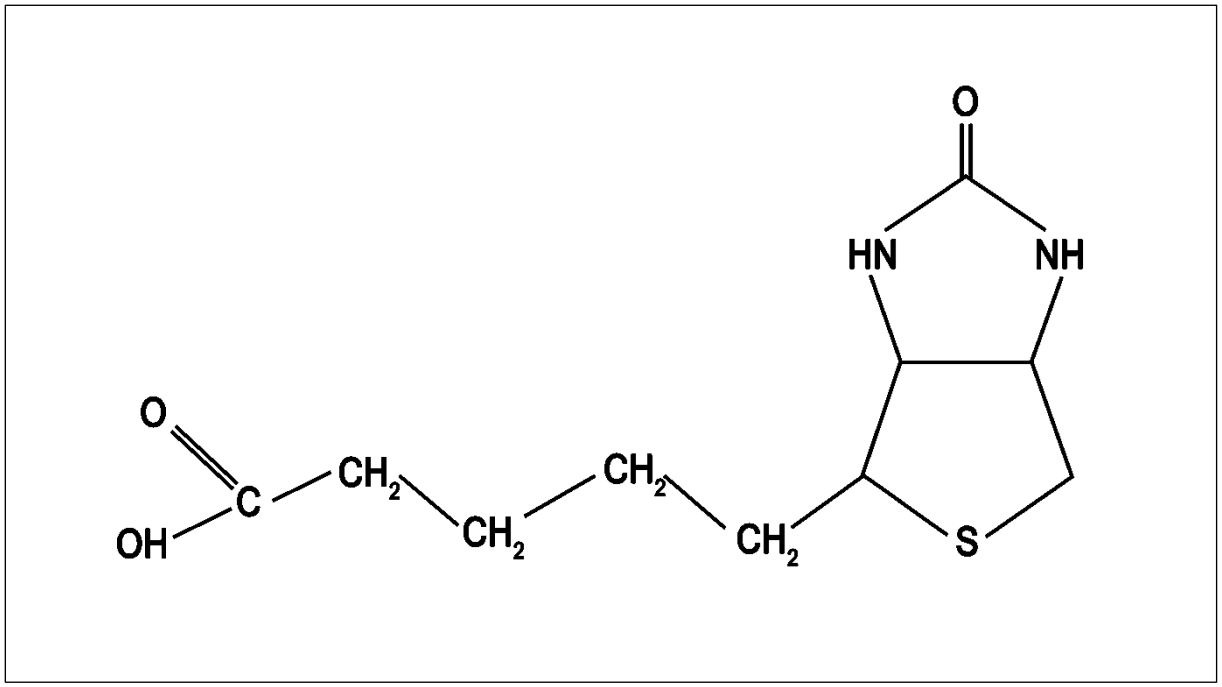

Abbildung 3: Strukturformel des Biotins. Eigene Abbildung inspiriert durch Rassow et al., 2022.

Bisher bestand die einzige bekannte Funktion von Biotin in menschlichen Zellen darin, als Cofaktor von fünf biotinabhängigen Carboxylasen zu wirken, darunter Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC), Pyruvat-Carboxylase (PC), Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCC), Acetyl-CoA-Carboxylase 1 (ACC-1) und Acetyl-CoA-Carboxylase 2 (ACC-2) (Tong, 2013a). Diese Enzyme katalysieren wichtige Reaktionen bei der Gluconeogenese, der Fettsäuresynthese und dem Aminosäureabbau. Aufgrund ihrer zentralen Rolle im Stoffwechsel kann ein Mangel an Biotin oder an den Enzymen, die Biotin nutzen, schwerwiegende gesundheitliche Folgen haben. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Biotin bei weiteren Vorgängen in eukaryontischen Organismen eine Rolle spielt, z.B. bei der Transkriptions- oder Translationsregulation oder der Aktivitätssteigerung verschiedener Leberenzyme (Mock, 2017;

Said, 2012; Zempleni & Kuroishi, 2012). Darüber hinaus hat sich ein Biotinmangel bei verschiedenen Tierarten als teratogen erwiesen und ist die Ursache für mehrere neurologische Erkrankungen (Ozand, 1998; Zempleni, 2000; Zempleni & Mock, 1999).

1.6 Postulierte Wirkung von Biotin in Bezug auf Myelinisierung

Im Kontext von neurologischen Erkrankungen besteht ein erheblicher Mangel an regenerativen Therapieoptionen.

Eine Pilotstudie zur Wirksamkeit von hochdosiertem Biotin (HDB) bei primärer und sekundärer progressiver MS zeigte ermutigende Ergebnisse. Vier Patienten zeigten eine signifikante Verbesserung der Sehschärfe und visuell evozierte Potentiale zeigten eine Verbesserung der Nervenleitfähigkeit. Von 18 Patienten mit Rückenmarksbeteiligung verbesserten sich 16 innerhalb von 2 bis 8 Monaten nach Behandlungsbeginn (Sedel et al., 2015).

Eine randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie (MS-SPI) deutete darauf hin, dass HDB bei einer Untergruppe von Patienten mit progressiver MS die MS-bedingten Einschränkungen verbessern könnte (Tourbah, 2016a). Biotin weist eine hohe (~100%) Bioverfügbarkeit auf (Zempleni, 1999) und kann die Blut-Hirn-Schranke passiv überwinden (Spector & Mock, 1988). Die vermutete Wirksamkeit von HDB beruht möglicherweise auf einer erhöhten Myelinsynthese in Oligodendrozyten, da die ACC-265-Isoform im zentralen Nervensystem hauptsächlich in diesen Zellen exprimiert wird und eine hohe Aktivität während der Myelinisierung zeigt. Hinweise deuten darauf hin, dass eine gezielte Aktivierung von ACC-265 während der Remyelinisierung therapeutisch relevant sein könnte (Sedel et al., 2016; Tansey & Cammer, 1988)(Salles et al., 2003). Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese aufgestellt, dass HDB, weit über der täglich empfohlenen Menge, eine regulierende Rolle im Neurometabolismus spielen könnte (Sedel et al., 2016). Aufgrund der breiten Beteiligung von Carboxylasen in verschiedenen Stoffwechselwegen wurde vermutet, dass supraphysiologische Biotin-Dosen neuroprotektive und regenerative Vorteile bieten könnten. HDB könnte zur Produktion von ATP beitragen, indem es Intermediate des Tricarbonsäurezyklus erhöht und die Remyelinisierung verbessert, indem es die Menge an Malonyl-CoA, einem Baustein der Fettsäuresynthese, steigert (Sedel et al., 2016). Obwohl diese Wirkmechanismen nicht ausreichend untersucht sind, deuteten In-vitro-Daten aus Astrozytenkulturen auf eine indirekte therapeutische Wirkung von Biotin auf die Myelinisierung hin (Sedel et al., 2016). Die Annahme ist, dass HDB einen Zustand virtueller Hypoxie umkehrt, indem es als Kofaktor für

Pyruvat-Carboxylase, Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und Propionyl-CoA-Carboxylase fungiert, die zentral für die aerobe Energieproduktion sind und Zwischenprodukte für den Tricarbonsäurezyklus generieren. Diese Prozesse könnten die ATP-Spiegel in Zellen erhöhen, was wiederum die Myelinreparatur und -erhaltung fördern könnte (Sedel et al., 2016). Die bisherigen begrenzten Daten beziehen sich insbesondere mit der Remyelinisierung bei Multipler Sklerose (MS). Jedoch zeigten nachfolgende Phase-3-Studien (SPI2) keine signifikanten Verbesserungen, was Zweifel an der Effektivität von HDB bei progressiver MS aufkommen ließ (Motte & Gold, 2020).

1.7 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Effekt von hochdosiertem Biotin auf die *in vitro* Myelinisierung von peripheren Nerven und der Effekt von Biotin auf die *in vivo* Remyelinisierung in verletzten peripheren Nerven im Tiermodel untersucht. Es soll untersucht werden, ob die Zugabe von hochdosiertem Biotin: 1) den Malonyl-CoA-Gehalt und
2) die Remyelinisierung der verletzten peripheren Nerven beeinflusst.

2 MATERIAL UND METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach einer umfassenden Einführung und Einarbeitung in Zellkulturtechniken eine Reihe experimenteller Untersuchungen durchgeführt. Der Großteil der praktischen Arbeiten, wie Zellkulturen, Myelinisierungsversuche, Färbungen sowie Bild- und Datenanalysen, wurde vollständig eigenständig ausgeführt (Kap. 2.1–2.3 und 2.11). Bei den weiteren Versuchen, wie der Präparation des Nervus ischiadicus, Biotinbehandlungen, funktionellen Tests und biochemischen Analysen, erfolgte meine unterstützende Mitwirkung (Kap. 2.4–2.10).
Diese Klarstellung dient der transparenten Darstellung meines Eigenanteils an der experimentellen Arbeit.

2.1 Zellkulturtechniken

In dieser Studie wird die Axonaussprossung durch die Zugabe eines mit Nervenwachstumsfaktor (NGF-β) angereichertem Medium induziert. Dieses Medium bewirkt eine Aussprossung der in den DRGs enthaltenen Neurone (Zhou et al., 2004). Des Weiteren wird die Myelinisierung durch die Zugabe spezifischer Moleküle gefördert. Schwannzellen benötigen Ascorbinsäure zur Synthese von Molekülen der extrazellulären Matrix, die essenziell für die Myelinisierung sind (Podratz et al., 2004). Forskolin erhöht das intrazelluläre cAMP-Niveau, was zur Myelinisierung beiträgt und die Expression einiger Myelingene fördert (Monk, 2009). Insulin verstärkt diesen Effekt (Päiväläinen et al., 2008). Insulin, Progesteron, Transferrin und Selen werden mit dem N2-Supplement hinzugefügt. Progesteron aktiviert die Promotoren mehrerer Myelinproteine und erhöht so die Konzentrationen von mRNA verschiedener Myelinproteine. Selen ist notwendig für die Hochregulierung von Myelingenen zu Beginn der Differenzierung (Päiväläinen et al., 2008). Hypophysenhormone werden hinzugefügt, um die Proliferation der Schwannzellen zu fördern (Brockes et al., 1979).

Für die Zellkultur wurden zwei Hauptmedien verwendet: das Neurobasalmedium (NBM) und das Maus-Myelinisierungsmedium (MMM). Das NBM wurde in semisteriler Umgebung angesetzt und nach Herstellung mit einem 0,2 µm Filter filtriert. Vor Verwendung des MMM wurden 50 ml des beschriebenen Mediums entnommen und mit

- 0,5 ml 5% Ascorbinsäurelösung (L-Ascorbic acid 99%; Sigma-Aldrich; #A92902)

- 12,5 µl 2 mM Forskolin (Sigma-Aldrich; #F3917)

versetzt und anschließend wiederum mit einem 0,2 µm Filter in semisteriler Umgebung filtriert und bei 4°C gelagert. Die Zusammensetzungen der beiden Medien sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

Neurobasalmedium (NBM)			
Bezeichnung	Verwendetes Volumen	Hersteller	Artikelnummer
1x Dulbecco´s Modified Eagle´s Serum	42 ml	Lonza	#BE12-707F
Pferdeserum HS (Horse serum), Hitzeinaktiviert Gibco	5 ml	Invitrogen	#26050-088
Glucoselösung (10%) 0,1 g/ml D-(+)-Glucose	2 ml	Sigma-Aldrich	#G8270-1KG
L-Glutamin (100x) Gibco	0,5 ml	Invitrogen	#25030-024
Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml) Gibco	0,5 ml	Invitrogen	#15070-063
Nervenwachstumsfaktor (NGF-β) aus der Ratte, verdünnt auf 100 µg/ml	5 µl	Sigma-Aldrich	#N2513-.1MG

Tabelle 1: Zusammensetzung des Neurobasalmediums (NBM).

Maus-Myelinisierungsmedium (MMM); Differenzierungsmedium			
Bezeichnung	Verwendetes Volumen	Hersteller	Artikelnummer
Minimum Essential Medium (MEM) Gibco	500 ml	Invitrogen	#21090-022
Pferdeserum HS (Horse serum), Hitzeinaktiviert Gibco	25 ml	Invitrogen	#26050-088
Glucoselösung (10%) 0,1 g/ml D-(+)-Glucose	20 ml	Sigma-Aldrich	#G8270-1KG
Bovines Hypophysen Extrakt BPE (Bovine pituitary extract) verdünnt auf 5 mg/ml	2 ml	Sigma-Aldrich	#P1167

Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml) Gibco	5 ml	Invitrogen	#15070-063
L-Glutamin (200 mM) Gibco	5 ml	Invitrogen	#25030-024
N-2 Supplement (100x) Gibco	5 ml	Invitrogen	#17502-048
Nervenwachstumsfaktor (NGF- β) aus der Ratte, verdünnt auf 100 µg/ml	25 µl	Sigma-Aldrich	#N2513-.1MG

Tabelle 2: Zusammensetzung des Maus-Myelinisierungsmediums (MMM) bzw. Differenzierungsmediums.

Zusätzlich wurden für die Zellkulturversuche Typ I Kollagen (Sigma-Aldrich, #C3867) und Leibovitz´s L-15 Medium Gibco (Invitrogen, #11415-049) verwendet. Die Inkubation erfolgte unter kontrollierten Bedingungen von 37°C und 10 % CO2 Partialdruck in einem Heraeus HeraCell Inkubator.

Tabelle 3 führt weitere verwendete Materialen auf.

Bezeichnung	**Hersteller**	**Artikelnummer**
5 ml Stripette	Corning	4487
10 ml Stripette	Corning	4488
25 ml Stripette	Corning	4489
24-well Nunc™ Zellkulturmultiplatte	Thermo Fisher Scientific	142475
Dumont Forceps No.5, extra fein	Oehmen Labortechnik	6028321
Falcon 50mL Zentrifugenröhrchen	Corning	352070
Falcon 15mL Zentrifugenröhrchen	Corning	352097
Petrischale 35/10mm	Greiner Bio-One	627102
Petrischale 94/16mm	Greiner Bio-One	633180
Physimeter	Erichsen	906MC-B
TipOne Pipettenspitzen, 10µL, steril	StarLab	S1121-3810
TipOne Pipettenspitzen, 20µL, steril	StarLab	S1120-1810
TipOne Pipettenspitzen, 100µL, steril	StarLab	S1120-1840
TipOne Pipettenspitzen, 200µL, steril	StarLab	S1120-8810
TipOne Pipettenspitzen, 1000µL XL, steril	StarLab	S1122-1830

Tabelle 3: Materialienliste mit Angabe des Herstellers und der Artikelnummer.

2.1.1 Beschichtung der Zellkulturschalen

Die für die Kultivierung der DRGs vorgesehenen Wells von 24-Well Zellkulturschalen (Greiner Bio-One, Sigma-Aldrich, #M9312) wurden in semisteriler Umgebung vorbereitet. Die Wells wurden zuerst mit einer Kanüle karoförmig eingeritzt und eventuelle Plastikbruchstücke entfernt. Für die Beschichtung wurde Typ I Kollagen verwendet, welches als Protein der extrazellulären Matrix die Adhäsion und das Wachstum von Axonen fördert (Reichardt & Tomaselli, 1991).

Die Kollagenmatrix wurde aus einer Mischung von 143 µl Typ I Kollagen und 857 µl 20 mM Essigsäurelösung hergestellt. Je 15 µl dieser Mischung wurden in Well überführt und gleichmäßig verteilt. Nachdem die erste Beschichtung getrocknet war, wurde dieser Vorgang wiederholt. Die fertig beschichteten Zellkulturplatten wurden bei 4°C luftdicht gelagert, bis sie verwendet wurden.

2.1.2 Isolierung muriner embryonaler Dorsalwurzelganglien (DRGs)

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt und gemäß den Richtlinien für Versuchstierkunde durchgeführt.

Zunächst wurden 100 ml Leibovitz L-15 Medium, 50 ml PBS, 50 ml 70%iger Ethanol, eine Präparierschale mit weicher Unterlage und zwei Präparierpinzetten vorbereitet. Ebenfalls wurden mindestens drei kleine Petrischalen mit Leibovitz L-15 Medium gefüllt und in einer größeren Petrischale auf Eis gelagert.

Die DRGs wurden aus E15 C57BL/6-Mäuseembryonen isoliert, die von Janvier Labs (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) stammten. Muttertiere, die trächtig mit E15.5 C57BL/6-Mäuseembryonen waren, wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Der Uterus samt Embryonen wurde post mortem entnommen und in eine 94 x 16mm große Petrischale, die mit Leibovitz's L-15 Medium gefüllt war, gelegt. Nachdem die Embryonen vorsichtig aus dem Uterus entnommen und von der Fruchtblase und Plazenta separiert wurden, erfolgte die Dekapitation. Anschließend wurden sie ventralwärts in die Präparierschale, gefüllt mit Leibovitz's L-15 Medium, überführt und dort an den Vorder- und Hinterläufen fixiert.

Die über dem Rückenmark liegenden Gewebeschichten wurden mithilfe einer Pinzette entfernt, und das Rückenmark wurde vollständig isoliert. Falls sich DRGs am Rückenmark befanden, wurden diese separat abgetrennt. Die nun freiliegenden DRGs im Rücken der Embryonen wurden mit einer Pinzette entnommen und in die vorbereiteten Petrischalen überführt.

Die DRGs in den Petrischalen wurden resuspendiert und, abhängig von der Anzahl der präparierten Tiere, in ein oder zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen der Firma Falcon übertragen. Bei einer Temperatur von 4°C und 800 Umdrehungen/Minute wurden sie für 5 Minuten zentrifugiert, um die DRGs zu sedimentieren. Nach dieser Zentrifugation wurde das überschüssige Leibovitz's L-15 Medium entfernt.

Für die weitere Verarbeitung wurden die DRGs in Neurobasalmedium resuspendiert. Die DRG-Lösung wurde anschließend vorsichtig auf die mit Kollagen beschichteten Wells übertragen, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Diese Multiwellplatten wurden für 7 Tage bei 37°C und einem 10% CO2-Gehalt inkubiert. Am siebten Tag wurde das Medium durch Myelinisierungsmedium ersetzt. Abbildung 4 illustriert das Vorgehen bei der Präparation.

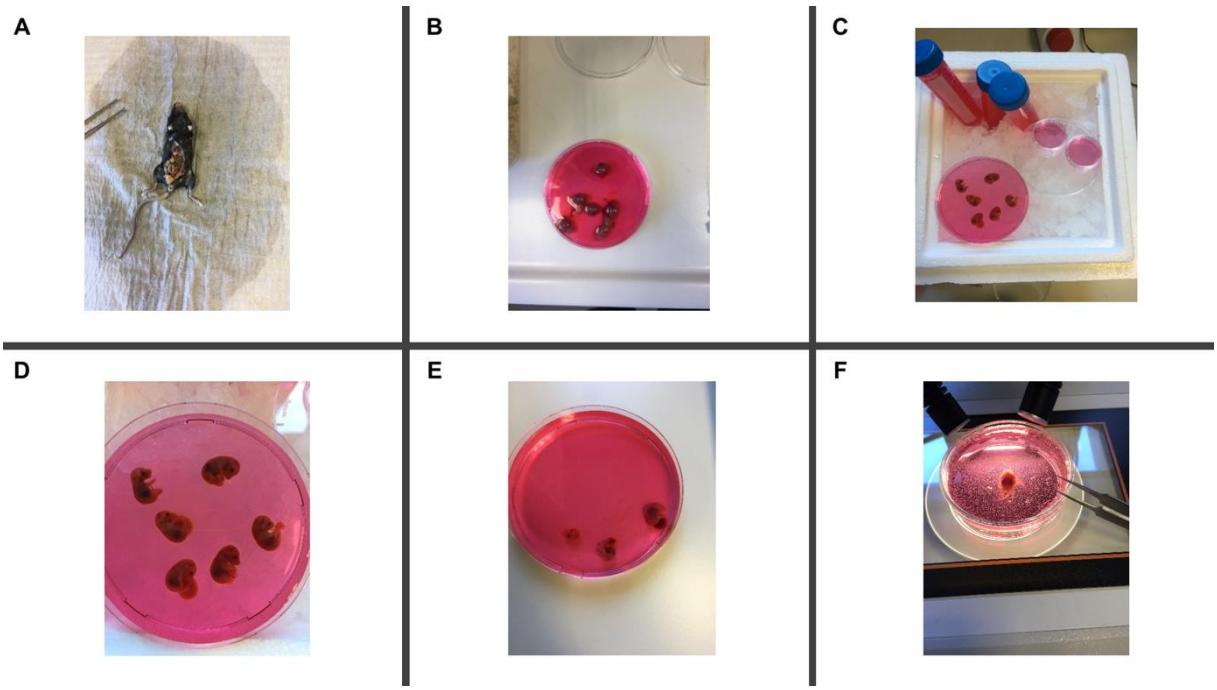

Abbildung 4: A-F: Zellkulturmodell. A) Entnahme der Embryonen aus dem Uterus der C57/B6-Maus B) Embryonen innerhalb des Amnions C) Kühlung der Embryonen während der Präparation D) Embryonen außerhalb der Amnionhähle E) Enthauptete Embryonen F) Zur Explantation fixierter Embryokörper.

2.2 Myelinisierungsversuche mit DRGs

Die entnommenen DRGs, wie im vorherigen Kapitel (vgl. Kapitel 2.1.2) beschrieben, wurden mit 2 ml Neurobasalmedium pro Tier resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 1 ml dieses Mediums mit den DRGs in ein beschichtetes Well einer 24-Well-Zellkulturplatte überführt. Diese Platten wurden dann für eine Woche kultiviert, um die DRGs vollständig auf der Platte auswachsen zu lassen.
Nach einer Kultivierungszeit von einer Woche wurde das Neurobasalmedium abgesaugt. Die ausgewachsenen DRGs wurden einmalig mit PBS gespült, um verbliebene Reste des Neurobasalmediums zu entfernen. Für die folgenden Myelinisierungsversuche wurden die DRGs anschließend mit Myelinisierungsmedium behandelt.

Zusätzlich zur Myelinisierung der DRGs durch das Myelinisierungsmedium wurde eine aufsteigende Reihe von Biotin-Konzentrationen verwendet:

- Zwei Kontrollmultiwellplatten wurden nur mit Myelinisierungsmedium ohne Biotin-Zusatz behandelt.
- Eine Multiwellplatte wurde mit 0,5 µL Biotin mit einer Konzentration von 5 mM kultiviert.
- Eine weitere Multiwellplatte wurde mit 5 µL Biotin mit einer Konzentration von 50 mM kultiviert.
- Zwei Multiwellplatten wurden mit 50 µL Biotin (500 mM) kultiviert.

Nach einem Zeitraum von 14 Tagen wurden die DRG-Kulturen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte anschließend für 20 Minuten mit 4% Paraformaldehyd. Nach der Fixierung wurden die Kulturen erneut zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Zum Schluss wurde jedes Well mit 2 ml PBS luftdicht verschlossen und für die zukünftige Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.3 Färbung der DRG-Kulturen mit Sudanschwarz und Mikroskopie

Die Färbung der DRG-Kulturen erfolgt durch Anwendung einer spezialisierten Technik, die auf dem synergistischen Effekt von Osmiumtetroxid und Sudanschwarz basiert. Sudanschwarz (Sudan Black B; Sigma-Aldrich; #199664) weist eine hohe Affinität zu neutralen Lipiden auf. Da das Myelin im peripheren Nervensystem zu ungefähr 70% aus Lipiden besteht, stellt

Sudanschwarz ein ideales Färbemittel zur Identifizierung von Myelinstrukturen dar (Pfüller et al., 1977). Vor der eigentlichen Färbung mit Sudanschwarz werden die Doppelbindungen der ungesättigten Fette durch Osmiumtetroxid oxidiert. Dies führt zur Reduktion von Osmiumtetroxid, welches sich daraufhin am Ort der Reaktion als Osmiumschwarz absetzt und bereits vor der Sudanschwarzfärbung zu einer sichtbaren Schwarzfärbung des Myelins führt (Di Scipio et al., 2008).

Die angelegten DRG-Kulturen wurden zunächst einmal mit je 1 ml PBS gewaschen, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in 1 ml 10%igem Formalin. Nach der Fixation wurde das überschüssige Formalin mit je 1 ml PBS entfernt. Um Dehydration zu vermeiden, wurden die Kulturen anschließend in je 1 ml PBS gelagert.

Die 0,1%ige Osmiumtetroxidlösung (Osmium tetroxide solution 2%; Sigma-Aldrich; #75633) wurde in PBS verdünnt. Für die Sudanschwarz-Lösung wurden 50 mg Sudanschwarz in 10 ml 70% Ethanol unter kräftigem Schütteln gelöst. Die so hergestellte Suspension wurde durch einen 0,2 µm Filter filtriert, um nicht gelöste Partikel von Sudanschwarz zu entfernen.

Der Färbeprozess fand im Anschluss in folgenden Schritten statt:

1. Die fixierten DRG-Kulturen wurden mit 350 µl der vorbereiteten 0,1% Osmiumtetroxidlösung pro Well bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Zur Dehydration wurden die DRGs nacheinander mit je 25%, 50% und 70% Ethanol, jeweils für 5 Minuten, bedeckt.
3. Die DRGs wurden mit circa 350 µl der zuvor hergestellten Sudanschwarz-Lösung bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Überschüssige Sudanschwarz-Lösung wurde mit einer absteigenden Ethanolreihe von 70%, 50% und 25% Ethanol, jeweils für eine Minute inkubiert und somit entfernt und die DRG-Kulturen wurden rehydriert
5. Nach Abschluss des Färbeprozesses wurden die DRG-Kulturen mit 2 ml sterilem PBS bedeckt.

Die fixierten und gefärbten Kulturen konnten dann mittels Durchlichtmikroskopie untersucht und mithilfe einer eingebauten Leica-Kamera sowie der LasX-Software dokumentiert. Jedes kultivierte Well wurde in der 20er Vergrößerung schrittweise und mäanderförmig erfasst. Diese

Bilder wurden mittels ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) analysiert und jedes Neuron und Internodium wurden einzeln identifiziert und gezählt.

2.4 Quetschung des Nervus ischiadicus – Sciatic nerve crush

Das Modell der Nervenquetschung, im Englischen "sciatic nerve crush", wird häufig angewendet, um Axonotmesis bei Nagetieren zu simulieren. Dabei handelt es sich um ein gebräuchliches Modell für periphere Nervenläsionen, welches genutzt wird, um Nervendegeneration und -regeneration zu evaluieren. Bei dieser Art der Verletzung werden die Axone unterbrochen, während die längsgerichtete Kontinuität des Endoneuriums weitgehend intakt bleibt. Dies ermöglicht eine axonale Regeneration (Beer et al., 2001).

Für die in dieser Arbeit beschriebene Methode wurden männliche Mäuse des Wildtyps C57BL/6 im Alter von 3-4 Monaten verwendet. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt und gemäß den Richtlinien für Versuchstierkunde durchgeführt.

Die Mäuse wurden für die chirurgische Eingriffe durch eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Xylazin (10 mg/kg, Rompun 2 %; Xylazine Hydrochloride; 20 mg/ml; #KP06XCD; Bayer) und Ketamin (100 mg/kg, Ketamin-Actavis; Ketamine Hydrochloride; 500 mg/10 ml; #118064; Actavis) anästhesiert. Nach Anästhesiebeginn wurde das Fell des unteren Rückens und der Hinterbeine mit einem elektrischen Rasierer entfernt. Die Haut wurde im Anschluss mit einer 70%igen Ethanol-Lösung desinfiziert.

Ein Hautschnitt von etwa 1,0 cm wurde an der Dorsalseite der rechten unteren Extremität, ungefähr 0,5 cm proximal zum Knie, angelegt. Das Fasziengewebe zwischen dem Musculus biceps femoris und dem Musculus gluteus maximus wurde vorsichtig geöffnet, um den Nervus ischiadicus freizulegen. Mithilfe einer gebogenen Pinzette wurde der Nerv sorgfältig angehoben und für 30 Sekunden mit einer nicht gezahnten Gefäßklemme komprimiert. Der Nerv wurde direkt vor seinen distalen Ästen gequetscht.

Nach der Kompression wurden Nerv und Muskulatur vorsichtig in ihre ursprünglichen Positionen zurückgelegt. Der Hautschnitt wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial durch Einzelknopfnaht verschlossen. Der kontralaterale Nerv blieb als Kontrolle intakt.

2.5 Entfernung des Nervus ischiadicus und Präparation der Semidünnschnitte

Die Ischiasnerven wurden vorsichtig entfernt, indem nur das proximalste Ende mit einer Zange angefasst und der Nerv an seinem distalsten Ende mit einer Schere durchtrennt wurde. Unmittelbar nach ihrer Entnahme wurden die Nerven in einer 0,1 M Cacodylat-Pufferlösung, die 2,5 % Glutaraldehyd enthielt, fixiert und bei 4°C über Nacht gelagert. Anschließend wurde das Fixierungsmittel durch eine Waschpufferlösung (0,1 M Glutaraldehyd + 3 % Saccharose) ersetzt. Die Nerven wurden in dieser Lösung vier Tage gewaschen.

Nach dem Waschen wurden die Proben für 3 Stunden in einem Osmium-Tetroxid-Reagenz inkubiert. Dieses Reagenz bestand aus einem Teil 5 % Kaliumdichromat-Lösung (pH 7,4), einem Teil 3,4% NaCl-Lösung und zwei Teilen 2 % Osmium-Tetroxid-Lösung. Nach der Inkubation wurde das OsO4-Reagenz verworfen und die Proben wurden kurz in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen.

Die Proben wurden in einer aufsteigenden Ethanolserie dehydratisiert. Dies umfasste eine einstündige Inkubation in jeweils 70 %, 96 % und ≥ 99,8 % unverändertem Ethanol. Nach der Dehydratisierung wurden die Proben eine Stunde lang bei Raumtemperatur in 250 µl Propylenoxid in dicht verschlossenen Behältern inkubiert. Danach folgte eine einstündige Inkubation in einer 1:1 Mischung aus Propylenoxid und Epon. Schließlich wurden sie über Nacht ausschließlich in Epon bei 4°C aufbewahrt.

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben in Silikonformen mit einer Epon-Einbettungsmischung bedeckt. Die eingebetteten Proben wurden dann bei einer gestaffelten Temperatur inkubiert: 37°C für 6 Stunden, 47°C für 15 Stunden und abschließend bei 60°C für 28 Stunden, bis das Epon vollständig ausgehärtet war.

Querschnitte wurden mit einer Dicke von 1 µm an einem Reichert-Jung Ultracut Mikrotom vorbereitet. Diese wurden unmittelbar mit Toluidinblau gefärbt, indem sie in eine 1 %ige Toluidinblau-Lösung (w/v) eingetaucht wurden, die in einer 1 %igen Dinatriumtetraborat-Lösung (w/v) gelöst war. Anschließend wurden sie in deionisiertem Wasser (ca. 10 ml) gewaschen, welches 1-2 Tropfen Säure-Ethanol (0,01 % HCl in absolutem Ethanol) enthielt. Schließlich wurden die gefärbten Abschnitte auf ein Mikroskopobjektträger gelegt, auf einer Heizplatte getrocknet und mit Roti Histokitt II montiert.

2.6 Behandlung mit hochdosiertem Biotin

Die Mäuse erhielten Biotin (BioReagent Qualität, Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 60 mg/kg Körpergewicht einmal täglich durch intraperitoneale Injektion, was einer humanen Äquivalentdosis von etwa 300 mg pro Tag entspricht. Biotin wurde in Phosphat-gepufferter Salzlösung (Dulbecco's PBS, steril, Gibco) gelöst, die 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, BioReagent Qualität, Sigma-Aldrich) enthielt und auf einen physiologischen pH-Wert eingestellt war. Vor der Injektion wurde die Lösung steril filtriert. Kontrolltiere erhielten ein gleiches Volumen ohne Biotinzusatz.

2.7 Gewicht

Das Gewicht der Mäuse ist ein wichtiger Parameter in Tierversuchen, um festzustellen, ob die Gewebemasse der C57BL6-Mäuse nach der Verabreichung von Biotin Veränderungen aufweist. Daher wurden sowohl die Mäuse der Kontrollgruppe als auch die Mäuse der Biotin-behandelten Gruppe am 1., 2., 8., 15. und 21. Tag nach der Nervenläsion gewogen.

2.8 Bewertung der Nervenfunktionalität mittels Griff-Stärke-Analyse

Die Nervenfunktionalität wurde mittels Griffkraft-Analyse der rechten (gequetschten) und linken (nicht gequetschten) Hintergliedmaßen unter Verwendung eines modifizierten Kraftmessgeräts (Erichsen Physimeter 906 MC-B) 2 Tage vor der Quetschverletzung und 7, 14 und 21 Tage nach der Verletzung evaluiert. Die Maus wurde mit einem festen Griff hinter ihrem Kopf gehandhabt, wobei die Hintergliedmaßen frei bewegt werden konnten. Anschließend wurden die Hintergliedmaßen vorsichtig über eine Metallstange gezogen und die maximale Kraft, die vor dem Loslassen der Maus angewendet wurde, wurde aufgezeichnet. Die Mäuse wurden dreimal hintereinander getestet und die Daten wurden für jede Maus und jeden Zeitpunkt gemittelt.

2.9 Bewertung morphometrischer Daten

Die morphometrische Analyse wurde unter Verwendung von ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) durchgeführt. Die Axonanzahlen von ganzen Faszikeln wurden manuell gemessen, indem jedes einzelne Axon markiert wurde. Axonanzahlen wurden auf die

Faszikel-Fläche normiert. Für die Bewertung der g-Ratio und Axondurchmesser wurde der Umfang der Axonen und ihrer jeweiligen Myelinscheiden innerhalb zufällig ausgewählter Felder gemessen. Mindestens 200 Axone pro Nerv wurden ausgewertet. Für die Berechnung der g-Ratio wurde der Axonumfang durch den Umfang der jeweiligen Myelinscheide geteilt. Axondurchmesser wurden aus dem Axonumfang berechnet.

2.10 Bestimmung der Malonyl-CoA-Spiegel

Die Malonyl-CoA-Spiegel im Nervus ischiadicus wurden mit dem kommerziell erhältlichen Mouse Malonyl Coenzyme A ELISA Kit (MyBioSource) bestimmt. Zunächst wurden die Ischiasnerven in eiskaltem PBS mit einer cOmplete™ Mini (Roche) Proteinase-Inhibitor-Mischung homogenisiert. Diese Homogenate wurden daraufhin für 10 Minuten bei 11.000 U/min zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand in neue Probenröhrchen überführt und verdünnt. Die Detektion von Malonyl-CoA wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Der Malonyl-CoA-Gehalt im Nervus ischiadicus wurde auf den jeweiligen Proteininhalt der Probe normiert.

2.11 Bild- und statistische Datenanalyse

Die Bildanalyse wurde mit ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) durchgeführt. Die Datenanalyse und Zusammenstellung von Diagrammen erfolgte mit Microsoft (Redmond, WA, USA) Excel und GraphPad (La Jolla, CA, USA) Prism 7. Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mittels der ANOVA (Analysis of Variance) - Varianzanalyse durchgeführt, um die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen miteinander zu vergleichen. In diesem Fall wurde das Verhältnis der Internodien und Neuronen der Kontrollkulturen in Bezug zum Verhältnis der hochdosierten Biotin Co-Kulturen verglichen. Als post-hoc-Test wurde der Dunnett-Test angewendet. Dieser dient im Rahmen der Varianzanalyse zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten einer einzelnen Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen mit hochdosiertem Biotin. Die präsentierten Daten werden mit Mittelwert ± SEM („standard error of the mean“) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0{,}05$ festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss der Biotinzugabe auf die Neuronen- und Internodienzahl

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Myelinisierungsversuche mit DRGs präsentiert. Abbildung 5 illustriert das Verhältnis von Neuronen zu Internodien bei verschiedenen Biotin-Konzentrationen. Es zeigt sich, dass selbst bei extrem hohen Dosierungen von Biotin kein signifikanter Einfluss auf die Anzahl der Internodien beobachtet wird.

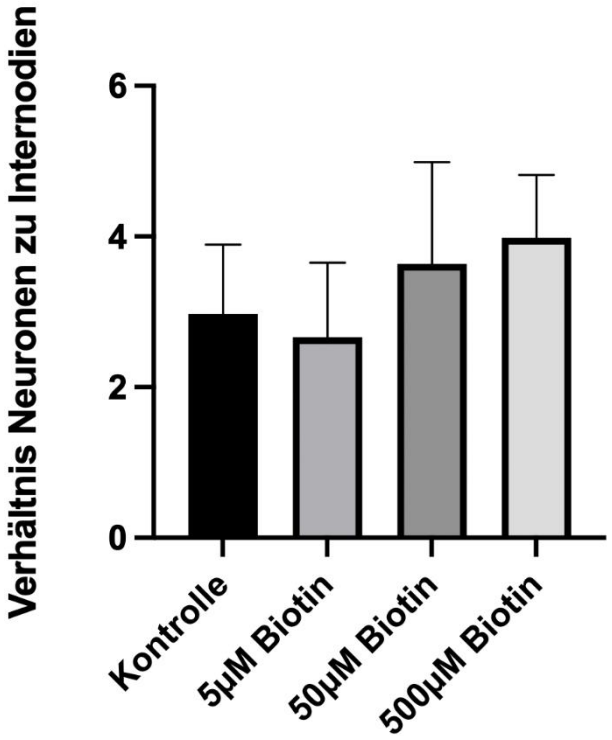

Abbildung 5: Der Signifikanzmarker kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede im Neuronen-Internodien-Verhältnis zwischen den verschiedenen Experimentgruppen. Im Zellkulturmodell wurde das Neuronen-Internodien-Verhältnis in Abhängigkeit von der Biotinkonzentration untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einer Kontrollgruppe verglichen, die keinen Biotinzusatz erhielt. Durch diesen Vergleich konnte festgestellt werden, ob und in welchem Ausmaß Biotin das Verhältnis zwischen Neuronen und ihren Myelinscheiden beeinflusst.

Abbildung 6 zeigt beispielhaft die mikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturen, die mit verschiedenen Biotin-Konzentrationen behandelt und mit Sudan-Schwarz-B gefärbt wurden.

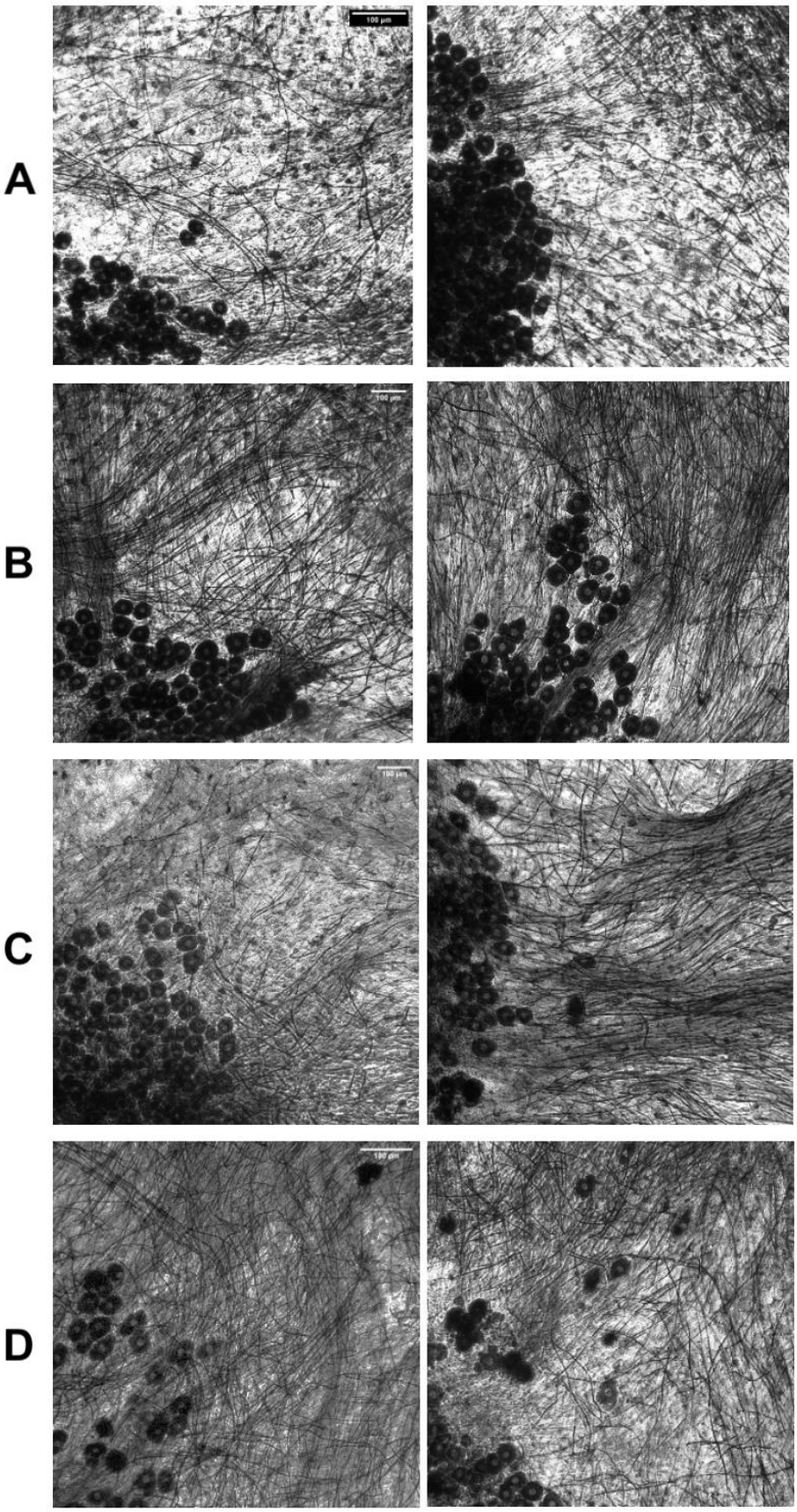

Abbildung 6: A-D: Sudan-Schwarz-B behandelte Zellkulturen. Bilderreihen A-D zeigen die Neurone und Internodien nach Sudan-Schwarz B-Färbung. Reihe A) zeigt die Kontrollgruppe ohne Zusatz von Biotin. Reihe B) zeigt Neurone, die mit 0,5 µM Biotin behandelt wurden. Reihe C) zeigt Neurone, die mit 5 µM Biotin behandelt wurden und die letzte Reihe D) zeigt Neurone, die mit hochdosiertem (50 µM) Biotin behandelt wurden.

3.2 Effekte von Biotin nach Nervenverletzung

3.2.1 Einfluss der Biotinzugabe auf das Gewicht

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit Nervenläsionen dargestellt. Abbildung 7 illustriert die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere an den Tagen 1, 2, 8, 15 und 21 nach der Nervenverletzung. Es wurde eine vergleichbare Gewichtsentwicklung sowohl bei den mit Biotin behandelten als auch bei den unbehandelten Mäusen festgestellt. Der Gewichtsverlauf bestätigt, dass insbesondere hochdosiertes Biotin keinen direkten schädlichen Effekt auf die Versuchstiere hatte. Im betrachteten Untersuchungszeitraum ergaben sich keine signifikanten Gewichtsveränderungen.

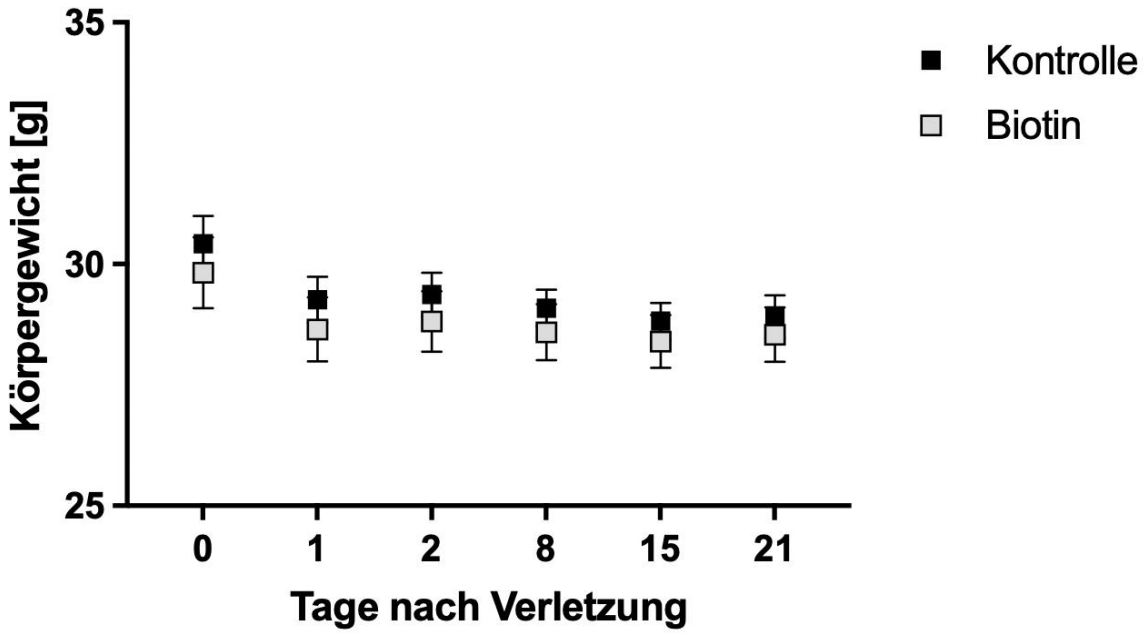

Abbildung 7: Gewichtsentwicklung im Tiermodell. Der Signifikanzmarker kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede in den Gewichtsdaten der Versuchstiere. Er wird verwendet, um zu bestimmen, ob die beobachteten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen den Gruppen tatsächlich durch die Behandlung bedingt sind oder ob sie zufällig entstanden sind. Die Gewichtsentwicklung im Tiermodell wird innerhalb des Untersuchungszeitraumes verfolgt. Die Abszissenachse stellt die Zeit dar, während die Ordinatenachse das Körpergewicht der Versuchstiere abbildet. Verglichen werden die Gewichtsveränderungen der mit Biotin behandelten Mäuse und der Kontrolltiere, die keine Biotingabe erhielten. Diese Abbildung ist modifiziert nach Szepanowski et al. 2023.

3.2.2 Einfluss der Biotinzugabe auf die Griffkraft

Über einen Zeitraum von 21 Tagen wurde die Griffkraft an den Tagen 7, 14 und 21 nach der Nervenverletzung analysiert (Abbildung 8). Die Griffkraft dient als Indikator für die Innervierung der Muskulatur durch motorische, myelinisierte Neuronen. Der Vergleich erfolgte zwischen den hinteren rechten Gliedmaßen mit Nervenläsionen und den hinteren linken Gliedmaßen ohne Läsionen. Die Ergebnisse zeigten, dass in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Griffkraft zwischen verletzten und unverletzten Nerven zu beobachten waren. Daraus lässt sich schließen, dass weder in der Kontrollgruppe noch in den mit Biotin behandelten Gruppen eine wesentliche Verbesserung der Griffkraft festgestellt wurde.

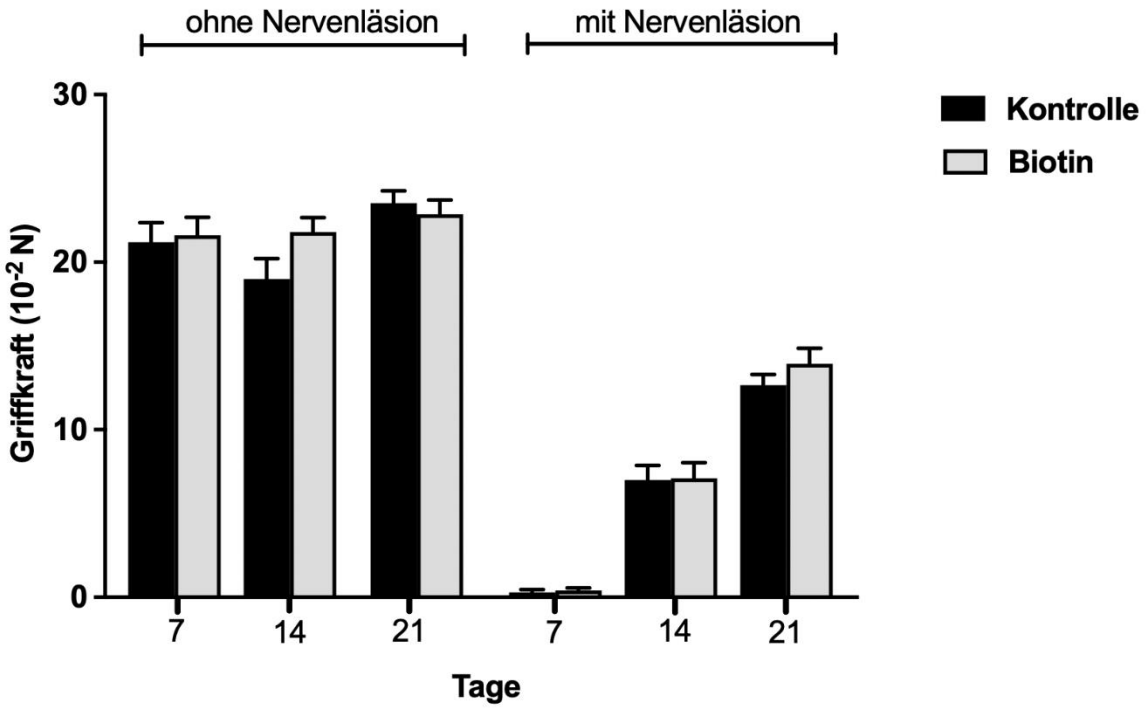

Abbildung 8: Die Veränderung der Griffkraft über den Untersuchungszeitraum. Auf der Abszissenachse ist die Zeit in Tagen dargestellt, während die Ordinatenachse die gemessene Griffkraft der Versuchstiere abbildet. Die Daten zeigen die Entwicklung der Griffkraft sowohl bei Biotin-behandelten Mäusen als auch bei Kontrolltieren. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Diese Abbildung ist modifiziert nach Szepanowski et al. 2023.

3.2.3 Einfluss der Biotinzugabe auf den Malonyl-CoA-Gehalt des Nervus ischiadicus

Eine periphere Nervenverletzung führt aufgrund der Remyelinisierung durch Schwann-Zellen zu einer erhöhten Fettsäuresynthese (Gaudet et al., 2011). Der Prozess der Malonyl-CoA-Synthese, als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Fettsäuresynthese, ermöglicht es, durch Messung des Malonyl-CoA-Gehalts Einblicke in die Fettsäuresynthese zu erhalten. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde den Tieren täglich Biotin mittels intraperitonealer Injektion verabreicht. Der Malonyl-CoA-Gehalt zeigte, dass die Biotinzugabe in beiden Gruppen (verletzter und unverletzter Nerv) keine signifikante Steigerung induzierte (Abbildung 9). In den verletzten Nerven war eine erhöhte Malonyl-CoA-Synthese, bedingt durch die Remyelinisierung, sowohl in der Biotin-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe feststellbar.

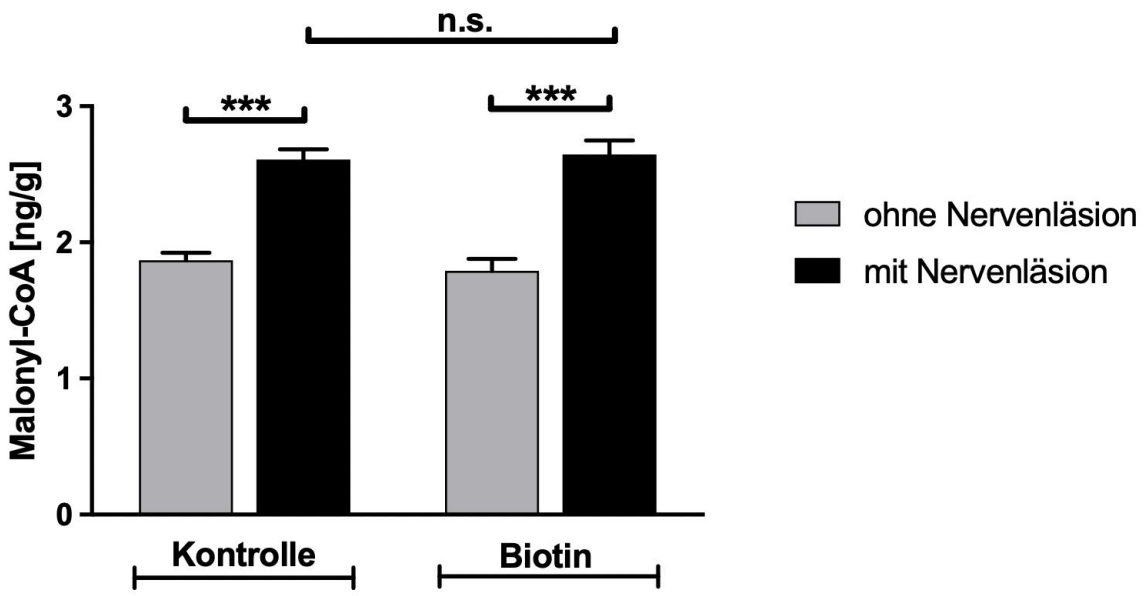

Abbildung 9: Malonyl-CoA-Gehalt im Tiermodell über einen Experimentalzeitraum von 14 Tagen. Der Malonyl-CoA-Gehalt wurde in Kontrollgruppen und Untersuchungsgruppen, die täglich Biotin mittels intraperitonealer Injektion (60 mg/kg) erhielten, gemessen. Der Vergleich erfolgte zwischen den hinteren Gliedmaßen mit und ohne Nervenläsion desselben Tieres. Die Abszissenachse zeigt die verschiedenen Gruppen: eine Gruppe ohne Nervenläsion und eine Gruppe mit Nervenläsion, bei Kontrolltieren und bei Biotin-behandelten Tieren. Die Ordinatenachse stellt den Malonyl-CoA-Gehalt in mg/g der Versuchstiere dar. Verglichen wird also der Malonyl-CoA-Gehalt der mit Biotin behandelten Mäuse und der Kontrollmäuse, jeweils sowohl mit als auch ohne Nervenläsion. Diese Abbildung ist modifiziert nach Szepanowski et al. 2023.

3.3 Einfluss der Biotinzugabe auf den Axon-Durchmesser und die g-Ratio

Im weiteren Verlauf der Studie wurde der Effekt der Biotin-Supplementierung auf den Axondurchmesser sowie die g-Ratio untersucht. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 10). Zusätzlich ergaben histologische Analysen 21 Tage nach der Quetschverletzung (Abbildung 11), dass eine HDB

keinen Einfluss auf die Verteilung der myelinisierten Axone hatte. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine hochdosierte Biotin-Supplementierung keinen nachweisbaren Einfluss auf den Axondurchmesser und die g-Ratio in geschädigten Nerven hat. Die g-Ratio, ein etabliertes Maß für die Myelinisierung, blieb trotz Biotin-Supplementierung unverändert, was auf eine fehlende Wirkung auf die Myelindicke und die axonale Regeneration hinweist. Histologische Untersuchungen bestätigten zusätzlich, dass die Verteilung der myelinisierten Axone durch die Biotinbehandlung nicht beeinträchtigt wurde.

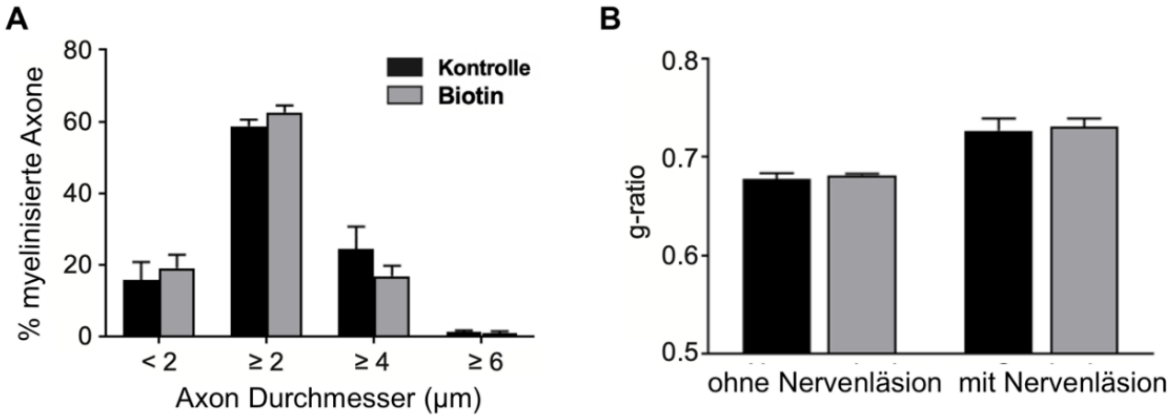

Abbildung 10: (A) Die Ergebnisse des Axondurchmessers zeigen keine Unterschiede im Verhältnis der myelinisierten Axone in lädierten Nerven zwischen den Behandlungsgruppen. (B) Messungen des g-Ratios 21 Tage nach der Läsion zeigen keinen Einfluss der hochdosierten Biotinbehandlung auf die Myelinstärke bzw. Remyelinisierung. Diese Abbildung ist modifiziert nach Szepanowski et al. 2023.

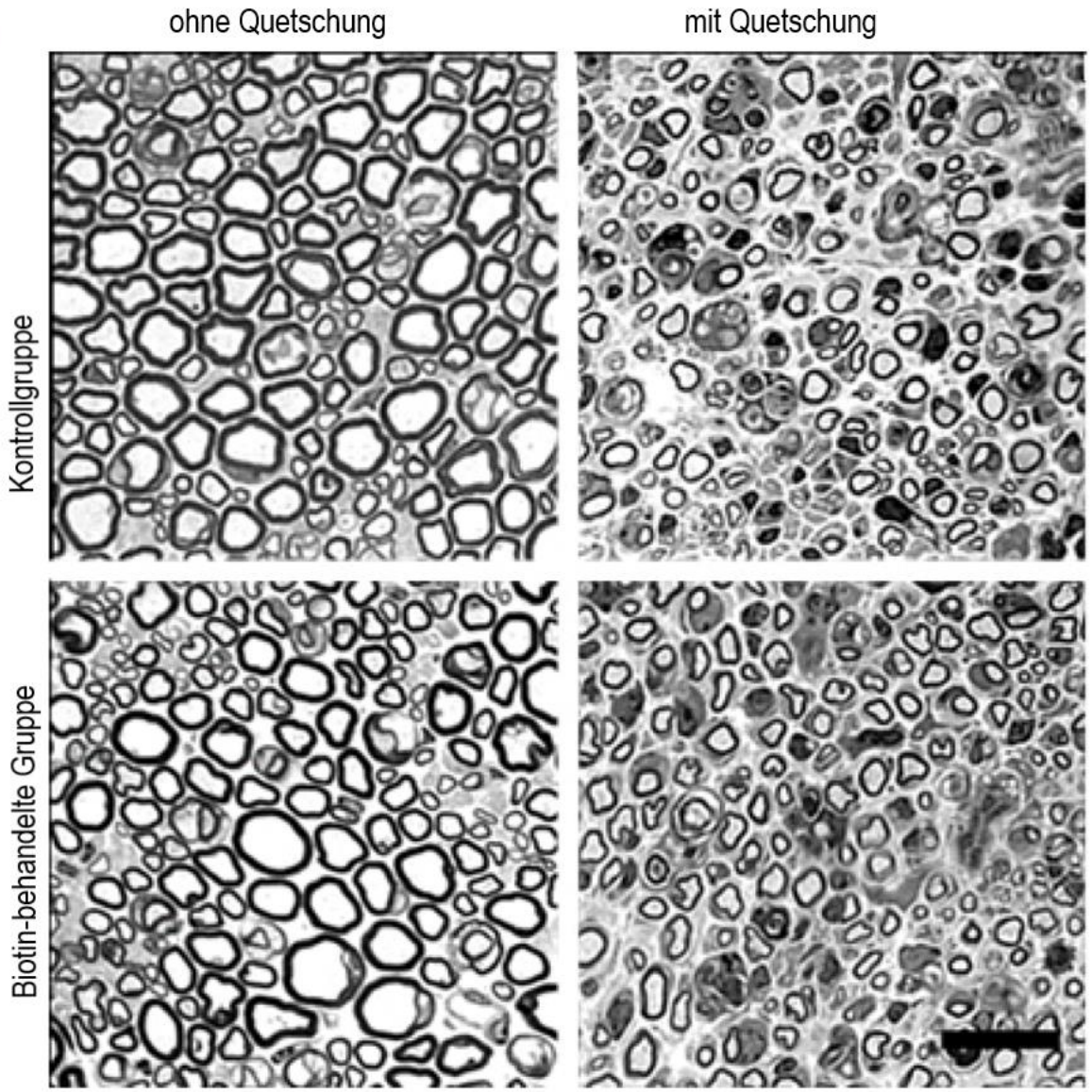

Abbildung 11: Toluidinblau-gefärbte Semi-Dünn-Schnitte des distalen verletzten Nervenstumpfes 21 Tage nach der Quetschverletzung. Die Abbildung zeigt sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Biotin-behandelten Gruppe keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der myelinisierten Axone. Dies deutet darauf hin, dass HDB keinen Einfluss auf die Myelinisierung oder die axonale Regeneration hat. Die g-Ratio, ein Maß für die Myelindicke, blieb unverändert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Biotin die axonale Remyelinisierung und die Verteilung der myelinisierten Axone nicht beeinflusst. Skalenbalken: 10 µm. Diese Abbildung ist modifiziert nach Szepanowski et al. 2023.

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von HDB auf die *in vitro* Myelinisierung peripherer Nerven sowie auf die *in vivo* Remyelinisierung in verletzten peripheren Nerven zu untersuchen. Dabei wurden die folgenden Parameter analysiert, um die Effekte von Biotin zu bewerten:

1. **Klinische Parameter:**
   - Griffstärke: Die Analyse der Griffkraft, die die Innervierung der Muskulatur durch myelinisierte Axone widerspiegelt, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Biotin behandelten und den unbehandelten Tieren, sowohl in den verletzten als auch in den unverletzten Nerven.
   - Tiergewicht: Die Zugabe von Biotin hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Tiere, was darauf hinweist, dass hochdosiertes Biotin gut verträglich war.
2. **Strukturelle Parameter:**
   - Internodien: Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung zeigten, dass selbst bei hochdosierter Zugabe von Biotin keine signifikante Veränderung der Anzahl der Internodien zu verzeichnen war. Es gab lediglich eine leichte Tendenz, die auf eine erhöhte Anzahl von Internodien bei höheren Biotinkonzentrationen hindeutete, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant.
3. **Mechanistische Parameter:**
   - Malonyl-CoA: Die Messung des Malonyl-CoA-Gehalts ergab, dass die Biotinzugabe keine signifikante Steigerung in beiden Gruppen (verletzte und unverletzte Nerven) bewirkte. Dennoch war in den verletzten Nerven eine erhöhte Malonyl-CoA-Synthese aufgrund der Remyelinisierung feststellbar, sowohl in der Biotin-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe.

In dieser Studie konnte trotz umfassender Experimente keine signifikante Veränderung in der Anzahl der Internodien, der Griffkraft der Tiere und des Malonyl-CoA-Gehalts durch Biotin-Zugabe feststellen. Dies steht im Gegensatz zu vorherigen Theorien, die Biotin eine potenzielle Rolle bei der Remyelinisierung und Myelinisierung zusprechen (Sedel et al., 2016b).

Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, die Rolle des Malonyl-CoA-Gehalts im Kontext der Fettsäuresynthese und Myelinbildung zu betrachten. ACC1 und ACC2, für welche Biotin als

essenzieller Kofaktor dient, sind Schlüsselenzyme bei der Synthese von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA. Malonyl-CoA ist nicht nur ein wesentlicher Baustein für die Fettsäuresynthese, sondern hat auch Einfluss auf den Fettstoffwechsel der Zelle (Foster, 2012; Tong, 2013b).

Malonyl-CoA koordiniert auch das Gleichgewicht zwischen Fettsäuresynthese und Fettsäureoxidation. Wenn der zytosolische Malonyl-CoA-Spiegel steigt, erhöht sich die Fettsäuresyntheserate und wenn der peri-mitochondriale Malonyl-CoA-Spiegel aus der von ACC2 katalysierten Reaktion steigt, wird die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 gehemmt und die Fettsäuretransportrate in die Mitochondrien sinkt, was zu einer verringerten Fettsäure-Beta-Oxidation führen soll (Foster, 2012; McGarry, 1978). Im Kontext der Myelinbildung stellt Malonyl-CoA einen potenziellen Ansatzpunkt für die Beeinflussung der Remyelinisierung dar. Obwohl die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) in für die Myelinbildung spezialisierten Zellen hoch exprimiert wird, zeigte unsere Studie, dass die Biotinbehandlung nicht zum Anstieg des Malonyl-CoA-Gehalts führt. Dies deutet darauf hin, dass die postulierte Erhöhung des Malonyl-CoA-Gehalts durch Biotin nicht besteht. Darüber hinaus umfasst der Weg von einem erhöhten Malonyl-CoA-Gehalt zu komplexen Myelinstrukturen zahlreiche Schritte, einschließlich der transkriptionellen Regulation der Myelinsynthese. Die Studie von Sawamura et al. (2007) untersuchte die Auswirkungen einer übermäßigen oralen Biotinverabreichung auf den Biotingehalt und die Fettsäurezusammensetzung in verschiedenen Geweben, insbesondere in der Skelettmuskulatur junger Ratten. Die Forscher stellten fest, dass eine hohe Dosis von Biotin zu einer signifikanten Erhöhung der Biotinkonzentration in der Skelettmuskulatur führte. Dieser Befund ist besonders relevant, da die Skelettmuskulatur eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel spielt und eine dysregulierte Fettsäuresynthese hier weitreichende metabolische Konsequenzen haben könnte.

Die Studie legt nahe, dass eine gesteigerte Biotinaufnahme über die Nahrung möglicherweise den zellulären Fettsäurestoffwechsel beeinflusst, indem sie die Aktivität der ACC, eines Schlüsselenzyms in der Fettsäuresynthese, verstärkt. ACC katalysiert die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, welches als Ausgangsmolekül für die Fettsäuresynthese dient. Bei einem Ungleichgewicht könnte die erhöhte Fettsäuresynthese die Kapazität der Zellen zur Oxidation dieser Fettsäuren übersteigen, was zu einer Akkumulation von Fettsäuren und damit verbundenen metabolischen Problemen führen könnte.

Insgesamt zeigt die Studie von Sawamura et al., dass hohe Biotindosen nicht nur den Biotinspiegel in Geweben erhöhen, sondern möglicherweise auch den Lipidstoffwechsel in der Skelettmuskulatur beeinflussen. Dies könnte Implikationen für die Anwendung von hochdosiertem Biotin in therapeutischen Kontexten haben, da eine Dysregulation des

Fettsäurestoffwechsels zu negativen Effekten wie einer gestörten Energieproduktion oder sogar Muskelschäden führen könnte.

In diesem Zusammenhang vermuten Maillart et al. (2019), dass HDB durch die Aktivierung der ACC die Fettsäuresynthese in der Skelettmuskulatur verstärken könnte. Dies könnte ein Ungleichgewicht verursachen, bei dem die erhöhte Fettsäuresynthese die Kapazität der Fettsäureoxidation übersteigt, was zu metabolischen Störungen führen könnte (Maillart et al., 2019).

Darüber hinaus diskutieren die Autoren die Möglichkeit, dass HDB den Stoffwechsel oder Transport anderer essenzieller Vitamine, wie beispielsweise Riboflavin, beeinträchtigen könnte, was eine funktionelle Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase-Defizienz verursachen könnte. Diese Störung könnte wiederum eine Rolle bei der Entstehung von Myopathien spielen, wie sie in einzelnen Fallberichten beschrieben wurden (Maillart et al., 2019).

Präklinische Studien deuten auf eine zentrale Rolle von Biotin in der Regulation des Fettstoffwechsels hin. In einer Studie von Yuasa et al. (2022) wurde gezeigt, dass hohe Dosen von Biotin bei Ratten zu einer Reduktion des Körpergewichts führen und bei Mäusen eine Verringerung der hepatischen Triglyceridkonzentration sowie des epididymalen Fettgewebes bewirken. Diese Effekte lassen sich durch eine erhöhte Beta-Oxidation und eine gehemmt ablaufende Fettsäuresynthese erklären, die durch eine Aktivierung der phosphorylierten AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) im Lebergewebe induziert wurde (Yuasa et al., 2022).

Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen von Moreno-Mendez et al. (2019) unterstützt, die zeigten, dass Biotin die phosphorylierte, inaktive Form von ACC-2 verstärkt, was zu einer gesteigerten Beta-Oxidation führt. Diese Studien legen nahe, dass die Wirkung von Biotin überwiegend über die Aktivierung von AMPK vermittelt wird, welche die Aktivität von ACC-2 reguliert (Moreno-Méndez et al., 2019).

Unsere *in vivo*-Daten ergänzen den bisherigen Wissensstand über die Verträglichkeit von hochdosiertem Biotin. Während unsere Studie keine negativen Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung zeigte, wurden in der Literatur vereinzelt Fälle von Myopathien oder anderen unerwünschten Ereignissen beschrieben (Maillart et al., 2019). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hochdosiertes Biotin zwar gut verträglich sein könnte, jedoch noch offene Fragen hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen bestehen.

Andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, hatten gezeigt, dass das Hämatogrammprofil durch die Biotinzugabe nicht beeinträchtigt wird (Szepanowski et al., 2023). Dies deutet darauf hin, dass diese Behandlungsstrategie zumindest in Bezug auf die Verträglichkeit sicher sein könnte, wohingegen hier kein Konsens besteht (Motte & Gold (2020). So wurde in einem

Fallbericht eine vorübergehende Myopathie, die einer multiplen Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase-Defizienz ähnelt, als unerwünschtes Ereignis beschrieben (Maillart et al., 2019).

Im Zusammenhang mit unserer eigenen Studie, die den Einfluss von HDB auf die Remyelinisierung und periphere Nervenregeneration untersuchte, konnten wir jedoch keinen signifikanten Effekt von HDB auf die Myelinbildung oder die Malonyl-CoA-Produktion nachweisen. Diese Diskrepanz könnte durch mehrere Faktoren bedingt sein:

1. In präklinischen Modellen scheint Biotin primär die Beta-Oxidation zu fördern, was möglicherweise nicht direkt die Myelinbildung oder die Produktion von Malonyl-CoA beeinflusst (Moreno-Méndez et al., 2019; Yuasa et al., 2022).
2. Die Wirkung von Biotin auf ACC und die damit verbundene Malonyl-CoA-Synthese könnte komplexer sein als bisher angenommen. Obwohl Biotin die ACC-Aktivität moduliert, scheint es die Expression anderer wichtiger Regulatoren der Fettsäureoxidation, wie PPARα und CPT-1, nicht maßgeblich zu beeinflussen (Moreno-Méndez et al., 2019).
3. Es bleibt fraglich, ob die in präklinischen Studien beobachtete Stimulierung der Beta-Oxidation und Hemmung der Fettsäuresynthese tatsächlich eine verbesserte Remyelinisierung bewirken kann. Der Einfluss von Biotin auf ACC könnte in den spezialisierten Zellen, die für die Myelinbildung verantwortlich sind, unterschiedlich ausfallen.

Zu berücksichtigen ist auch, dass der Weg von einem erhöhten Gehalt an Malonyl-CoA, einem Intermediat des Fettsäurestoffwechsels, zu der Bildung komplexer Myelinstrukturen zahlreiche Schritte, einschließlich der transkriptionellen Regulation der Myelinsynthese, beinhaltet (Wang et al., 2022). Solche Schritte sind komplex und es bleibt unklar, wie Biotin diese Schritte beeinflussen könnte. Diese komplexen Interaktionen verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, um die genaue Rolle von Biotin bei der Regulation von Myelin-bedingten Prozessen besser zu verstehen.

Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass eine Biotin-Supplementierung mit einer Zunahme neuer Krankheitsaktivität in Verbindung stehen könnte. Verschiedene Studien deuten auf eine potenzielle Assoziation zwischen HDB und einer verstärkten Krankheitsprogression hin, wie z. B. durch das Auftreten neuer Läsionen im MRT bei Patienten mit multipler Sklerose (Birnbaum, 2017; Demas, 2020; Goldschmidt, 2020; Tourbah, 2016).

Auf der anderen Seite haben einige Studien positive Effekte von HDB bei Patienten mit MS hervorgehoben, z. B. in Bezug auf die Verbesserung der Behinderung (Sedel et al., 2015; Tourbah, 2016b). Allerdings zeigen neuere Daten gemischte Ergebnisse hinsichtlich der Verträglichkeit und Sicherheit von HDB. Besonders bemerkenswert sind Hinweise auf mögliche proinflammatorische Effekte und neue Läsionen bei MRT-Untersuchungen (Siddiqui, 2017).

Aktuelle Studien zu HDB bei Multipler Sklerose (MS) zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Frühere Untersuchungen, wie die offene Pilotstudie von Sedel et al. (2015), deuteten auf eine klinische Verbesserung hin, gemessen durch eine Verringerung der Expanded Disability Status Scale (EDSS). Diese Ergebnisse führten zur MS-SPI-Studie, in der 12,6 % der mit HDB behandelten Patienten nach 9 bis 12 Monaten Verbesserungen in der EDSS oder der T25FW-Werte zeigten, während in der Placebogruppe keine Verbesserungen beobachtet wurden (Tourbah et al., 2016). Neuere Studien werfen jedoch Zweifel an der Sicherheit und Wirksamkeit von HDB auf.

In der MS-SPI-Studie zeigten sowohl die HDB- als auch die Placebogruppen ähnliche Rückfallraten, wobei in der MRT bei 23,4 % der HDB-behandelten Patienten neue Läsionen im Vergleich zu 13 % in der Placebogruppe festgestellt wurden. Diese Beobachtungen deuten auf mögliche proinflammatorische Effekte von HDB hin (Siddiqui, 2017). Die jüngsten Ergebnisse der SPI2-Phase-3-Studie zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den primären oder sekundären Endpunkten zwischen den Gruppen. Die bestätigten Rückfälle waren in beiden Gruppen ähnlich, was die Wirksamkeit von HDB bei der Behandlung von MS weiter infrage stellt (Cree et al., 2020). Eine prospektive Beobachtungsstudie von Branger et al. (2020) berichtete, dass 26,2 % der mit HDB behandelten Patienten Rückfälle erlitten, wobei die Rückfallrate nach der Behandlung signifikant höher war.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer umfassender Studien zur genauen Bewertung der Sicherheit und Wirksamkeit von HDB bei MS. Es wird vermutet, dass HDB möglicherweise den Stoffwechsel von B-Vitaminen, insbesondere Riboflavin, beeinflussen könnte, was zu metabolischen Störungen wie Myopathien führen könnte (Demas, 2020; Maillart et al., 2019).

Im Kontext unserer Studie zur peripheren Nervenregeneration sind diese Fragen relevant. Obwohl die Hypothese bestand, dass HDB die Remyelinisierung durch eine Erhöhung der Malonyl-CoA-Synthese fördern könnte, zeigten unsere Ergebnisse keinen solchen Effekt. Stattdessen zeigte unsere Untersuchung, dass HDB weder die Malonyl-CoA-Spiegel signifikant beeinflusst noch die Nervenfunktion verbessert, was die Skepsis gegenüber seinem therapeutischen Potenzial untermauert.

Die komplexen Prozesse der Remyelinisierung, einschließlich Zellmigration, entzündungsmodulatorischer Mechanismen und Myelinabbau, bleiben entscheidende Forschungsfelder. Studien legen nahe, dass die Myelin-Clearance eine Schlüsselrolle in der Remyelinisierung spielt, insbesondere im peripheren Nervensystem (Yuan et al., 2022). Der Einfluss von Biotin auf diese spezifischen Prozesse war nicht Teil unserer Untersuchung und erfordert weitere Forschungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, obwohl erste Studien zu HDB bei MS vielversprechend waren, neuere Daten, einschließlich unserer eigenen Ergebnisse, seine Wirksamkeit bei der Remyelinisierung infrage stellen. Die unterschiedlichen Resultate betonen die Komplexität der Remyelinisierungsmechanismen und legen nahe, dass Biotins potenzielle Rolle begrenzt oder kontextabhängig sein könnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von hochdosiertem Biotin auf die Myelinisierung peripherer Nerven *in vitro* sowie die Remyelinisierung geschädigter peripherer Nerven *in vivo*.

Für die Myelinisierungsstudien *in vitro* wurde ein **Myelinisierungs-Kokulturmodell** mit unterschiedlichen Biotinkonzentrationen verwendet, das aus Neuronen und Schwann-Zellen besteht. Die Kontrollgruppen erhielten keine Biotinsupplementierung. Die Myelinisierung wurde durch **Sudanschwarz-Färbung** dargestellt und anschließend durch die **Lichtmikroskopie** analysiert. Dabei wurden die Neurone und Internodien der fixierten und gefärbten Kulturen quantitativ ausgewertet.

Die *in vivo*-Experimente erfolgten mittels **Nervenquetschungsmodell („nerve crush")**, um eine Axonotmesis bei C57BL/6-Wildtyp-Mäusen zu simulieren. Den Mäusen wurden 60 mg/kg Biotin intraperitoneal verabreicht. Man bewertete neben der regelmäßigen Gewichtskontrolle, die klinische Nervenfunktionalität durch **Griffstärke-Analysen** der Hintergliedmaßen. Des Weiteren erfolgte die morphometrische Analyse mittels **Zählung der Axone**, die Bewertung der **g-Ratio** sowie die Messung des **Axondurchmessers** und die Bestimmung die Malonyl-CoA-Spiegel im Nervus ischiadicus mittels **Enzym-gekoppelter Immunnachweis (engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay = ELISA).**

Die Ergebnisse der *in vitro*-Myelinisierungsstudien ergaben, dass selbst bei hohen Biotindosen keine signifikante Veränderung in der Anzahl der Internodien beobachtet wurde. Ebenso zeigten die *in vivo*-Untersuchungen bezüglich der Griffstärke keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verletzten und den unverletzten Nerven.

Bezüglich der Malonyl-CoA-Messungen zeigte sich, dass die Biotinzugabe keine signifikante Steigerung des Malonyl-CoA-Gehalts bewirkte. Dennoch konnte festgestellt werden, dass in den verletzten Nerven eine erhöhte Malonyl-CoA-Synthese in beiden Gruppen (Biotin-Gruppe und Kontrollgruppe), vermutlich durch die Remyelinisierung bedingt, auftrat. Die Untersuchung des Axondurchmessers und der g-Ratio zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Letztlich zeigte die Ergebnisse, dass Biotin weder die periphere Nervenregeneration signifikant fördert noch die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase oder die Malonyl-CoA-Produktion wesentlich beeinflusst. Es kann somit geschlossen werden, dass Biotin die Myelinregeneration im peripheren Nervensystem nicht verbessert.

6 SUMMARY

The present study investigated the influence of high-dose biotin on the myelination of peripheral nerves *in vitro* and the remyelination of damaged peripheral nerves *in vivo*.

For the myelination studies *in vitro*, a myelination co-culture model with different biotin concentrations consisting of neurons and Schwann cells was used. The control groups did not receive biotin supplementation. Myelination was visualized by Sudan black staining and then analyzed by light microscopy. The neurons and internodes of the fixed and stained cultures were quantitatively evaluated.

The *in vivo* experiments were performed using a **nerve crush model** to simulate axonotmesis in C57BL/6 wild-type mice. The mice were administered 60 mg/kg biotin intraperitoneally. In addition to regular weight monitoring, clinical nerve functionality was assessed by hindlimb **grip strength analysis**. Furthermore, morphometric analysis was performed by **counting the axons**, evaluating the **g-ratio**, **measuring the axon diameter** and determining the malonyl-CoA levels in the sciatic nerve using **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**.

The results of the *in vitro* myelination studies showed that no significant change in the number of internodes was observed even at high biotin doses. Similarly, the *in vivo* studies showed no significant differences in grip strength between the injured and uninjured nerves.

With regard to the malonyl-CoA measurements, it was found that the addition of biotin did not result in a significant increase in the malonyl-CoA content. Nevertheless, it was found that increased malonyl-CoA synthesis occurred in the injured nerves in both groups (biotin group and control group), presumably due to remyelination. The examination of axon diameter and g-ratio also showed no significant differences between the groups.

Finally, the results showed that biotin neither significantly promotes peripheral nerve regeneration nor significantly influences the activity of acetyl-CoA carboxylase or malonyl-CoA production. It can therefore be concluded that biotin does not improve myelin regeneration in the peripheral nervous system.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe, I. and O., N. and Ichimura, H. and Tsujino, A. and Sun, J. and Hara, Y. (2004). Internodes can nearly double in length with gradual elongation of the adult rat sciatic nerve. *J Orthop Res*, *22*, 571–577.
2. Armstrong, R. and T., A. D. and Morell, P. (1987). Axonal transport through nodes of Ranvier. *Brain Res*, *412*, 196–199.
3. Arthur-Farraj, P. J., Latouche, M., Wilton, D. K., Quintes, S., Chabrol, E., Banerjee, A., Woodhoo, A., Jenkins, B., Rahman, M., Turmaine, M., Wicher, G. K., Mitter, R., Greensmith, L., Behrens, A., Raivich, G., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2012). C-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron*, *75*(4), 633–647. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.021
4. Balakrishnan, A., Belfiore, L., Chu, T.-H., Fleming, T., Midha, R., Biernaskie, J., & Schuurmans, C. (2021). Insights Into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair From Studies of Development and Injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*, 608442. https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.608442
5. Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews*, *81*(2), 871–927. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871
6. Beer, G. M., Steurer, J., & Meyer, V. E. (2001). Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, *17*(7), 531–534. https://doi.org/10.1055/s-2001-17755
7. Birnbaum, G. and S., J. (2017). High dose biotin as treatment for progressive multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*, *18*, 141–143.
8. Branger, P. and P., J. J. and Derache, N. and Kassis, N. and Assouad, R. and Maillart, E. (2020). Relapses During High-Dose Biotin Treatment in Progressive Multiple

Sclerosis: A Case-Crossover and Propensity Score-Adjusted Prospective Cohort. *Neurotherapeutics*. https://doi.org/10.1007/s13311-020-00880-z

9. Brockes, J. P., Fields, K. L., & Raff, M. C. (1979). Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Research*, *165*(1), 105–118. https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90048-9
10. Byun, S. H. and A., K. M. (2021). *Functional and electron-microscopic changes after differential traction injury in the sciatic nerve of a rat* (Bd. 43). Maxillofac Plast Reconstr Surg.
11. Caillaud, M. and R., L. and Vallat, J. M. (2019). Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. *Neural Regen Res*, *14*, 24 33.
12. Campbell, N. A., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Reece, J. B. (2019). *Campbell Biologie* (A. Paululat & J. J. Heinisch, Hrsg.; 11., aktualisierte Auflage). Pearson.
13. Campbell, W. W. (2008). *Evaluation and management of peripheral nerve injury* (Bd. 119). Clin Neurophysiol.
14. Catala, M., & Kubis, N. (2013). Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. In *Handbook of Clinical Neurology* (Bd. 115, S. 29–41). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00003-5
15. Chapman-Smith, A. and J., Jr, Cronan. (1999). The enzymatic biotinylation of proteins: A post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci*, *24*, 359–363.
16. Coleman, M. P., & Freeman, M. R. (2010). Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat. *Annual Review of Neuroscience*, *33*, 245–267. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153248

17. Conforti, L., Gilley, J., & Coleman, M. P. (2014). Wallerian degeneration: An emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(6), 394–409. https://doi.org/10.1038/nrn3680
18. Contreras, E., Bolívar, S., Navarro, X., & Udina, E. (2022). New insights into peripheral nerve regeneration: The role of secretomes. *Experimental Neurology*, *354*, 114069. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114069
19. Cree, B. A. and C., G. and Wolinsky, J. S. and Freedman, M. S. and Comi, G. and Hartung, H. and Sedel, F. and Lublin, F. and Giovanni, G. (2020). *Results of the Phase 3 SPI2 study of MD1003 (High Dose Pharmaceutical Grade Biotin) in Progressive MS*. American Academy of Neurology Annual Conference2020.
20. Decker, L., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Taillebourg, E., Ghislain, J., Vallat, J.-M., & Charnay, P. (2006). Peripheral Myelin Maintenance Is a Dynamic Process Requiring Constant *Krox20* Expression. *The Journal of Neuroscience*, *26*(38), 9771–9779. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0716-06.2006
21. Demas, A. and C., J. P. and Hardy, C. and Vaschalde, Y. and Bourre, B. and Labauge, P. (2020a). Tardive reactivation of progressive multiple sclerosis during treatment with biotin. *Neurol Ther*, *9*, 181–185.
22. Demas, A. and C., J. P. and Hardy, C. and Vaschalde, Y. and Bourre, B. and Labauge, P. (2020b). Tardive Reactivation of Progressive Multiple Sclerosis During Treatment with Biotin. *Neurol Ther*, *9*(1), 181–185.
23. Di Scipio, F., Raimondo, S., Tos, P., & Geuna, S. (2008). A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microscopy Research and Technique*, *71*(7), 497–502. https://doi.org/10.1002/jemt.20577

24. Dun, X. P. and P., D. B. (2018). Transection and crush models of nerve injury to measure repair and remyelination in peripheral nerve. *Methods Mol Biol*, *251−62*.

25. Eisenberg, M. A. and P., O. and Hsiung, S. C. (1982). Purification and properties of the biotin repressor. A bifunctional protein. *J Biol Chem*, *257*, 15167–15173.

26. Fontana, X., Hristova, M., Da Costa, C., Patodia, S., Thei, L., Makwana, M., Spencer-Dene, B., Latouche, M., Mirsky, R., Jessen, K. R., Klein, R., Raivich, G., & Behrens, A. (2012). C-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *The Journal of Cell Biology*, *198*(1), 127–141. https://doi.org/10.1083/jcb.201205025

27. Foster, D. W. (2012). Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J. Clin. Invest*, *122*, 1958 1959.

28. Gaudet, A. D., Popovich, P. G., & Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, *8*, 110. https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-110

29. Ghislain, J., & Charnay, P. (2006). Control of myelination in Schwann cells: A Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Reports*, *7*(1), 52–58. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400573

30. Gigo-Benato, D. and R., T. L. and Tanaka, E. H. (2010). Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med*, *42*, 833 42.

31. Goldschmidt, C. H. and C., J. A. (2020). The rise and fall of high-dose biotin to treat progressive multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. https://doi.org.uk/10.1007/s13311-020-00907-5.

32. Goldstein, B. (2001). Anatomy of the peripheral nervous system. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, *12*(2), 207–236.

33. Goldstein, B. and M., I. G. (2007). The PAR proteins: Fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell*, *13*, 609–622.

34. Gould, R. M. and O., T. and Goldstone, J. V. and Dugas, J. C. and Brady, S. T. and Gow, A. (2008). Myelin sheaths are formed with proteins that originated in vertebrate lineages. *Neuron Glia Biol*, *4*, 137–152.

35. Griffin, J. W., George, E. B., & Chaudhry, V. (1996). Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Bailliere's Clinical Neurology*, *5*(1), 65–75.

36. Gudemez, E. and O., K. and Cunningham, B. (2002). Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve. *Microsurgery*, *22*, 234 41.

37. Hathcock, J. N. (2004). *Vitamin and mineral safety*.

38. Hess, D. T., Patterson, S. I., Smith, D. S., & Skene, J. H. (1993). Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature*, *366*(6455), 562–565. https://doi.org/10.1038/366562a0

39. Jessen, K. R., Mirsky, R., & Lloyd, A. C. (2015). Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(7), a020487. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487

40. Klimovich, P., Rubina, K., Sysoeva, V., & Semina, E. (2021). New Frontiers in Peripheral Nerve Regeneration: Concerns and Remedies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13380. https://doi.org/10.3390/ijms222413380

41. Le, N., Nagarajan, R., Wang, J. Y., Araki, T., Schmidt, R. E., & Milbrandt, J. (2005). Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(7), 2596–2601.

42. Lee, H. J., Shin, Y. K., & Park, H. T. (2014). Mitogen Activated Protein Kinase Family Proteins and c-jun Signaling in Injury-induced Schwann Cell Plasticity. *Experimental Neurobiology*, *23*(2), 130–137. https://doi.org/10.5607/en.2014.23.2.130
43. Lee, S. K., & Wolfe, S. W. (2000). Peripheral nerve injury and repair. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, *8*(4), 243–252. https://doi.org/10.5435/00124635-200007000-00005
44. Levy, D., Kubes, P., & Zochodne, D. W. (2001). Delayed peripheral Nerve Degeneration, Regeneration, and pain in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *60*(5), 411–421. https://doi.org/10.1093/jnen/60.5.411
45. Li, A., Pereira, C., Hill, E. E., Vukcevich, O., & Wang, A. (2022). In Vitro, In Vivo and Ex Vivo Models for Peripheral Nerve Injury and Regeneration. *Current Neuropharmacology*, *20*(2), 344–361. https://doi.org/10.2174/1570159X19666210407155543
46. Li, H. and J., J. P. and Xu, M. (2015). Changes in the blood-nerve barrier after sciatic nerve cold injury: Indications supporting early treatment. *Neural Regen Res*, *10*, 419 24.
47. Ludwig, P. E., Reddy, V., & Varacallo, M. (2023). Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS). In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442010/
48. Ma, T. C., & Willis, D. E. (2015). What makes a RAG regeneration associated? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*, 43. https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00043
49. Maillart, E. and M., F. and Acquaviva, C. and Maisonobe, T. and Stankoff, B. (2019a). Severe transient myopathy in a patient with progressive multiple sclerosis and high-dose biotin. *Neurology*, *92*, 1060–1062.

50. Maillart, E. and M., F. and Acquaviva, C. and Maisonobe, T. and Stankoff, B. (2019b). Severe transient myopathy in a patient with progressive multiple sclerosis and high-dose biotin. *Neurology*, *92*(22), 1060–1062.

51. Maillart, E., Mochel, F., Acquaviva, C., Maisonobe, T., & Stankoff, B. (2019). Severe transient myopathy in a patient with progressive multiple sclerosis and high-dose biotin. *Neurology*, *92*(22), 1060–1062. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007576

52. Malong, L., Napoli, I., Casal, G., White, I. J., Stierli, S., Vaughan, A., Cattin, A.-L., Burden, J. J., Hng, K. I., Bossio, A., Flanagan, A., Zhao, H. T., & Lloyd, A. C. (2023). Characterization of the structure and control of the blood-nerve barrier identifies avenues for therapeutic delivery. *Developmental Cell*, *58*(3), 174-191.e8. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.01.002

53. Marshall, K. L., & Farah, M. H. (2021). Axonal regeneration and sprouting as a potential therapeutic target for nervous system disorders. *Neural Regeneration Research*, *16*(10), 1901–1910. https://doi.org/10.4103/1673-5374.308077

54. Masaki, T. (2012). Polarization and myelination in myelinating glia. *ISRN Neurol*, 769412.

55. McGarry, J. D. and T., Y. and Foster, D. W. (1978). The role of malonyl-coa in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem*, *253*, 8294 8300.

56. Menorca, R. M. G. and F., T. S. and Elfar, J. C. (2013). Nerve physiology: Mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*, *29*, 317 30.

57. Menorca, R. M. G., Fussell, T. S., & Elfar, J. C. (2013). Nerve physiology: Mechanisms of injury and recovery. *Hand Clinics*, *29*(3), 317–330. https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.04.002

58. Mock, D. M. (2017). Biotin: From Nutrition to Therapeutics. *The Journal of Nutrition*, *147*(8), 1487–1492. https://doi.org/10.3945/jn.116.238956

59. Monk, K. R. and N., S. G. and Glenn, T. D. and Mercurio, S. and Perlin, JR, Dominguez and C, Moens and CB, Talbot and W. S. (2009). A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science*, *325*, 1402.

60. Moreno-Méndez, E., Hernández-Vázquez, A., & Fernández-Mejía, C. (2019). Effect of biotin supplementation on fatty acid metabolic pathways in 3T3-L1 adipocytes. *BioFactors*, *45*(2), 259–270. https://doi.org/10.1002/biof.1480

61. Motte, J., & Gold, R. (2020). High-dose biotin in multiple sclerosis: The end of the road. *The Lancet Neurology*, *19*(12), 965–966. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30353-7

62. Nagarajan, R., Svaren, J., Le, N., Araki, T., Watson, M., & Milbrandt, J. (2001). EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron*, *30*(2), 355–368. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00282-3

63. Nishimoto, S. and T., H. and Okamoto, M. (2015). Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve. *Front Cell Neurosci*, *9*, 298.

64. Önger, M. E., Delibaş, B., Türkmen, A. P., Erener, E., Altunkaynak, B. Z., & Kaplan, S. (2017). The role of growth factors in nerve regeneration. *Drug Discoveries & Therapeutics*, *10*(6), 285–291. https://doi.org/10.5582/ddt.2016.01058

65. Oudejans, E., Luchicchi, A., Strijbis, E. M. M., Geurts, J. J. G., & van Dam, A.-M. (2021). Is MS affecting the CNS only? Lessons from clinic to myelin pathophysiology. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *8*(1), e914. https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000914

66. Ozand, P. T. and G., G. G. and Al Essa, M. and Joshi, S. and Al Jishi, E. and Bakheet, S. and Al Watban, J. and Al-Kawi, M. Z. and Dabbagh, O. (1998). Biotin-responsive basal ganglia disease: A novel entity. *Brain*, *121*, 1267–1279.

67. Päiväläinen, S., Nissinen, M., Honkanen, H., Lahti, O., Kangas, S. M., Peltonen, J., Peltonen, S., & Heape, A. M. (2008). Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *37*(3), 568–578. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.12.005

68. Parkinson, D. B., Bhaskaran, A., Arthur-Farraj, P., Noon, L. A., Woodhoo, A., Lloyd, A. C., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Behrens, A., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2008). C-Jun is a negative regulator of myelination. *The Journal of Cell Biology*, *181*(4), 625–637. https://doi.org/10.1083/jcb.200803013

69. Paskal, A. M. and P., W. and Pietruski, P. (2020). Neuroregenerative effects of polyethylene glycol and FK-506 in a rat model of sciatic nerve injury. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, *73*, 222 30.

70. Pellegatta, M., & Taveggia, C. (2019). The Complex Work of Proteases and Secretases in Wallerian Degeneration: Beyond Neuregulin-1. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 93. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00093

71. Pfüller, U., Franz, H., & Preiss, A. (1977). Sudan Black B: Chemical structure and histochemistry of the blue main components. *Histochemistry*, *54*(3), 237–250. https://doi.org/10.1007/BF00492246

72. Podratz, J. L., Rodriguez, E. H., & Windebank, A. J. (2004). Antioxidants are necessary for myelination of dorsal root ganglion neurons, in vitro. *Glia*, *45*(1), 54–58. https://doi.org/10.1002/glia.10302

73. Qu, S. W. and M., N. and Wang, W. X. (2022). *Construction and effect evaluation of different sciatic nerve injury models in rats* (Bd. 13). Transl Neurosci.

74. Rassow, J., Netzker, R., & Hauser, K. (2022). *Duale Reihe Biochemie* (5. vollständig überarbeitete Auflage). Thieme.

75. Reichardt, L. F., & Tomaselli, K. J. (1991). Extracellular matrix molecules and their receptors: Functions in neural development. *Annual Review of Neuroscience*, *14*, 531–570. https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002531

76. Rigoard, P., Buffenoir, K., Wager, M., Bauche, S., Giot, J.-P., Robert, R., & Lapierre, F. (2009). [Anatomy and physiology of the peripheral nerve]. *Neuro-Chirurgie*, *55 Suppl 1*, S3-12. https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2008.03.009

77. Rotshenker, S. (2007). Wallerian Degeneration. In R. F. Schmidt & W. D. Willis (Hrsg.), *Encyclopedia of Pain* (S. 2659–2662). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29805-2_4855

78. Said, H. M. (2012). Biotin: Biochemical, physiological and clinical aspects. *Sub-Cellular Biochemistry*, *56*, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2199-9_1

79. Salles, J., Sargueil, F., Knoll-Gellida, A., Witters, L. A., Cassagne, C., & Garbay, B. (2003). Acetyl-CoA carboxylase and SREBP expression during peripheral nervous system myelination. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1631*(3), 229–238. https://doi.org/10.1016/s1388-1981(03)00041-6

80. Salles, J., Sargueil, F., Knoll-Gellida, A., Witters, L. A., Cassagne, C.,Garbay, B. (2003): Acetyl-CoA carboxylase and SREBP expression during peripheral nervous system myelination. Biochim Biophys Acta 1631, 229-238.

81. Salzer, J. L. (2015). Schwann cell myelination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(8), a020529. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020529

82. Sawamura, H. and F., T. and Shibata, K. (2007). Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, *71*, 2977 2984.

83. Schuh, C. M. A. P., Sandoval-Castellanos, A. M., De Gregorio, C., Contreras-Kallens, P., & Haycock, J. W. (2020). The Role of Schwann Cells in Peripheral Nerve Function, Injury, and Repair. In J. M. Gimble, D. Marolt Presen, R. Oreffo, H. Redl, & S. Wolbank (Hrsg.), *Cell Engineering and Regeneration* (S. 1–22). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-37076-7_5-1

84. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., & Wesker, K. (2018). *PROMETHEUS Kopf, Hals und Neuroanatomie: LernAtlas der Anatomie* (5. Aufl., S. b-006-149644). Georg Thieme Verlag. https://doi.org/10.1055/b-006-149644

85. Sedel, F. and P., C. and Bellanger, A. (2015). High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: A pilot study. *Mult Scler Relat Disord*, *4*, 159–169.

86. Sedel, F. and P., C. and Bellanger, A. and Touitou, V. and Lebrun-Frenay, C. and Galanaud, D. and Gout, O. and Lyon-Caen, O. and Tourbah, A. (2015). High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: A pilot study. *Mult. Scler. Relat. Disord*, *4*, 159 169.

87. Sedel, F., Bernard, D., Mock, D. M., & Tourbah, A. (2016a). Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis. *Neuropharmacology*, *110*, 644–653.

88. Sedel, F., Bernard, D., Mock, D. M., & Tourbah, A. (2016b). Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis. *Neuropharmacology*, *110*(Pt B), 644–653. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.028

89. Sedel, F., Papeix, C., Bellanger, A., Touitou, V., Lebrun-Frenay, C., Galanaud, D., Gout, O., Lyon-Caen, O., & Tourbah, A. (2015). High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: A pilot study. *Multiple sclerosis and related disorders*, *4*(2), 159–169.

90. Shi, Y., Sun, G., Zhao, C.,Stewart, R. (2008): Neural stem cell self-renewal. Crit Rev Oncol Hematol 65, 43-53.

91. Siddiqui, U. and E., E. and Sloane, J. A. (2017). Biotin supplementation in MS clinically valuable but can alter multiple blood test results. *Mult Scler*, *23*(4), 619–620.

92. Small, J., Ghabriel and MN, Allt and G. (1987). The development of Schmidt–Lanterman incisures: An electron microscope study. *J Anat*, *150*, 277–286.

93. Sousa, A. M. M., Meyer, K. A., Santpere, G., Gulden, F. O., & Sestan, N. (2017). Evolution of the Human Nervous System Function, Structure, and Development. *Cell*, *170*(2), 226–247. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.036

94. Spector, R., & Mock, D. M. (1988). Biotin transport and metabolism in the central nervous system. *Neurochemical Research*, *13*(3), 213–219. https://doi.org/10.1007/BF00971535

95. Stassart, R. M., Möbius, W., Nave, K.-A., & Edgar, J. M. (2018). The Axon-Myelin Unit in Development and Degenerative Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 467. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00467

96. Sternini, C. (1997). Organization of the peripheral nervous system: Autonomic and sensory ganglia. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, *2*(1), 1–7. https://doi.org/10.1038/jidsymp.1997.2

97. Stoll, G., Jander, S., & Myers, R. R. (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *Journal of the Peripheral Nervous System: JPNS*, *7*(1), 13–27. https://doi.org/10.1046/j.1529-8027.2002.02002.x

98. Sundaram, T. K. and C., J. J. and Kornberg, H. L. (1971). Synthesis of pyruvate carboxylase from its apoenzyme and (+)–biotin in Bacillus stearothermophilus. *Mechanism and control of the reaction. Biochem J*, *122*, 663–669.

99. Surzenko, N., Crowl, T., Bachleda, A., Langer, L.,Pevny, L. (2013): SOX2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Muller glia. Development 140, 1445-1456.

100. Szepanowski, F., Steubing, R. D., Güngör, C., Zipfel, J., Mausberg, A. K., Kleinschnitz, C., & Stettner, M. (2023). High-dose biotin neither fosters remyelination nor stimulates malonyl coenzyme A synthesis in the regenerating nerve. *Neural Regeneration Research*, *18*(7), 1623–1624. https://doi.org/10.4103/1673-5374.361542

101. Tansey, F. A., & Cammer, W. (1988). Acetyl-CoA carboxylase in rat brain. I. Activities in homogenates and isolated fractions. *Brain Research*, *471*(1), 123–130. https://doi.org/10.1016/0165-3806(88)90157-5

102. Terada, N. and S., Y. and Ohno, N. and Komada, M. and Saitoh, S. and Peles, E. and Ohno, S. (2012). Essential function of protein 4.1G in targeting of membrane protein palmitoylated 6 into Schmidt–Lanterman incisures in myelinated nerves. *Mol Cell Biol*, *32*, 199–205.

103. Thau, L., Reddy, V., & Singh, P. (2023). Anatomy, Central Nervous System. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542179/

104. Tong, L. (2013a). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *70*(5), 863–891. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1096-0

105. Tong, L. (2013b). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell. Mol. Life Sci*, *70*, 863 891.

106. Topp, K. S., & Boyd, B. S. (2012). Peripheral nerve: From the microscopic functional unit of the axon to the biomechanically loaded macroscopic structure. *Journal of Hand Therapy: Official Journal of the American Society of Hand Therapists*, *25*(2), 142–151; quiz 152. https://doi.org/10.1016/j.jht.2011.09.002

107. Toth, C. C., Willis, D., Twiss, J. L., Walsh, S., Martinez, J. A., Liu, W.-Q., Midha, R., & Zochodne, D. W. (2009). Locally synthesized calcitonin gene-related Peptide has a critical role in peripheral nerve regeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *68*(3), 326–337. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31819ac71b

108. Tourbah, A. and L.-F., C. and Edan, G. (2016a). MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Mult Scler*, *22*, 1719–1731.

109. Tourbah, A. and L.-F., C. and Edan, G. and Clanet, M. and Papeix, C. and Vukusic, S. (2016b). MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Mult Scler*, *22*(13), 1719–1731.

110. Tricaud, N., & Park, H. T. (2017). Wallerian demyelination: Chronicle of a cellular cataclysm. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *74*(22), 4049–4057. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2565-2

111. Verge, V. M., Gratto, K. A., Karchewski, L. A., & Richardson, P. M. (1996). Neurotrophins and nerve injury in the adult. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *351*(1338), 423–430. https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0038

112. Wang, Y., Yu, W., Li, S., Guo, D., He, J.,Wang, Y. (2022): Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases. Front Oncol 12, 836058.

113. Weerasuriya, A., & Mizisin, A. P. (2011). The blood-nerve barrier: Structure and functional significance. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *686*, 149–173. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_6

114. Wood, H. G. and B., R. E. (1977). Biotin enzymes. *Annu Rev Biochem*, *46*, 385–413.

115. Yeoh, S. and W., W. S. and Eli, I. (2020). Rapid-stretch injury to peripheral nerves: Comparison of injury models. *J Neurosurg*, *135*, 893 903.

116. Yuan, Y., Wang, Y., Wu, S., & Zhao, M. Y. (2022). Review: Myelin clearance is critical for regeneration after peripheral nerve injury. *Frontiers in Neurology*, *13*, 908148. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.908148

117. Yuasa, M., Kawabeta, K., Uemura, M., Koba, K., Sawamura, H., & Watanabe, T. (2022). Dietary High-Dose Biotin Intake Activates Fat Oxidation and Hepatic Carnitine Palmitoyltransferase in Rat. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *68*(4), 250–259. https://doi.org/10.3177/jnsv.68.250

118. Zempleni, J. (2000). Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proc Soc Exp Biol Med*, *223*(1), 14–21.

119. Zempleni, J. and M., D. M. (1999). Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *Am J Clin Nutr*, *69*, 504–508.

120. Zempleni, J., & Kuroishi, T. (2012). Biotin. *Advances in Nutrition*, *3*(2), 213–214. https://doi.org/10.3945/an.111.001305

121. Zhao, X.,Jacob, C. (2023): Mechanisms of Demyelination and Remyelination Strategies for Multiple Sclerosis. Int J Mol Sci 24

122. Zhou, F.-Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y.-H., & Snider, W. D. (2004). NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*, *42*(6), 897–912. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.011

123. Zochodne, D. W. (2009). Axon Degeneration and Regeneration of Peripheral Neurons. In M. D. Binder, N. Hirokawa, & U. Windhorst (Hrsg.), *Encyclopedia of*

Neuroscience (S. 305–310). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_512

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACC1	Acetyl-CoA-Carboxylase 1
ACC2	Acetyl-CoA-Carboxylase 2
ACC-265	Isoform der Acetyl-CoA-Carboxylase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AP-1	Aktivator-Protein 1 (Transkriptionsfaktor)
ATP	Adenosintriphosphat
A5E3	Monoklonaler Antikörper, Marker für dedifferenzierte Schwann-Zellen bei der Myelinauflösung
B-AMP	Biotinyl-5′-Adenosinmonophosphat
BirA	Biotin-Protein-Ligase und Repressor des Biotin-Operons in Prokaryonten wie *Escherichia coli*, reguliert den Biotin-Stoffwechsel und katalysiert die Biotinylierung von Proteinen.
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor (Wachstumsfaktor: Gehirn-abstammender neurotropher Faktor)
BMP	Bone Morphogenetic Protein (Knochenmorphogenetische Proteine)
BNS	Blut-Nerven-Schranke
Brn2	POU-Klasse-3-Transkriptionsfaktor
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide (Calcitonin Gen-verwandtes Peptid)
c-Jun	Transkriptionsfaktor, Teil der AP-1-Komplexe, beteiligt an Zellproliferation und -differenzierung
CO2	Kohlenstoffdioxid
CPT-1	Carnitin-Palmitoyltransferase-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Dorsal Root Ganglion (Dorsalwurzelganglion, Spinalganglion)
E-Cadherin	Epithelial-cadherin, Zelladhäsionsmolekül

EDSS	Expanded Disability Status Scale
EGR2	Early Growth Response 2, Transkriptionsfaktor, wichtig für die Myelinisierung peripherer Nerven (s. Krox20)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppelter Immunnachweis)
E15/E15.5	15. Bzw. 15,5. Tag der Embryonalentwicklung
erbB2/erbB3	Mitglieder der ErbB-Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen; auch als SC-Rezeptoren (Stem Cell-Rezeptoren) bezeichnet, spielen eine Rolle in der Zellproliferation, -differenzierung und -überlebensregulation.
GAP43/B50	Growth Associated Protein 43, neuronales Protein, das mit Axonwachstum, -plastizität und Regeneration assoziiert ist
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (Transkriptionsfaktor)
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Glialfibrilläres saures Protein)
HCS	Holocarboxylase-Synthetase
HDB	Hochdosiertes Biotin
HSP27	Heat Shock Protein 27
IFN-γ	Interferon-gamma, proinflammatorisches Zytokin mit zentraler Rolle in der Immunantwort
IL-1β	Interleukin-1β, proinflammatorisches Zytokin
IL-6	Interleukin-6, proinflammatorisches Zytokin mit pleiotropen Effekten
ImageJ	Open-Source-Software zur Bildbearbeitung und Analyse, die Messungen, Segmentierung und Visualisierung ermöglicht
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Krox20	Zinkfingerprotein (Transkriptionsfaktor), auch bekannt als Egr2
LasX	Leica Application Suite X-Software: Mikroskop-Software-Plattform für alle Leica-Mikroskope
Mbp	Myelin basic protein, essentielles Protein der Myelinscheide
MCC	Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1, Chemokin zur Rekrutierung von Monozyten

MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein 1α, Chemokin zur Anlockung von Immunzellen, v. a. Makrophagen
MMM	Maus-Myelinisierungsmedium
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MS-SPI	*Multiple Sclerosis Secondary Progressive Intervention*; randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte klinische Studie zur Evaluierung von Therapien bei sekundär progredienter Multipler Sklerose
Mpz	Myelin protein zero, zentrales Strukturprotein des peripheren Myelins
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
Nab	Nuclear antigen binding proteins (Nukleare Antigen-Bindungsproteine)
NBM	Neurobasalmedium
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule (Neurales Zelladhäsionsmolekül)
NGF	Nerve Growth Factor (Nervenwachstumsfaktor)
NMNAT	Nikotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NRG	Neuregulin
NRG-1	Neuregulin-1- Gen
NT-3	Neurotrophin-3, Neurotrophin, das Differenzierung und Erhaltung neuronaler Zellen unterstützt
Oct6	siehe SCIP
PAR-3/PAR-6/aPKC	Protein-Komplex aus Partitioning-defective 3, Partitioning-defective 6 und atypischer Protein-Kinase C; beteiligt an der Zellpolarität und Zellteilung
PPAR-α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- α
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Pyruvat-Carboxylase

PCC	Propionyl-CoA-Carboxylase
PNS	Peripheres Nervensystem
POU	POU-Domäne (eine Familie von Transkriptionsfaktoren)
P75	Neurotropher Rezeptor, der zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptorfamilie
RAG	Regenerations-assoziierte Gen
RAN-2	Ran GTPase Activating Protein 2 (Ran GTPase aktivierendes Protein 2)
SC	Schwann cells (Schwannzellen)
SCIP (Oct6)	POU-Klasse-3-Transkriptionsfaktor
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean)
SIRT1	Sirtuin 1 (Mitglied der Sir-Familie der Protein-Deacetylasen)
SOX2	SRY-Box Transkriptionsfaktor 2, (sex determining region Y (SRY)- box 2 = geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2)
SPI2	Randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Phase-3-Studie zur Therapie der sekundär progredienten Multiplen Sklerose (Folgestudie zu MS-SPI)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha, Schlüsselzytokin der Entzündungsreaktion
T25FW	timed 25-foot walk = Test zur Erfassung der Gehfähigkeit
UFD2/E4	Ubiquitin-Fusions-Abbau-Protein 2 / E4-Ubiquitin-Ligase; Enzyme des Ubiquitin-Proteasom-Systems, beteiligt an der Verlängerung von Ubiquitin-Ketten zur Proteinmarkierung für den Abbau
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren)
WD	Waller'sche Degeneration
WLD	Wallerian-Like Degeneration
Wlds	Wallerian degeneration slow mouse, ist eine spontane Mausmutante mit einer autosomal-dominanten genetischen Veränderung
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: QUERSCHNITT EINES PERIPHEREN NERVS DER LINKE AUSSCHNITT ZEIGT EINE NICHT-MYELINISIERTE SCHWANN-ZELLE (REMAK-ZELLE). DAS UNTERE VERGRÖßERUNGSFENSTER PRÄSENTIERT EINE MYELINISIERENDE SCHWANN-ZELLE, DESSEN MYELIN EIN AXON MEHRMALS UMGIBT. EIGENE ABBILDUNG INSPIRIERT DURCH (S. K. LEE & WOLFE, 2000). 10

ABBILDUNG 2:. ÜBERTRAGUNG VON NERVENIMPULSEN MITTELS SALTATORISCHER LEITUNG. DIE DARSTELLUNG ILLUSTRIERT EIN NEURON, DESSEN AXON VON EINEM MYELINMANTEL BEDECKT IST. DER MYELINMANTEL, WEIST REGELMÄßIGE UNTERBRECHUNGEN AUF (RANVIER-SCHNÜRRINGE). DIE MYELINISIERUNG TRÄGT DAZU BEI, DASS AKTIONSPOTENZIALE ENTLANG DES AXONS WEITERGELEITET WERDEN (SALTATORISCHE ERREGUNGSLEITUNG). EIGENE ABBILDUNG INSPIRIERT DURCH (N. A. CAMPBELL ET AL., 2019). 11

ABBILDUNG 3: STRUKTURFORMEL DES BIOTINS. EIGENE ABBILDUNG INSPIRIERT DURCH (RASSOW ET AL., 2022). 19

ABBILDUNG 4: A-F: ZELLKULTURMODELL. A) ENTNAHME DER EMBRYONEN AUS DEM UTERUS DER C57/B6-MAUS B) EMBRYONEN INNERHALB DES AMNIONS C) KÜHLUNG DER EMBRYONEN WÄHREND DER PRÄPARATION D) EMBRYONEN AUßERHALB DER AMNIONHÄHLE E) ENTHAUPTETE EMBRYONEN F) ZUR EXPLANTATION FIXIERTER EMBRYOKÖRPER. 26

ABBILDUNG 5: DER SIGNIFIKANZMARKER KENNZEICHNET STATISTISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IM NEURONEN-INTERNODIEN-VERHÄLTNIS ZWISCHEN DEN VERSCHIEDENEN EXPERIMENTGRUPPEN. 33

ABBILDUNG 6: A-D: SUDAN-SCHWARZ-B BEHANDELTE ZELLKULTUREN. BILDERREIHEN A-D ZEIGEN DIE NEURONE UND INTERNODIEN NACH SUDAN-SCHWARZ B-FÄRBUNG. REIHE A) ZEIGT DIE KONTROLLGRUPPE OHNE ZUSATZ VON BIOTIN. REIHE B) ZEIGT NEURONE, DIE MIT 0,5 µM BIOTIN BEHANDELT WURDEN. REIHE C) ZEIGT NEURONE, DIE MIT 5 µM BIOTIN BEHANDELT WURDEN UND DIE LETZTE REIHE D) ZEIGT NEURONE, DIE MIT HOCHDOSIERTEM (50 µM) BIOTIN BEHANDELT WURDEN. 34

ABBILDUNG 7: GEWICHTSENTWICKLUNG IM TIERMODELL. DER SIGNIFIKANZMARKER KENNZEICHNET STATISTISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IN DEN GEWICHTSDATEN DER VERSUCHSTIERE. ER WIRD VERWENDET, UM ZU BESTIMMEN, OB DIE BEOBACHTETEN UNTERSCHIEDE IN DER GEWICHTSENTWICKLUNG ZWISCHEN DEN GRUPPEN TATSÄCHLICH DURCH DIE BEHANDLUNG BEDINGT SIND ODER OB SIE ZUFÄLLIG ENTSTANDEN SIND. 35

ABBILDUNG 8: DIE VERÄNDERUNG DER GRIFFKRAFT ÜBER DEN UNTERSUCHUNGSZEITRAUM. AUF DER ABSZISSENACHSE IST DIE ZEIT IN TAGEN DARGESTELLT, WÄHREND DIE ORDINATENACHSE DIE GEMESSENE GRIFFKRAFT DER VERSUCHSTIERE ABBILDET. DIE DATEN ZEIGEN DIE ENTWICKLUNG DER GRIFFKRAFT SOWOHL BEI BIOTIN-BEHANDELTEN MÄUSEN ALS AUCH BEI KONTROLLTIEREN. ES WURDEN KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN GRUPPEN FESTGESTELLT. 36

ABBILDUNG 9: MALONYL-COA-GEHALT IM TIERMODELL ÜBER EINEN EXPERIMENTALZEITRAUM VON 14 TAGEN. DER MALONYL-COA-GEHALT WURDE IN KONTROLLGRUPPEN UND UNTERSUCHUNGSGRUPPEN, DIE TÄGLICH BIOTIN MITTELS INTRAPERITONEALER INJEKTION (60 MG/KG) ERHIELTEN, GEMESSEN. DER VERGLEICH ERFOLGTE ZWISCHEN DEN HINTEREN GLIEDMAßEN MIT UND OHNE NERVENLÄSION DESSELBEN TIERES. DIE ABSZISSENACHSE ZEIGT DIE VERSCHIEDENEN GRUPPEN: EINE GRUPPE OHNE NERVENLÄSION UND EINE GRUPPE MIT

NERVENLÄSION, BEI KONTROLLTIEREN UND BEI BIOTIN-BEHANDELTEN TIEREN. DIE ORDINATENACHSE STELLT DEN MALONYL-COA-GEHALT IN MG/G DER VERSUCHSTIERE DAR. VERGLICHEN WIRD ALSO DER MALONYL-COA-GEHALT DER MIT BIOTIN BEHANDELTEN MÄUSE UND DER KONTROLLMÄUSE, JEWEILS SOWOHL MIT ALS AUCH OHNE NERVENLÄSION. 37

ABBILDUNG 10: (A) DIE ERGEBNISSE DES AXONDURCHMESSERS ZEIGEN KEINE UNTERSCHIEDE IM VERHÄLTNIS DER MYELINISIERTEN AXONE IN LÄDIERTEN NERVEN ZWISCHEN DEN BEHANDLUNGSGRUPPEN. (B) MESSUNGEN DES G-RATIOS 21 TAGE NACH DER LÄSION ZEIGEN KEINEN EINFLUSS DER HOCHDOSIERTEN BIOTINBEHANDLUNG AUF DIE MYELINSTÄRKE BZW. REMYELINISIERUNG. 38

ABBILDUNG 11: TOLUIDINBLAU-GEFÄRBTE SEMI-DÜNN-SCHNITTE DES DISTALEN VERLETZTEN NERVENSTUMPFES 21 TAGE NACH DER QUETSCHVERLETZUNG. DIE ABBILDUNG ZEIGT SOWOHL IN DER KONTROLLGRUPPE ALS AUCH IN DER BIOTIN-BEHANDELTEN GRUPPE KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE IN DER VERTEILUNG DER MYELINISIERTEN AXONE. DIES DEUTET DARAUF HIN, DASS HDB KEINEN EINFLUSS AUF DIE MYELINISIERUNG ODER DIE AXONALE REGENERATION HAT. DIE G-RATIO, EIN MAß FÜR DIE MYELINDICKE, BLIEB UNVERÄNDERT. DIE ERGEBNISSE VERDEUTLICHEN, DASS BIOTIN DIE AXONALE REMYELINISIERUNG UND DIE VERTEILUNG DER MYELINISIERTEN AXONE NICHT BEEINFLUSST. SKALENBALKEN: 10 MM. 39

10 TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DES NEUROBASALMEDIUMS (NBM). 23
TABELLE 2: ZUSAMMENSETZUNG DES MAUS-MYELINISIERUNGSMEDIUMS (MMM) BZW. DIFFERENZIERUNGSMEDIUMS. 24
TABELLE 3: MATERIALIENLISTE MIT ANGABE DES HERSTELLERS UND DER ARTIKELNUMMER. 24

11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank allen aussprechen, die mich auf meinem Weg zur Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Mark Stettner, der mir durch seine wissenschaftliche Expertise, sein Vertrauen und seine motivierende Unterstützung den Weg geführt hat.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Fabian Szepanowski, der mich im Labor kompetent betreut und stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. Tobias Kessler bedanken. Sein konstruktiver und engagierter Input hat maßgeblich zur Weiterentwicklung und Verfeinerung dieser Dissertation beigetragen.

Ein weiterer Dank ist an Dr. Jürgen Schulz, dessen konstruktive Kritik und wertvolle Anregungen die Qualität dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Eure Geduld, euer Verständnis und eure Unterstützung haben mir in den fordernden Phasen dieser Arbeit enormen Rückhalt gegeben.

Diese Arbeit in dieser Form wäre ohne die Unterstützung all dieser wunderbaren Menschen nicht möglich gewesen. Ich bin von Herzen dankbar für eure Begleitung und freue mich, diesen Erfolg mit euch teilen zu können.

12 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.