

Aus dem *Institut für Klinische Neuroimmunologie*

(Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld)

Forschungseinheit Therapieforschung

(Leitung: Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner)

Ludwig-Maximilians-Universität München

und

dem *Institut für Neurowissenschaften*

(Direktor: Prof. Dr. med. Arthur Konnerth)

Lehrstuhl für Biomolekulare Sensoren

(Leitung: Prof. Dr. med. Thomas Misgeld)

Technische Universität München



Untersuchung der Oligodendrozytenpathologie im Tiermodell der Multiplen Sklerose

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Stephanie Potz

aus

Schwabach

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hartmut Wekerle
Prof. Dr. med. Jochen Herms

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Mündliche Prüfung: 31.07.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

<i>1.1 Multiple Sklerose</i>	1
1.1.1 Medizinhistorik	1
1.1.2 Epidemiologie und Genetik	2
1.1.3 Klinik, Diagnose und Prognose	5
1.1.4 Pathologie und Pathogenese	9
1.1.5 Therapeutische Ansätze	12
<i>1.2 Oligodendrozyten - Physiologie und Pathologie</i>	15
1.2.1 Oligodendrozyten und Myelin – normale Funktion im Nervensystem	15
1.2.2 Demyelinisierung und Oligodendrozytenpathologie bei der Multiplen Sklerose ..	17
1.2.3 Mediatoren der Myelindestruktion und Oligodendrozytenschädigung	20
1.2.4 Remyelinisierung bei der Multiplen Sklerose	22
2. Zielsetzung der Arbeit	26

3. Material und Methoden

<i>3.1 Material</i>	27
3.1.1 Tiermodell	27
3.1.2 Mauslinien und Bedarf für Tierhaltung	27
3.1.3 Gebrauchslösungen, Reagenzien und Antikörper/Fluoreszenzfarbstoffe	28
3.1.4 Verbrauchsmaterialien und Instrumente	31
3.1.5 Geräte	33
3.1.6 Mikroskopie	34
3.1.7 Software und Statistik	35
<i>3.2 Methoden</i>	36
3.2.1 Quantifizierung von Oligodendrozyten, Oligodendrozytenfortsätzen und Myelin zu verschiedenen Zeitpunkten (akut/chronisch) nach EAE Immunisierung	36
3.2.2 Rekonstruktion von kranken und gesunden Oligodendrozyten	39
3.2.3 Near-infrared Branding (NIRB) Experiment	40

4. Ergebnisse

<i>4.1 Akutes Modell der Multiplen Sklerose</i>	44
4.1.1 Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis	44
4.1.2 Auswertung der Ergebnisse	45
4.1.3 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit vom Erkrankungszeitpunkt	48
4.1.4 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte	50
4.1.5 Rekonstruktion einzelner Oligodendrozyten	53
<i>4.2 Chronisches Modell zur Remyelinisierung.....</i>	55
4.2.1 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit vom Erkrankungszeitpunkt	55
4.2.2 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Lage innerhalb einer Läsion	56
4.2.3 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte	59
<i>4.3 Near-infrared Branding (NIRB).....</i>	61
4.3.1 Etablierung der Methode und ihre Möglichkeiten	61
4.3.2 Anwendung des NIRB: Re-Identifizierung und elektronenmikroskopische Rekonstruktion dendritischer Fortsätze	64
4.3.3 NIRB und Oligodendrozytenpathologie	65

5. Diskussion

<i>5.1 Sequenz der Schädigung</i>	68
<i>5.2 Remyelinisierung.....</i>	73
<i>5.3 Near-infrared Branding</i>	78

6. Zusammenfassung

82

7. Literaturverzeichnis.....

83

8. Abbildungsverzeichnis.....

89

9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....

90

10. Danksagung

95

11. Eidesstattliche Versicherung.....

97

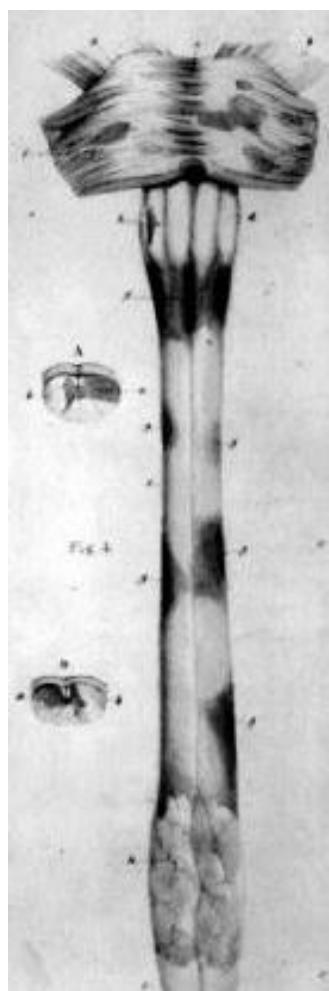
1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Medizinhistorik

“The eyes see what the mind knows.” (William Osler)

Der Name der Multiplen Sklerose (MS) geht auf den berühmten französischen Neurologen Jean-Martin Charcot zurück, der 1868 den Begriff „sclérose en plaque dissemineé“ einführt und das Krankheitsbild erstmalig differenziert beschreibt [1]. Medizinhistoriker datieren die Anfänge der MS-Forschung jedoch schon auf das Jahr 1838, in dem der Arzt Robert Carswell (1793-1857) als Erster das pathologische Erscheinungsbild der MS skizziert, sorgfältig illustriert und publiziert. Bis zur Einführung des Mikroskops sollten seine Zeichnungen den Goldstandard pathologisch-anatomischer Bildgebung darstellen (Carswell R., 1838; Osler W.,



1969). Jedoch war Carswell als Pathologe in keiner Weise daran interessiert, eine Verbindung zum lebenden Patienten und der Klinik herzustellen (Jacna et al. 1991). Diese Leistung erbrachte Jean Cruveilhier (1791-1874), der nur wenig später ähnliche Aufzeichnungen veröffentlichte und gleichzeitig eine klinisch-pathologische Korrelation offenlegte, die er aus sorgfältigen Patientenstudien und der genauen Dokumentation der Krankengeschichte gewann (Cruveilhier J., 1829-42). Eduard Rindfleisch (1836-1908) bereitete darauffolgend im Jahr 1863 den Weg hin zu einem erweiterten pathogenetischen Verständnis, als er erkannte, dass den beschriebenen Läsionen ein zentrales Blutgefäß zuzuordnen war (Rindfleisch E., 1863). Er argumentierte nun, dass die perivaskuläre Zellinfiltration als Entzündungsgeschehen ursächlich ist für die Entwicklung frischer Läsionen in Gehirn und Rückenmark; eine Einsicht, die auch heute noch weitgehend Gültigkeit besitzt.

Abb. 1 Erste Illustration der MS durch R. Carswell [1]

Ebenso vermochte Rindfleisch erste Risikofaktoren zu benennen und epidemiologische Aussagen über die Altersverteilung und das Geschlechterverhältnis zu treffen.

Wenig später machte dann Jean-Martin Charcot die MS in seinen berühmten „lessons VI, VII, VIII“ am Hôpital de Salpêtrière international bekannt [1]. Seine Leistung war daher weniger die Entdeckung der MS, als vielmehr die Verbreitung seines Wissens über die Krankheit, die Namensgebung und die Unterscheidung von vielen anderen, teilweise unbenannten, paralytischen Störungen seiner Zeit.

1.1.2 Epidemiologie und Genetik

Die Multiple Sklerose ist eine neurologische Erkrankung, die Schätzungen der Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft (DMSG) zufolge, derzeit 2.5 Millionen Menschen weltweit betrifft. Damit handelt es sich um das häufigste demyelinisierende Krankheitsbild, welches vor allem in der kaukasischen, weiblichen Bevölkerung verbreitet ist (Internetauftritt der DMSG, Oktober 2013). In Deutschland hat die Multiple Sklerose eine Prävalenz von 127-149/100.000 Einwohnern [2]. Während MS-Patienten in asiatischen Ländern wie Japan und China, aber auch Korea und Malaysia eine Rarität darstellen [2, 3], sind vor allem die zu den Polen hin orientierten Regionen wie Kanada, der Norden der USA und Nordeuropa (Orkney, Shetland, Irland, Finnland) Hochrisikogebiete mit Erkrankungshäufigkeiten bis zu 350/100.000 Einwohnern [4, 5].

Die Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose ist komplex und vermutlich multifaktoriell bedingt. Von allen epidemiologischen Einflussfaktoren wird die genetische Komponente besonders stark gewichtet. Biologische Verwandtschaftsverhältnisse ersten und zweiten Grades zu einem MS-Patienten stellen demnach Indikatoren für eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit gegenüber der Normalbevölkerung dar [6]. In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass ein monozygoter Zwilling eines MS-Patienten ein signifikant höheres Erkrankungsrisiko hat, als ein dizygoter Zwilling. Die Konkordanz bei monozygoten Zwillingspaaren beträgt aber trotzdem „nur“ 25 Prozent [7]. Nun stellt sich die Frage, ob die Diskordanz in den Umweltfaktoren begründet liegt, oder ob genetische und epigenetische Unterschiede zwischen monozygoten Zwillingen ausschlaggebend sind. Im Besonderen das Epigenom kann über viele tausend Teilungen hinweg durch Umwelt- und sonstige Einflüsse so verändert werden, dass ursprünglich identische Individuen signifikante Unterschiede aufweisen. Baranzini und Kollegen haben dazu erstmalig das Genom, mRNA-

Transkriptom und Epigenom eines für die Multiple Sklerose diskordanten, monozygoten Zwillingspaars untersucht. Interessanterweise konnten sowohl in der DNA-Sequenz als auch hinsichtlich der DNA-Methylierung bzw. posttranslationalen Histon-Modifikation und Genexpression keine wesentlichen Unterschiede nachgewiesen werden, die die Diskordanz erklären könnten [6]. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass Unterschiede möglicherweise einfach unentdeckt blieben: die Gruppe hat das Genom nur eines Paares untersucht und sich dabei auf nur einen Zelltyp konzentriert. Dies ist von Bedeutung, da epigenetische Unterschiede und somatischer Mosaizismus gewebespezifisch sind. Zudem kann man natürlich noch nicht vorhersagen, ob die Geschwister auch in Zukunft diskordant für die Erkrankung bleiben [8].

Welche der genetischen Faktoren nun für das Erkrankungsrisiko eine entscheidende Rolle spielen, wurde in zahlreichen Studien der letzten Jahre genauer untersucht. Als wichtigster genetischer Risikofaktor konnte dabei der MHC Klasse II Haplotyp HLA-DRB1 identifiziert werden, welcher für das Antigen-präsentierende HLA-DR2 Molekül kodiert. Dieser genetische Risikofaktor wurde für alle wesentlichen Formen der Erkrankung und über verschiedene Populationen hinweg bestätigt. Während in Europa vorwiegend der Haplotyp HLA-DRB1*1501 – DQB1*0602 positiv mit Multipler Sklerose assoziiert ist, ist dieser in Afrika, einem Kontinent mit sehr geringer Suszeptibilität sehr selten [9, 10]. Wesentlichen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko haben weiterhin die allelische Hetero- bzw. Homogenität eines Individuums bezüglich seines HLA-Status, die Anzahl der Kopien und mögliche cis-trans-Regulationen. So wurde gezeigt, dass eine Homozygotie für HLA-DRB1*1501 mit einer schweren Ausprägung der MS einhergeht, während Heterozygotie einen mildernden Verlauf prognostizieren lässt [11, 12]. Demgegenüber sind auch protektive Histo-kompatibilitätskomplexe nachgewiesen worden, wie die Kombination von HLA-DRB1*15 – DRB1*14. Ebenso wird vermutet, dass gewisse HLA Klasse I Allele einen protektiven Effekt haben können [10].

Neben diesem, in unabhängigen Studien wiederholt als Risikofaktor bestätigten HLA-DRB1 Haplotyp, wurden in den letzten Jahren in großen genomweiten Assoziationsstudien weitere Risikofaktoren mit Einfluss auf das Erkrankungsrisiko identifiziert. In einer jüngeren genomweiten Assoziationsstudie wurden nun hauptsächlich immunologische Gene identifiziert, welche eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung respektive –proliferation spielen. Entgegen früherer Anschauung wurden in dieser Studie von MS-Patienten kaum Gene

identifiziert, welche explizit neurodegenerative Mechanismen triggern [13]. Zusammenfassend legen diese Untersuchungen der genetischen Risikofaktoren dennoch die Vermutung nahe, dass neben dem genetischen Hintergrund auch Faktoren im Rahmen der alltäglichen Lebensführung sowie kulturelle Aspekte und Umweltfaktoren einen wichtigen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko haben [14, 15]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Rauchen einen unabhängigen Risikofaktor darstellt [16]. Ebenso scheint eine geringe Sonnenlichtexposition (entsprechend nördlicher Hochrisikoregionen), einhergehend mit einem Mangel an Vitamin D, die Initiation der MS zu begünstigen [17-19]. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass auch der Geburtsmonat einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko darstellt. So zeigten Willer und Kollegen, dass das Risiko für Personen, die im Mai eines Jahres nördlich des Äquators geboren wurden, 9.1% höher als angenommen liegt, wohingegen eine Geburt im November das Risiko um 8.5% vermindert [20]. Auch hier geht man von einem Zusammenhang mit der Einwirkung von UV-Strahlen aus. Aufgrund der hier dargelegten Hinweise, die auf eine starke Umweltkomponente abzielen, hat man versucht, anhand von zahlreichen Migrationsstudien das kritische Alter auszumachen, in welchem Umweltfaktoren einen besonders hohen Einfluss auf die Erkrankungssuszeptibilität haben. Eine jüngst erschienene Übersichtsarbeit zu diesem Thema zeigt, dass in Großbritannien geborene Kinder asiatischer, afrikanischer und westindischer Immigranten ein ähnliches Risiko aufweisen, an MS zu erkranken, wie die durchschnittliche britische Bevölkerung [21]. Weiter konnte gezeigt werden, dass das Erkrankungsrisiko für indische und pakistanische Immigranten, die vor dem 15. Lebensjahr nach England zogen, höher war, als das ihrer Landsleute, die erst später aus dem Heimatland emigrierten [22]. Es scheint folglich ein kritisches Zeitfenster zu geben, innerhalb dessen Umweltfaktoren die Auslösung der Erkrankung bedingen können.

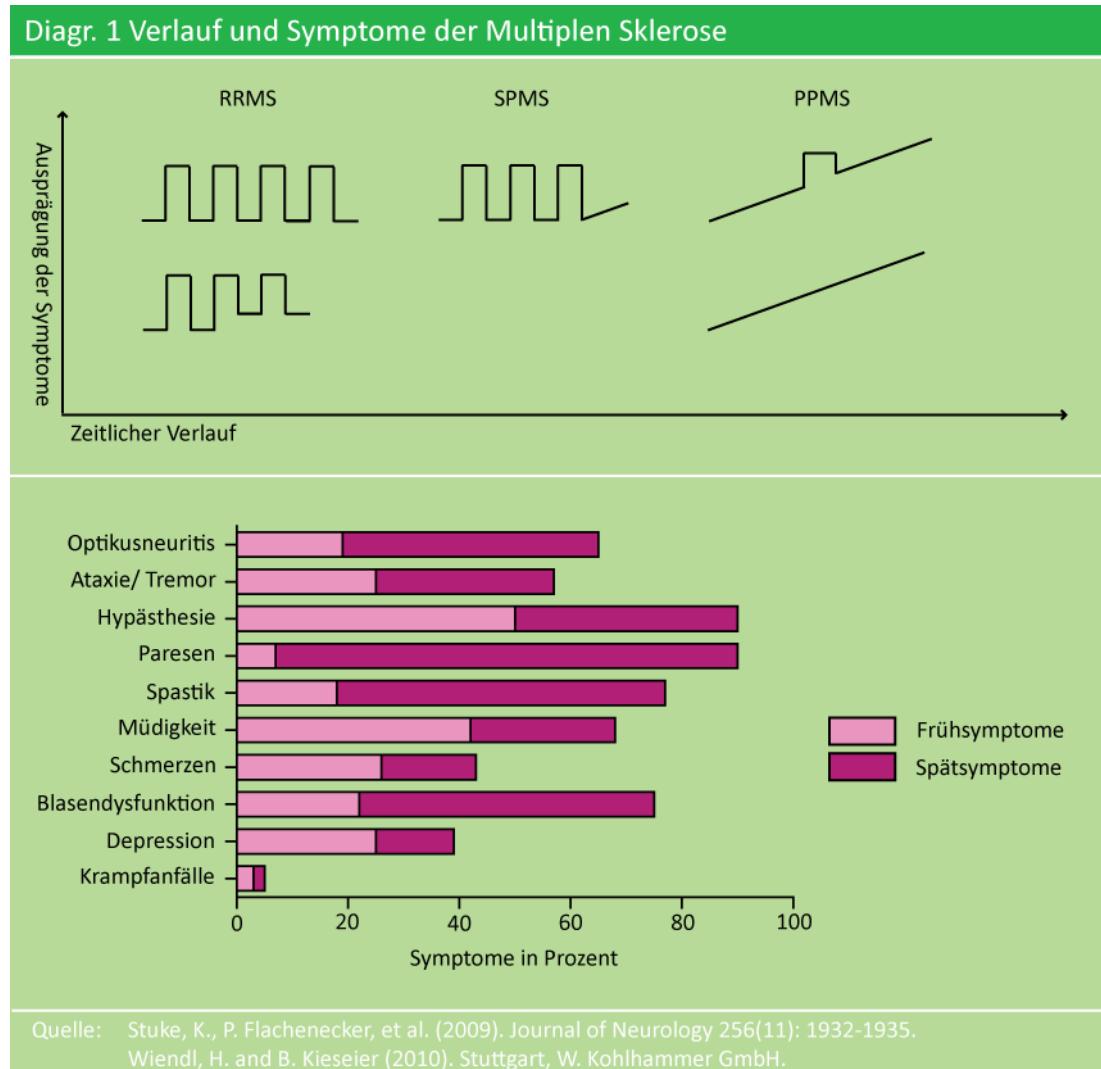
Als weitere mögliche Umweltfaktoren stehen vor allem die Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes Simplex Virus und dem Humanen Herpesvirus 6 im Mittelpunkt des Interesses. Eine neue Studie, die eine Meta-Analyse zum Nachweis von EBV bei MS Patienten anstrebt, beziffert die Seroprävalenz bei Testung mit zwei unabhängigen Methoden auf 100% und rät dazu, die Fälle, welche tatsächlich negativ getestet wurden, nochmal hinreichend zu prüfen [23]. Ein eindeutiger Zusammenhang konnte trotz dieser hohen Prävalenzen bisher nicht zweifelsfrei erwiesen werden [24-26].

1.1.3 Klinik, Diagnose und Prognose

Die MS oder Enzephalomyelitis disseminata stellt mit einem Erkrankungsgipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr die häufigste Ursache für kognitive Beeinträchtigung und körperliche Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar [27]. Der klinische Verlauf der MS ist heterogen und kann in verschiedene Verlaufsformen eingeteilt werden. Grundsätzlich unterscheidet man den häufigeren schubförmig remittierenden Verlauf (RRMS, 85-90%) von der primär progredienten Multiplen Sklerose (PPMS, 10-15%). Erstere Erscheinungsform manifestiert sich durch eine schubförmige klinische Verschlechterung des Zustands, welche durch eine Phase der Symptomrückbildung abgelöst wird (siehe **Diagr. 1**). Ein Schub ist dabei definiert als eine akute Verschlechterung von mindestens 24-stündiger Dauer und ist abzugrenzen von sogenannten Pseudoexazerbationen, die nur wenige Minuten bis Stunden anhalten. Je länger der Schub dauert, desto größer ist im Allgemeinen das Risiko einer verlangsamten und unvollständigen Rückbildung der Ausfälle. Dieser Zyklus aus schubförmiger Verschlechterung und Remission wird interindividuell unterschiedlich häufig und mit verschiedener Dauer beziehungsweise Stärke erlebt. Patienten mit primär schubförmigem Verlauf entwickeln nach mehreren Jahren häufig eine sekundär progrediente Form der MS (SPMS) [28, 29]. Weiterhin ist aber auch eine benigne MS beschrieben, die nach Erstdiagnose über Jahrzehnte nur zu geringgradigen neurologischen Ausfällen führt [27]. Im Gegensatz zur RRMS nimmt die PPMS bereits zu Beginn einen progredienten Verlauf an, der sowohl mit, als auch ohne zusätzliche Schübe beobachtet wird (siehe **Diagr. 1**). Diese Form der MS geht prognostisch mit frühzeitiger physischer und kognitiver Beeinträchtigung einher. Die verschiedenen Verlaufsformen der MS und ihre gemeinsamen Symptome sind in **Diagramm 1** dargestellt.

Die Symptome variieren sehr stark in ihrem Manifestationszeitpunkt und sind unter anderem auch abhängig vom Erkrankungsalter des Patienten. Zu den typischen Erst- bzw. Frühsymptomen zählen Extremitätschwäche, Neuritis n. optici und Parästhesien [29]. Blasenstörung, Ataxie sowie Depression und kognitive Einschränkungen treten klassischerweise erst im späteren Verlauf auf [27].

Diagr. 1 Verlauf und Symptome der Multiplen Sklerose



Diagr. 1 Verlauf und Symptome der Multiplen Sklerose. Oben: Verschiedene Verlaufsformen der MS: schubförmig-remittierend (RRMS), sekundär progredient (SPMS), primär progredient (PPMS, mit und ohne zusätzliche Schübe). Unten: Früh- und Spätsymptome der MS mit ihren prozentualen Häufigkeiten [27, 30].

Die Diagnosestellung erfolgt bei allen Formen der MS anhand definierter Kriterien. Im Jahr 2001 verabschiedete man sich von dem seit 1982 bestehenden Diagnosemanual zugunsten der vom "International Panel on the Diagnosis of MS" beschlossenen, sogenannten "McDonald Kriterien" [31]. Ziele dieser Neuerung waren die objektive Darstellung der räumlichen und zeitlichen Dissemination von MS-typischen Läsionen, die Objektivierung klinischer Zeichen und die Integration paraklinischer Methoden wie Magnetresonanztomographie, Liquordiagnostik und Visuell Evozierter Potentiale. In den letzten Jahren wurden die McDonald Kriterien von Polman und Kollegen zweimal überarbeitet [32, 33], wobei der Diagnoseprozess mit einer geringeren Anzahl an MRT Untersuchungen

beschleunigt und bei verbesserter Sensitivität und Spezifität gleichzeitig vereinfacht werden soll [33]. Eine Diagnose ausschließlich anhand klinischer Merkmale soll nach wie vor ebenfalls möglich bleiben [34]. Von den Revisionen der McDonald Kriterien verspricht man sich insgesamt einen Zugewinn an Diagnosequalität und -präzision. Insbesondere die Diagnose der klassischen MS und des Klinisch Isolierten Syndroms wurde erleichtert [34], wobei auch ein spezielles Augenmerk auf die frühe Diagnose der bisher schwer zu diagnostizierenden PPMS gelegt wurde. Einen Überblick über das aktuelle Diagnosemanual hinsichtlich der RRMS liefert **Tabelle 1**.

Tab. 1 McDonald-Kriterien 2010 der rezidivierend-remittierenden Multiplen Sklerose

Klinische Präsentation	Erforderliche Zusatzdiagnostik
≥2 Schubereignisse und klinisch objektivierbarer Nachweis ≥2 Läsionen oder objektivierbarer Nachweis 1 Läsion plus anamnestische Evidenz für stattgehabtes Schubereignis	Keine
≥2 Schubereignisse und klinisch objektivierbarer Nachweis 1 Läsion	Nachweis der örtlichen Dissemination durch <ul style="list-style-type: none"> – ≥1 T2-Läsion in ≥2 MS-typischen Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) ODER – Nachweis einer weiteren klinischen Manifestation in einer anderen Lokalisation
1 Schubereignis und klinisch objektivierbarer Nachweis ≥ 2 Läsionen	Nachweis der zeitlichen Dissemination durch <ul style="list-style-type: none"> – gleichzeitigen Nachweis asymptotischer Gd-anreichernder und -nichtanreichernder Läsionen ODER – Eine neue T2 und/oder Gd-anreichernde Läsion im follow-up MRT ODER – zweites klinisches Ereignis
1 Schubereignis und klinisch objektivierbarer Nachweis 1 Läsion (klinisch-isoliertes Syndrom)	Nachweis der örtlichen Dissemination durch <ul style="list-style-type: none"> – ≥1 T2-Läsion in ≥2 MS-typischen Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) ODER – Nachweis einer weiteren klinischen Manifestation in einer anderen Lokalisation PLUS Nachweis der zeitlichen Dissemination durch <ul style="list-style-type: none"> – gleichzeitigen Nachweis asymptotischer Gd-anreichernder und -nichtanreichernder Läsionen ODER – eine neue T2- und/oder Gd-anreichernde Läsion im Follow-up-MRT ODER – zweites klinisches Ereignis

Tabelle adaptiert aus Klotz, L., R. Gold, et al. (2011). Der Nervenarzt 82(10): 1302-1309.

Tab. 1 McDonald Kriterien 2010 der rezidivierend-remittierenden Multiplen Sklerose [34]. Wichtigstes Kriterium ist die klinische Präsentation des Patienten. Die Diagnosestellung ausschließlich anhand der Präsentation des Patienten bleibt daher weiterhin möglich. Je weniger eindeutig jedoch die Klinik ist, desto mehr magnetresonanztomographische Zusatzbefunde werden gefordert.

Eindeutig müssen jedoch die Grenzen der Diagnosekriterien berücksichtigt werden. So ist die Anwendung auf eine Altersspanne von 10-59 Jahren beschränkt und Patienten mit atypischer Präsentation stellen nach wie vor eine Herausforderung dar [31]. Besonders in diesen Fällen muss ein breites Spektrum an vaskulären, infektiösen, autoimmunen, metabolischen und neoplastischen Differentialdiagnosen abgewogen werden, damit der Patient mit hoher Sicherheit und weitestgehendem Ausschluss eines falsch positiven Ergebnisses (mit entsprechender therapeutischer Konsequenz und Lebenseinschränkung) korrekt klassifiziert werden kann [28, 33].

Die Diagnose der MS stellt für die betroffenen Patienten meist einen schweren Einschnitt in ihr Alltags- und Berufsleben dar. Für den Patienten ist daher das Wissen um prognostisch wirksame Faktoren relevant, welche einen Einfluss auf die Lebenserwartung und –qualität haben [35]. Die Verlaufsform ist dabei der wichtigste prädiktive Faktor: Während die PPMS die Patienten durchschnittlich 10 Jahre später ereilt und einen schnelleren, drastischeren Verlauf mit frühzeitiger Behinderung nimmt, verläuft die RRMS bzw. die SPMS langsamer in Bezug auf die Akkumulation irreversibler Behinderungen [36, 37]. Das Geschlecht und vor allem das Alter bei Krankheitsbeginn repräsentieren zwei weitere klinische Prognosefaktoren. Je jünger ein Patient zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens MS-typischer Symptome ist, desto früher tritt in der Regel auch die bleibende Behinderung ein. Frauen erreichen dieses Stadium meist erst in einem höheren Alter als dies bei Männern der Fall ist. Aus der Beobachtung des langfristigen Krankheitsverlaufs der Multiplen Sklerose lassen sich aber auch wichtige Schlussfolgerungen über grundlegende Krankheitsmechanismen ableiten. So zeigten epidemiologische Langzeitbeobachtungen, dass die Multiple Sklerose von einem zweiphasigen Krankheitsgeschehen geprägt wird. Als erste Phase wird das fokal entzündungsdominierte Initialstadium der Erkrankung mit ersten klinischen Symptomen (und i.d.R. schubförmigem Verlauf) definiert. Diese Phase kann je nach Verlaufsform der Erkrankung unterschiedlich lange und ausgeprägt verlaufen mit medianen Zeitintervallen von unter drei bis weit über 15 Jahren [38]. Der Fortschritt der Erkrankung in der zweiten, progradienten Phase ist überraschenderweise vom Krankheitsbild in der initialen Phase weitgehend unabhängig [38]. So beeinflussen der anfängliche Verlauf und die ersten Symptome das Alter, in dem ein bestimmter Grad an Behinderung erreicht wird, nicht wesentlich [37]. Erstaunlicherweise hat auch eine hohe

Schubhäufigkeit kaum Einfluss auf das Ausmaß der späteren Progression. Im Gegensatz zum schubförmigen Stadium wird das progrediente Stadium deutlich von zunehmender Neurodegeneration und diffuser Inflammation geprägt [38]. Weiterhin verläuft die Krankheitsprogression in diesem Stadium erstaunlich konstant [36].

Unter Anwendung der genannten neuen Diagnosemanuale und aktueller Therapieschemata ist die Lebenserwartung des MS-Patienten im Vergleich zur Gesamtbevölkerung um durchschnittlich 10 Jahre verringert und die Mortalitätsrate um das 3,5-fache gesteigert [39]. Das mediane Überleben nach Diagnose der Erkrankung beträgt damit bei Frauen 33 Jahre, bei Männern nur 28 Jahre [38]. Todesursache ist jedoch meist nicht die Grunderkrankung, sondern durch die neurologische Behinderung bedingte, sekundäre respiratorische Infektionen, Harnwegsinfektionen, Stürze oder kardiovaskuläre Komplikationen.

1.1.4 Pathologie und Pathogenese

Histopathologisches Korrelat der Multiplen Sklerose ist der Plaque, eine fokale Läsion, die als Ursache für die klinischen Ausfälle im Schub der Erkrankung verstanden wird. Plaques treten bevorzugt periventrikulär in der weißen Substanz des ZNS, im Hirnstamm und an der äußeren Oberfläche des Rückenmarks, aber auch im Kortex und im Bereich tiefer Hirnnervenkerne auf [29, 40, 41]. Obwohl die MS vornehmlich als Erkrankung der weißen Substanz betrachtet wird, lassen sich auch Läsionen in der grauen Substanz finden. Nachdem diese Bereiche des Gehirns nur sehr wenig myelinisiert sind, können Entzündungsmediatoren vermutlich an dieser Stelle die Zellen direkt angreifen [42]. MS Läsionen sind durch die folgenden histopathologischen Veränderungen charakterisiert [29]:

1. die entzündliche Infiltration des Gewebes mit vorwiegend T-Lymphozyten, B-Zellen und Makrophagen
2. die Demyelinisierung mit Verlust von Oligodendrozyten
3. der Verlust von Axonen als Korrelat bleibender klinischer Schädigung
4. die Gliose (Vernarbung) mit Proliferation von Astrozyten

Das Profil inflammatorischer Zellen in frischen Läsionen, insbesondere der T-Lymphozyten, kann Schlüsse auf die pathogenetischen Prozesse zulassen, die in der Folge zu Demyelinisierung, Axonverlust und Astrozytenproliferation führen. Eine wichtige

Komponente darunter bilden autoreaktive CD4+ T-Zellen. CD4+ T-Zellen mit mäßiger Affinität zu körpereigenen Antigenen werden während ihres Reifungsprozesses im Thymus positiv selektiert und zählen zum natürlichen Repertoire des gesunden Immunsystems [43]. Die entscheidende Frage im Zusammenhang mit der Auslösung eines autoimmunen Prozesses ist, weshalb diese potentiell autoreaktiven Immunzellen tatsächlich aktiviert werden. Matzinger und Kollegen haben dazu das sogenannte "Danger-Model" entwickelt [43].

Abb. 2 Danger-Model

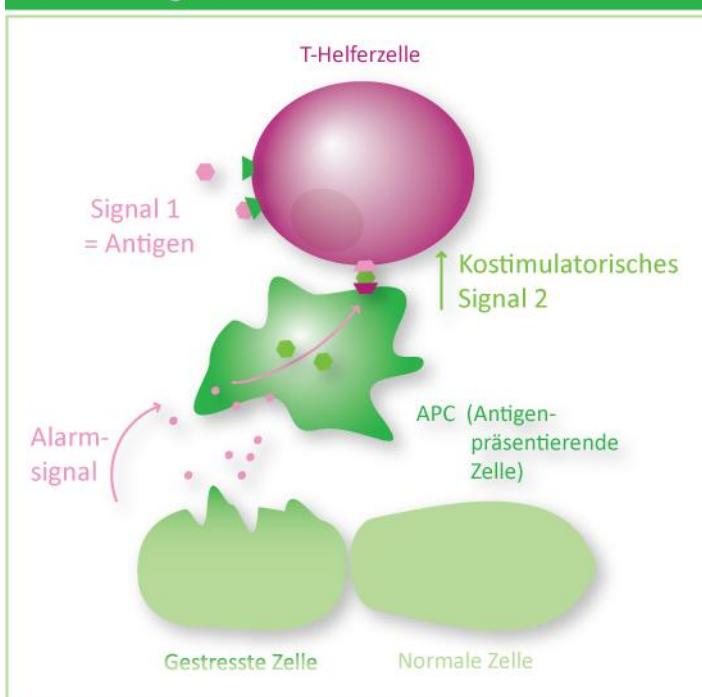


Abb. 2 "Danger-Model" zur Aktivierung potentiell autoreaktiver T-Zellen - adaptiert aus [44].

Die T-Helferzelle erkennt über spezifische Rezeptoren körpereigene und körperfremde Antigene (**Signal 1**). Zur Aktivierung erhält sie ein zweites, **kostimulatorisches Signal**. Dieses Signal wird durch Mediatoren vermittelt, welche im Rahmen des Untergangs umliegender Gewebszellen ausgeschüttet werden.

T-Zellen erkennen in ihrer Interaktion die von Antigen-präsentierenden Zellen (APC-Zellen) an der Oberfläche präsentierten fremden oder körpereigenen Antigene. Zur Aktivierung benötigen die Zellen aber nun zusätzlich ein kostimulatorisches endogenes oder exogenes "Danger-Signal". Dabei spielt das Milieu im umgebenden Gewebe die entscheidende Rolle: Endogene Danger-Signale können bereits durch den Untergang umliegender Gewebszellen (aufgrund exogenen Stresses, Nekrose oder sonstiger Schädigung) freigesetzt werden. Zu diesen endogenen Signalstoffen zählen u.a. CD40-L, TNF- α , IL-1 β . In dem speziellen Fall der MS geht man nun davon aus, dass ein Myelin- oder anderes ZNS-spezifisches Autoantigen in der Körperperipherie von CD4+ T-Zellen (zusammen mit einem kostimulatorischen Signal) erkannt wird. Wie dieses kostimulatorische Signal im Fall der Multiplen Sklerose induziert wird, versuchen zwei Hypothesen zu erklären. Zum einen diskutiert man, dass es im Rahmen

des Erkennens und Bekämpfens infektiöser Agentien (beispielsweise von Virusbestandteilen) zu einer Kreuzreaktion ("Molekulares Mimikry") zwischen körpereigenen und –fremden Antigenen kommen könnte [45]. Die infektiösen Antigene können ein identisches Kontaktmotiv zu klassischen Myelin-Proteinen besitzen und eine immunologische Fehlreaktion einleiten, die durch den infektiös verursachten Gewebeschaden ko-stimulatorisch unterstützt wird. Dabei scheint es weniger eine Rolle zu spielen, dass sich die beiden Antigene in ihrer spezifischen Aminosäuresequenz ähneln, sondern vielmehr muss die räumliche Konformation des Kontaktmotivs passen [46]. Eine zweite wichtige Hypothese ist die der "Bystander-Reaktion". Aufgrund einer allgemeinen Infektion kommt es im Körper zu zum Teil T-Zell-Rezeptor-unabhängigen, nichtspezifischen entzündlichen Reaktionen, im Rahmen derer inflammatorische Zytokine oder Superantigene autoreaktive Zellen zu aktivieren vermögen [45]. Beispielsweise kann eine einfache Virusinfektion dazu führen, dass virusspezifische T-Lymphozyten infizierte Zellen detektieren und vernichten, wobei u.a. auch zelltypische Autoantigene freigesetzt werden, die unter Umständen das Potential besitzen, eine Immundysregulation auszulösen. Ebenso ist auch eine Kombination aus "Molekularem Mimikry" und "Bystander Reaktion" vorstellbar [45].

Auf die Aktivierung folgend, kommt es zu einer klonalen Expansion von CD4+ T-Zellen, die daraufhin über Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, LFA-1, VLA-4) mit Endothelzellen interagieren (siehe **Abb. 3**) und so die Blut-Hirn-Schranke überwinden und das ZNS infiltrieren können. Neue Erkenntnisse dazu liefern dabei 2-Photonen-mikroskopische Untersuchungen durch Bartholomäus und Kollegen, welche die Interaktionen von T-Zellen und Blut-Hirn-Schranke in Echtzeit untersuchten [47]. Nach erneuter antigenspezifischer Reaktivierung im ZNS rekrutieren die Effektor-T-Zellen dann über die Sekretion löslicher Botenstoffe andere Immunzellen, vor allem Makrophagen, Mikroglia, Astrozyten, B-Zellen aber auch weitere T-Zellen und lösen so die Ausbildung einer entzündlichen Läsion mit Oligodendrozyten- und Myelinschädigung aus [45, 48].

Abb. 3 Funktion von ICAM-1 und VCAM-1 bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

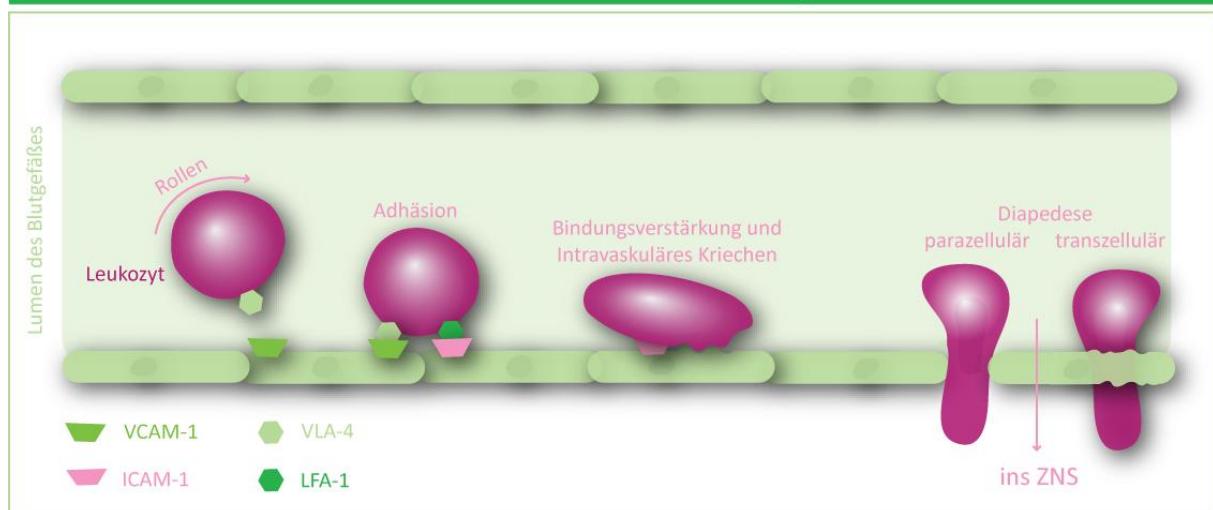


Abb. 3 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (vereinfachte Darstellung). In ihrer Interaktion mit endothelständigen Rezeptormolekülen (VCAM-1, ICAM-1) kommt es zum Kontakt des Leukozyten mit dem Gefäßendothel und zur Adhäsion, welche eine Voraussetzung zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke darstellt. Die Diapedese selbst wird durch andere Rezeptoren vermittelt.

1.1.5 Therapeutische Ansätze

Die Behandlung der Multiplen Sklerose beruht auf drei wesentlichen Säulen: eine sichere Basistherapie, suffiziente eskalationstherapeutische Ansätze im Schub und Interventionen gegen symptomatische Krankheitserscheinungen. Als Basistherapeutika werden gegenwärtig Interferon β , Glatiramerazetat (GA), Immunglobuline, Azathioprin und Natalizumab genutzt. Goldstandard der Dauerbehandlung sind das Interferon β und GA, welche sowohl die Schubfrequenz als auch die Krankheitsaktivität deutlich zu reduzieren vermögen [27]. Im Hinblick auf eine langjährige Anwendung sprechen v.a. die nachgewiesene Sicherheit hinsichtlich unerwünschter Nebenwirkungen und auch die meist anhaltende Wirksamkeit für die Behandlung mit Interferon β oder GA [49-51].

Die auf verschiedenen immunsuppressiven und immunspezifischen Ansätzen beruhenden Basis-Therapieversuche modifizieren zwar den Verlauf, haben jedoch keinen nachgewiesenen Einfluss auf die Ausprägung einzelner Schübe [52, 53]. Im akuten Schub der Erkrankung versucht man daher, die Beschwerden mit einer hochdosierten Kortikosteroid-Stoßtherapie abzumildern. Die Pulstherapie, bestehend häufig aus der Gabe von je 500 mg Methylprednisolon für 3-5 Tage [54, 55], ist etablierter Standard um antiödematóse Effekte zu erzielen, sowie die Blut-Hirn-Schranke abzudichten und die fehlgeleitete Immunantwort

zu supprimieren [56, 57]. Bei Nichtansprechen des Patienten auf die bereits genannten Wirkstoffe können alternativ eskalationstherapeutisch wirksame Substanzen wie Mitoxantron und Cyclophosphamid eingesetzt werden.

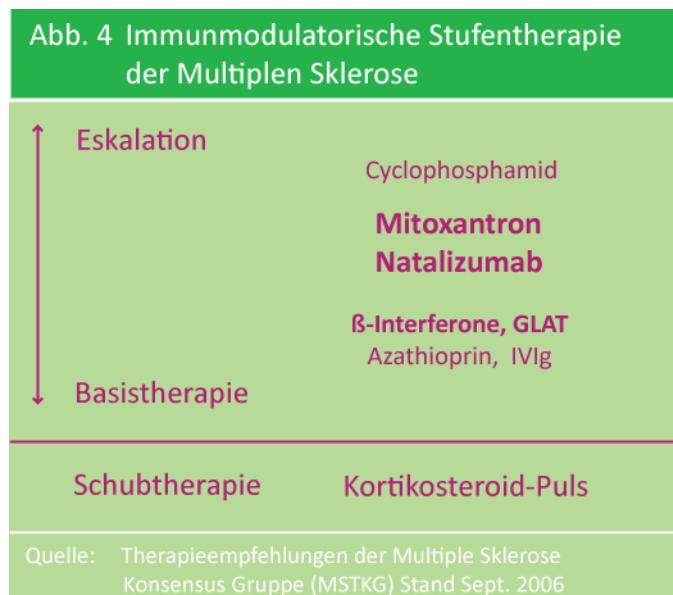


Abb. 4 Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose

Die Therapie der MS gliedert sich in eine kurzzeitige Schubtherapie, eine langfristig durchgeführte Basistherapie zwischen den Schüben und Medikamente, auf die bei Eskalation der Symptome ausgewichen werden kann.

Im Gegensatz zu diesen intravenösen Therapiekonzepten ist am 21.03.2011 das erste oral verfügbare MS-Therapeutikum Fingolimod aus der Wirkstoffklasse der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulatoren zugelassen worden. Die Wirkung des Fingolimod (FTY720) beruht auf der reversiblen Hemmung der Lymphozytenmigration aus sekundär lymphatischen Organen hinein in entzündliches Gewebe und damit der Verminderung entzündlicher Prozesse [58, 59]. In großen abgeschlossenen Phase II und III Studien konnte unter Fingolimod die Schubrate um 55% gesenkt werden, bei einem steigenden Anteil schubfreier Patienten. Erfreulicherweise verzögerte sich auch die Progression der Behinderung um durchschnittlich 30% [58].

Abb. 5 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

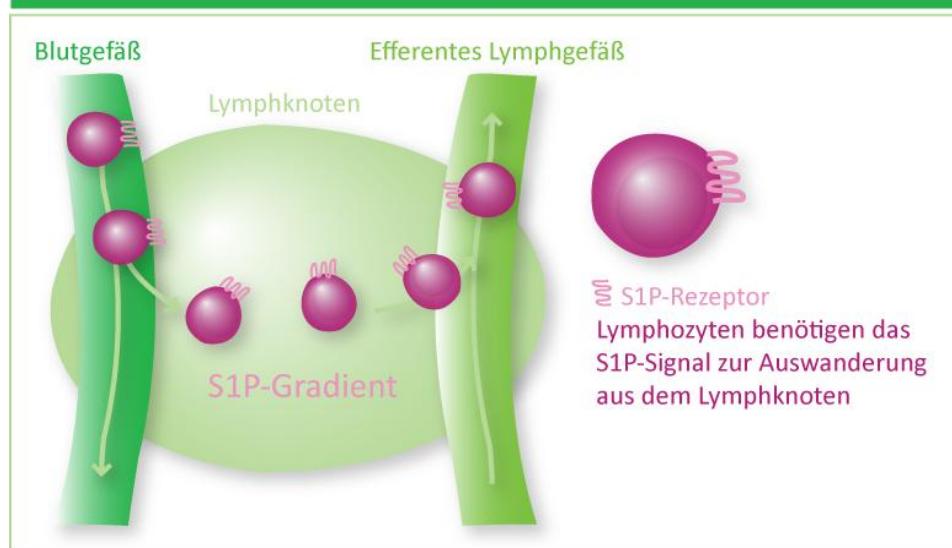


Abb. 5 Funktion von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren – adaptiert, aus [58]. Lymphozyten besitzen S1P-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und benötigen ein S1P-Signal zur Auswanderung aus sekundär lymphatischen Organen. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulatoren hemmen reversibel die Lymphozytenmigration durch Blockierung des Rezeptors und vermindern dadurch entzündliche Prozesse [58].

Ein anderes sehr erfolgreich eingesetztes Medikament bei RRMS ohne sekundäre Progression ist der monoklonale Antikörper Natalizumab (Tysabri®), welcher das Protein VLA-4 auf der Oberfläche von Lymphozyten erkennt. Natalizumab blockiert über die Bindung an VLA-4 die Interaktion mit dem VCAM-1 Rezeptor (siehe auch **Abb. 3**), welcher auf Endothelzellen exprimiert wird und verringert dadurch die Auswanderung von Immunzellen in entzündliches Gewebe [60]. Durch die i.v.-Gabe von 300 mg Natalizumab alle 4 Wochen konnte in großen Phase III Studien (AFFIRM und SENTINEL) die jährliche Schubrate um 68% gesenkt werden und es finden sich unter Therapie doppelt so viele Patienten ohne Anzeichen einer Krankheitsaktivität [61]. Nichtsdestotrotz ist besonders beim Einsatz von Tysabri® eine Nutzen-Risiko-Analyse notwendig, da das Risiko, dass die behandelten Patienten an der lebensbedrohenden Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie erkranken, über einen Verlauf von 18 Monaten bei ca. 1:1000 liegt [62]. Unter der Therapie mit Fingolimod wurde diese Komplikation bisher nicht beobachtet. Jedoch besitzt auch dieser Wirkstoff ein breites Nebenwirkungsprofil und kann zu Erkältungen, Sinusitiden, Kopfschmerzen, gastrointestinalen Störungen und transienten Bradykardien führen [58]. Unabhängig von Pathogenese-bezogenen Therapien ist jedoch auch die gezielte Behandlung der individuellen MS-Symptomatik wichtig. Von allen bereits genannten Symptomen werden

vor allem Spastik, Ataxie/Tremor und Blasenfunktionsstörungen von den Patienten als besonders belastend empfunden [63]. Die ausreichende Gabe von Medikamenten (z.B. Baclofen gegen die Spastik, Carbamazepin gegen therapierefraktären Tremor und Ataxie, sowie Oxybutynin gegen eine hyperreflektorische Blase) erleichtern den Alltag des Patienten oftmals erheblich [64, 65]. Im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzepts lässt sich durch zusätzliche nicht-medikamentöse Strategien wie Physio- und Ergotherapie ebenfalls eine Verbesserung der Symptomatik erzielen.

1.2 Oligodendrozyten - Physiologie und Pathologie

1.2.1 Oligodendrozyten und Myelin – normale Funktion im Nervensystem

Oligodendrozyten zählen zu den glialen Stützellen und kommen ausschließlich im zentralen Nervensystem vor. Ihre Hauptfunktion ist die elektrische Isolierung von Axonen durch die von ihren Fortsätzen produzierten Markscheiden. Ein Oligodendrozyt ist in der Lage bis zu 50 Internodien eines Axons zu bilden, was ihn einerseits zu der ZNS-Zelle mit dem größten metabolischen Umsatz, andererseits aber auch extrem empfindlich gegenüber exogenen und endogenen Stressoren macht [66]. Neben der Isolierung sind diese hoch spezialisierten Zellen auch für den Stoff- sowie Flüssigkeitstransport und die Homöostase im Gewebe verantwortlich.

Die isolierenden Markscheiden bestehen aus Myelin, einer lipidreichen, auch im peripheren Nervensystem gebildeten Umhüllung, die der Gesamtheit aller Axone im ZNS die Bezeichnung "Weiße Substanz" verleiht. Für das Myelin charakteristische Proteine sind das Myelin-Basische Protein (MBP), Proteolipid-Protein (PLP), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) sowie das nur im zentralen Myelin vorkommende Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) [29].

Die Bildung der Myelin-Proteine als Voraussetzung für Myelinisierung ist abhängig vom Entwicklungszustand der Oligodendrozyten, welcher durch das Zusammenspiel zahlreicher Transkriptionsfaktoren reguliert wird (siehe **Abb. 6**). In der frühen Entwicklungsphase des ZNS ist es die Produktion des Transkriptionsfaktors Olig2 durch subventrikuläre Vorläuferzellen, welche erstmalig zur Ausbildung einer Population von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC's) führt. Durch die Expression verschiedener anderer Transkriptionsfaktoren (u.a. Olig1, Asc11, Nkx2.2) entwickeln sich aus diesen OPC's dann

postmitotische und später prämyelinisierende Oligodendrozyten. Der entscheidende Schritt von prämyelinisierenden Oligodendrozyten hin zu myelinisierenden Oligodendrozyten wird ebenfalls von Transkriptionsfaktoren kontrolliert und soll in einem späteren Abschnitt noch beschrieben werden. Je nach Bedarf wird die Expression von Myelin-Genen aber entweder gesteigert, was gleichzeitig die terminale Entdifferenzierung zum myelinisierenden Oligodendrozyten bedeutet oder die Expression wird gedrosselt, was den Verbleib der prämyelinisierenden Zelle in ihrem Proliferationsstatus fördert. MRF (Myelin-Gen Regulationsfaktor) ist einer dieser Transkriptionsfaktoren: Die Inaktivierung von MRF führt zum Verharren der Oligodendrozyten in einem frühen prämyelinisierenden Stadium, wohingegen die Aktivierung von MRF eine gesteigerte Expression von Myelin-Genen und damit verstärkte Myelinisierung zur Folge hat. Die Myelinisierung der Axone macht die saltatorische Erregungsleitung erst möglich und ist die Ursache für die extrem schnelle Nervenleitgeschwindigkeit in gesunden Säugetieren.

Abb. 6 Oligodendrozyten-Differenzierung

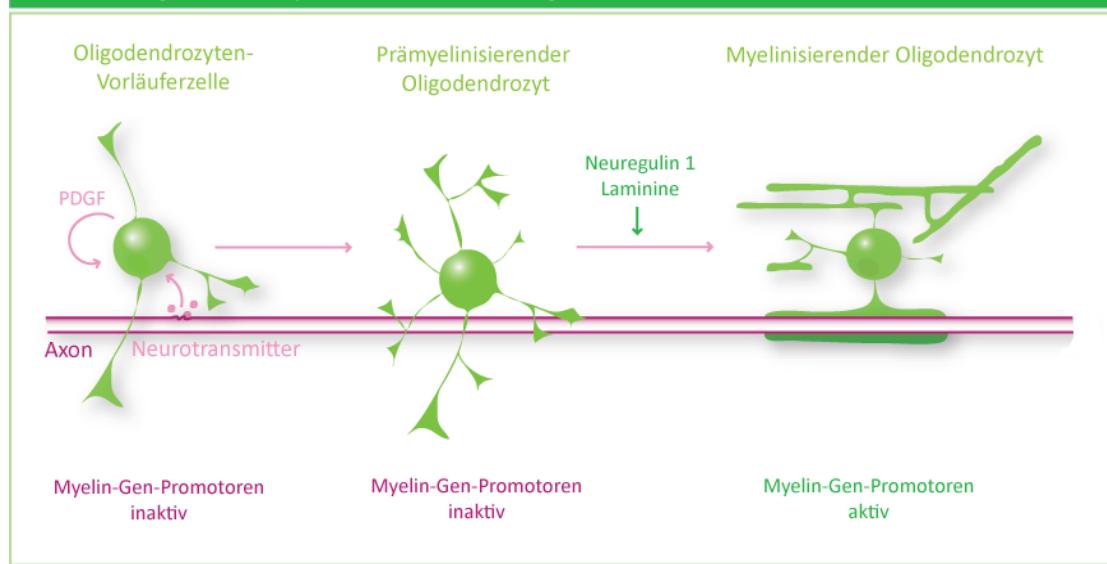


Abb. 6 Regulierung der Oligodendrozyten-Differenzierung und Myelinisierung - adaptiert, aus [67]. Die Stimulation der Oligodendrozyten-Vorläuferzelle durch axonale Neurotransmitter und PDGF ("Platelet Derived Growth Factor") führt zur Differenzierung hin zum prämyelinisierenden Oligodendrozyten. Die Myelin-Gen-Promotoren werden durch verschiedene Transkriptionsfaktoren in diesem Stadium noch unterdrückt, folglich besteht noch nicht die Fähigkeit zur Myelinisierung. Erst im ausdifferenzierten myelinisierenden Oligodendrozyten werden Myelin-Gen-Promotoren Transkriptionsfaktoren-abhängig aktiviert, welche die Myelinisierung der Axone einleiten.

1.2.2 Demyelinisierung und Oligodendrozytenpathologie bei der Multiplen Sklerose

Die Destruktion des Myelins und ihre Folgen sind ursächlich für die verringerte Nervenleitgeschwindigkeit und wesentlich beteiligt an den resultierenden Symptomen eines MS Patienten.

Die Vorgänge, die bei der Multiplen Sklerose zur Oligodendrozytenschädigung und Demyelinisierung führen, sind noch nicht hinreichend verstanden. Im Zentrum der Diskussion um Demyelinisierung und Oligodendrozytenschädigung stehen dabei einerseits das Konzept intraindividueller Homogenität und interindividueller Heterogenität von Lassmann, Brück und Lucchinetti, und andererseits die Theorie eines Läsionskontinuums mit intraindividueller Heterogenität von Prineas und seinen Kollegen. Lucchinetti und Lassmann sprechen 2000 erstmals von einer Heterogenität der Läsionsformation und davon, dass jeder Patient ein individuelles Muster an ZNS-Schädigung aufweist [68]. Die Autoren beschreiben in ihrer Arbeit vier fundamental verschiedene histopathologische Läsionsmuster, die sich hinsichtlich des Verlusts an Myelin, der räumlichen Verteilung im ZNS, der makroskopischen Plaquemorphologie, der Oligodendrozytenpathologie und des Nachweises einer Komplementaktivierung unterscheiden. Die Basis dieser Untersuchungen ist dabei eine große Sammlung an Biopsie- bzw. Autopsiematerial von aktiven MS Läsionen. Alle untersuchten Läsionen wiesen eine ausgeprägte Infiltration mit T-Lymphozyten und Makrophagen als Hinweis auf aktive Entzündung auf. Die verschiedenen Läsionsmuster beschreiben sich dabei wie folgt:

Muster I befindet sich klassischerweise (wie schon von Rindfleisch und Kollegen beschrieben) um Venolen und kleine Venen orientiert, zeigt sich scharf in seiner Begrenzung mit radiären Ausläufern und geht mit einem Verlust von Oligodendrozyten am Rand der Läsion einher, während im Zentrum eher vermehrt Oligodendrozyten nachweisbar sind.

Muster II weist ein vergleichbares Bild hinsichtlich Lokalisation und Oligodendrozytenverlust auf. Der Unterschied beider Typen liegt in der Ablagerung von Immunglobulinen und Komplementfaktoren (C9neo) in Typ II, weshalb die Autoren in Muster II eine Antikörper- bzw. Komplement-vermittelte Demyelinisierung vermuten [68].

Muster III und IV weisen im Gegensatz dazu eine primäre Oligodendrozytenzerstörung, sowohl am Rand, als auch im Zentrum auf und befinden sich nicht zentral um Venen orientiert.

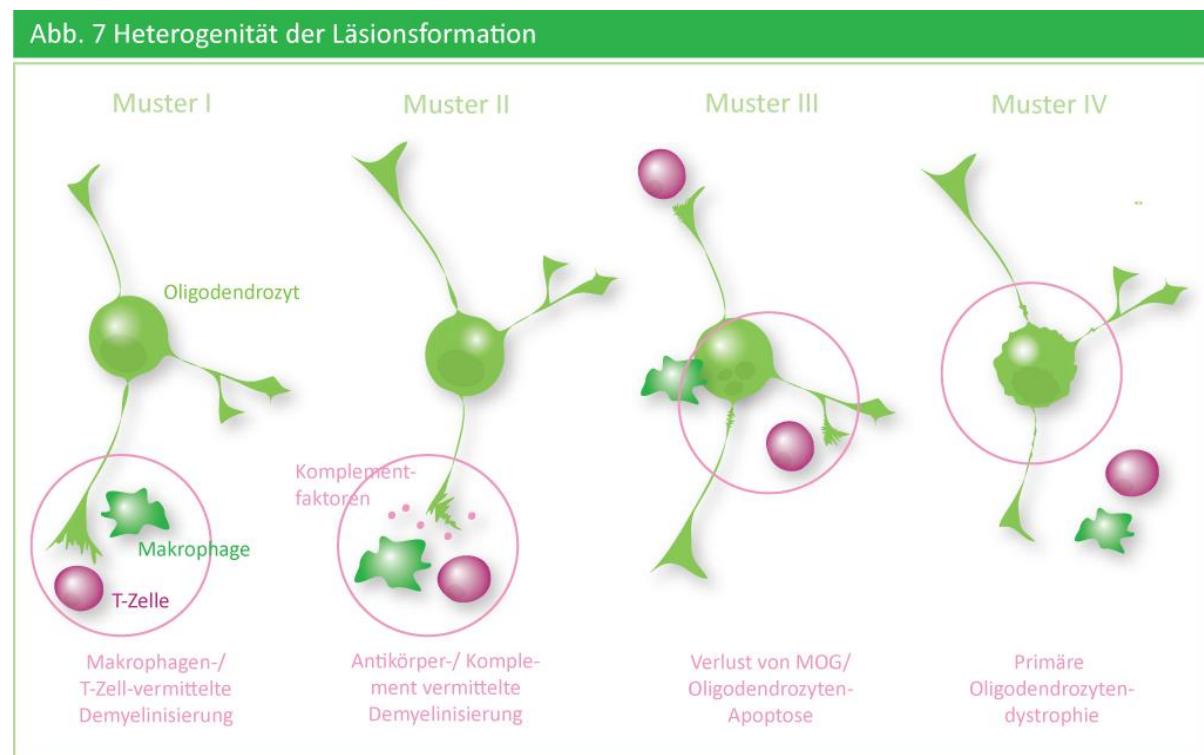


Abb. 7 Heterogenität der Läsionsformation - adaptiert aus [69]. Ein individueller Patient präsentiert in allen seinen Läsionen lediglich eines der vier Muster. Man spricht von intraindividueller Homogenität und interindividueller Heterogenität des Läsionsmusters. Diese interindividuelle Heterogenität lässt die Autoren auf unterschiedliche Ätiologien der MS schließen.

Während die Autoren bei den erstgenannten Pathologien von einer typischen T-Zell- und Makrophagen-vermittelten autoimmunen Enzephalomyelitis ausgehen, lässt sie das zweite Bild eher auf eine primäre Dystrophie der Oligodendrozyten schließen.

Dabei weisen die Autoren darauf hin, dass die Gewebeprobe eines individuellen Patienten ausschließlich eines der spezifischen Muster aufweist und somit intraindividuell homogen ist. Diese Einschätzung wird weiterhin durch immunpathologische und radiologische Untersuchungen verschiedener Läsionen einer MS-Patientin im zeitlichen Verlauf gestützt [70]. Das histopathologisch interindividuell heterogene Bild bringt Lucchinetti und Kollegen zu dem Schluss, dass der Multiplen Sklerose und ihren verschiedenen Varianten womöglich grundsätzlich verschiedene Ätiologien zu Grunde liegen.

Ein anderes Konzept sieht die Verschiedenartigkeit der Läsionen eher als Kontinuum mehrerer Stadien, denn als pathogenetische Heterogenität an [71]. Barnett und Prineas schließen in ihrer Arbeit auf eine uniforme, primär degenerative Erkrankungsursache, die möglicherweise durch genetische Einflüsse und Umweltfaktoren moduliert wird. In einer Studie an 12 RRMS Patienten beobachten sie im Akutstadium eines Schubes apoptotische Oligodendrozyten in Abwesenheit entzündlicher Infiltrate. Während sie wenig bis keine Lymphozyten oder Mikroglia entdecken, zeichnet sich jedoch in ihrer weiteren Forschung eine sehr regelmäßige Aktivierung der Komplement-Faktoren (C3d und C9neo) ab, welche Lucchinetti, Brück und Lassmann dezidiert nur in Muster II beschreiben. Die Beobachtung, dass Oligodendrozyten bereits vor dem Einsetzen der entzündlichen Infiltration sterben, lässt die Autoren schließen, dass Makrophagen nicht die primären Mediatoren der Myelindestruktion in der MS sind. Die Makrophagenaktivierung stelle ihrer Ansicht nach nur ein Begleitgeschehen dar, das durch die bereits apoptotischen myelinproduzierenden Zellen erklärt wird. Die erst im Verlauf einsetzende Entzündungsreaktion wäre eine Folge des ausgeprägten Gewebsuntergangs, welcher die physiologischen Apoptosemechanismen überfordere und eine postapoptotische Nekrose mit einhergehender Inflammation induziere [71].

Eine zentrale Frage, die in Auseinandersetzung mit diesen diskordanten Beobachtungen bisher nicht geklärt wurde, ist: Handelt es sich bei der Multiplen Sklerose nun um ein neurodegeneratives Geschehen, welches auf einer primären Oligodendrozytendystrophie beruht und erst in seiner Folge zur sekundären Demyelinisierung führt ("Inside-Out", siehe **Abb. 8**) oder beginnt die Schädigung tatsächlich primär mit einer Myelinschädigung und endet mit sekundärem Oligodendrozytenverlust ("Outside-in")?

Abb. 8 Hypothesen zur Demyelinisierung

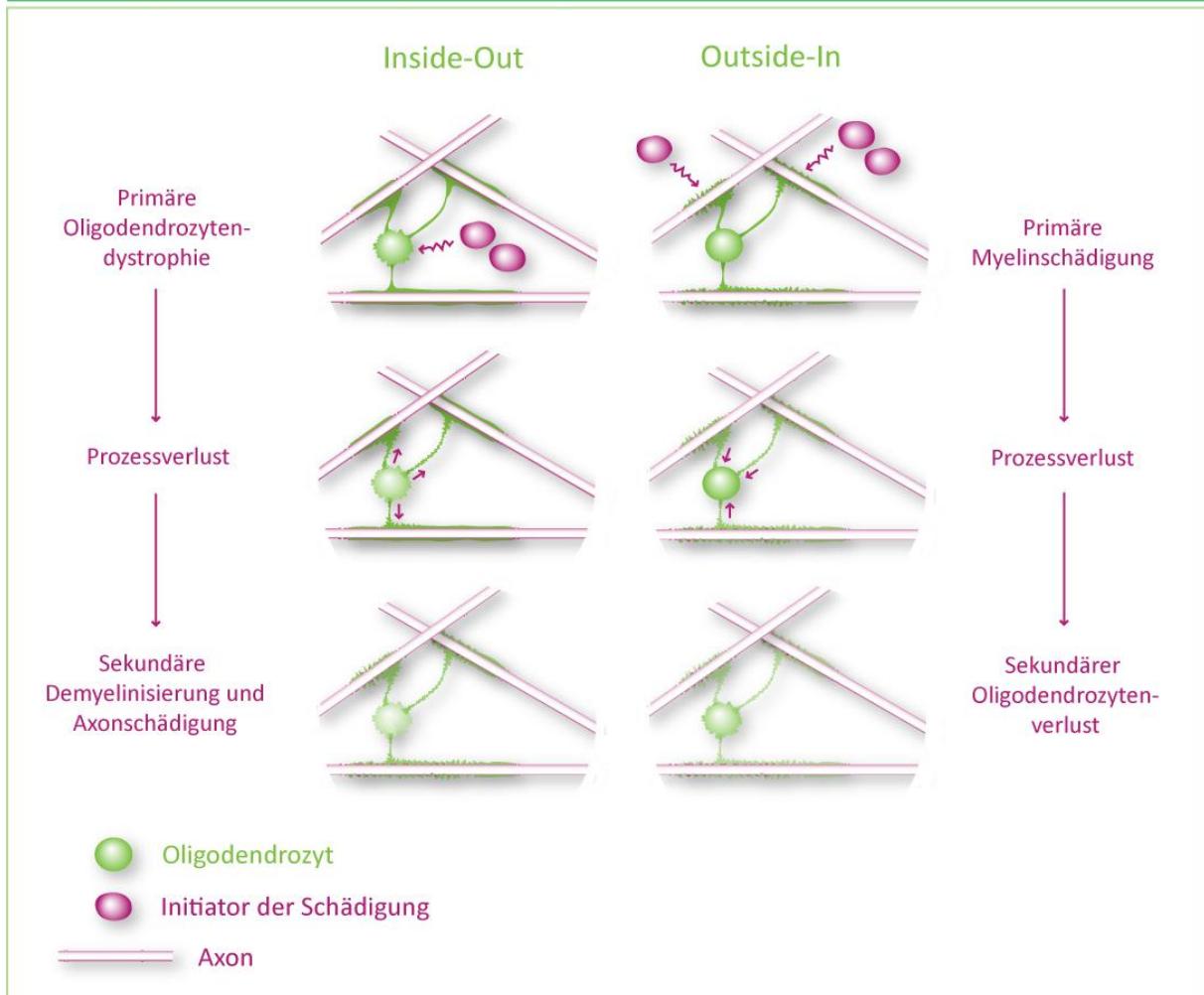


Abb. 8 Vorstellung zum Ablauf von Demyelinisierung. **Links:** Primäre Oligodendrotytendystrophie mit konsekutivem Prozessverlust und erst sekundärer Demyelinisierung. **Rechts:** Myelin als primäres Target mit darauffolgendem Prozessverlust und erst sekundärem Oligodendrozyten-Zellkörper-Verlust.

1.2.3 Mediatoren der Myelindestruktion und Oligodendrozytenschädigung

Die potentiellen Mediatoren der Myelindestruktion und Oligodendrozytenschädigung sind vielfältig. Grundsätzlich lassen sich direkte (zelluläre) von indirekten (humoralen) Mechanismen unterscheiden, welche aufgrund ihrer starken Vernetzung aber nicht getrennt voneinander betrachtet werden können. Auf zellulärer Ebene sind es vor allem Mikroglia, Makrophagen, Astrozyten, CD8+ T-Zellen und B-Zellen, die für die laufende Gewebsschädigung verantwortlich sind. Während sich perivaskulär tatsächlich vor allem CD4+ Zellen befinden, welche die Initiation des Zerstörungskommandos übernehmen [45], zeigen sich im Zentrum der Läsion sowie im äußeren Randbereich hauptsächlich CD8+ zytotoxische Lymphozyten [72]. Abgesehen von ihrer starken Präsenz, welche bereits auf

eine Beteiligung an der Zerstörung hindeutet, sind auch nur CD8+ T-Zellen in der Lage Oligodendrozyten und Neurone spezifisch zu erkennen, nachdem residente Zellen des ZNS zwar über MHC I Moleküle an ihrer Oberfläche verfügen, nicht jedoch über MHC II Proteine, welche zur spezifischen Erkennung durch CD4+ T Zellen nötig wären. CD8+ Zellen können Oligodendrozyten z.B. über die Freisetzung von Perforin oder durch Fas/Fas-Ligand Interaktionen schädigen [73]. Während Astrozyten oder Mikroglia vermutlich durch eine gesteigerte Produktion und verminderte Elimination des Neurotransmitters Glutamat [74, 75] und den darauffolgenden Kalziumeinstrom ebenfalls zum Untergang der Oligodendrozyten beitragen können, ist die Rolle der ebenfalls detektierten B-Zellen noch unklar [45]. In den Läsionen sind grundsätzlich nur wenige B-Lymphozyten nachweisbar, welche aber womöglich das Potential besitzen, lebenslang bestehen und Antikörper bilden zu können. Hinweis dafür sind oligoklonale Banden (als eine Folge der klonalen B-Zell-Expansion), welche einen häufigen Befund bei MS Patienten darstellen. Des Weiteren besteht eine Therapieoption mit monoklonalen Antikörpern gegen das B-Zell-Antigen CD20, was ebenfalls die Vermutung nahelegt, dass B-Zellen eine kausative Rolle in der MS-Pathogenese übernehmen [76]. Hypothetisch könnten die Antikörper Zielstrukturen opsonieren und unter Einbeziehung des Komplementsystems die Myelinhülle angreifen [40]. Die Komplementfaktoren als Bestandteil des humoralen Systems und als Bindeglied zwischen direkten und indirekten Schädigungsmechanismen können ebenfalls an Myelin binden, woraufhin Makrophagen aktiviert werden und Myelin phagozytieren. Weiterhin könnte die Aktivierung des Komplementsystems auch direkt zur Lyse von Oligodendrozyten führen. Den Hauptanteil humoraler Abwehr macht jedoch die Sekretion von Zytotoxischen und Chemokinen aus: Über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IFN γ wird die zelluläre Abwehr zusätzlich aktiviert, welche daraufhin über verschiedene Mechanismen Myelin schädigt. Die Expression der Botenstoffe IFN γ und TNF α korreliert dabei tatsächlich auch mit der klinisch sichtbaren Krankheitsaktivität [27].

Unabhängig von den beteiligten Faktoren bedeutet die fortschreitende Demyelinisierung in jedem Fall eine zunehmende Zerstörung der protektiven Isolierhülle elektrisch leitender Axone. Die frei liegenden Axone sind potentiell destruktiven, inflammatorischen Mediatoren wie freien Sauerstoffradikalen und NO direkt ausgesetzt, woraus zumeist eine signifikante Herabsetzung der Nervenleitgeschwindigkeit bis hin zum Leitungsblock resultiert [45]. Nachdem die Myelinschicht auch eine Versorgungsfunktion für das Axon erfüllt, kommt es

zusätzlich zu einer Störung der Homöostase, die zur axonalen Schädigung gerade in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung beitragen kann. Die Verhinderung des Myelinabbaus sowie die Förderung des Neuaufbaus von Myelin sind damit wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

1.2.4 Remyelinisierung bei der Multiplen Sklerose

Der Wiederaufbau intakter Myelinscheiden ist eine der Voraussetzungen dafür, dass MS Läsionen und ihre resultierenden neurologischen Ausfälle überwunden werden können. In einer großen Studie konnte festgestellt werden, dass Patienten, die in einem höheren Alter nach einer längeren Krankheitsdauer an MS verstorben sind, in der Regel eine ausgeprätere Remyelinisierung aufwiesen. Im Umkehrschluss kann man diese Ergebnisse auch dahingehend auslegen, dass die individuelle (genetische) Fähigkeit eines Patienten zu stärkerer Remyelinisierung einen Überlebensvorteil mit sich bringt. Patrikios und Kollegen konnten in einer umfangreichen post-mortem Analyse von MS-Gehirnen eine ausgeprägte spontane Remyelinisierung in einem Teil der Patienten beobachten [77]. Diese ausgeprägte Remyelinisierung wurde unter allen Verlaufsformen der MS beobachtet und war sowohl unabhängig vom Alter bei Krankheitsbeginn, als auch vom Geschlecht. In ihrer quantitativen Auswertung konnten sie zeigen, dass circa 20 Prozent aller untersuchten Gewebeproben in einem Ausmaß von 60-100 Prozent remyelinisiert waren. Besonders subkortikale Läsionen und Läsionen in der tiefen weißen Substanz zeigten eine ausgeprägte Remyelinisierung. Diese lässt sich histologisch an dünneren Myelinscheiden, sowie kürzeren Internodien bei gleichzeitig größeren Ranvier'schen Schnürringen erkennen [78]. Prinzipiell scheint also für demyelinisierte Axone die Möglichkeit zu bestehen, sich durch Interaktion mit Oligodendrozyten eine neue Myelinscheide anzueignen und darauffolgend die Leistungsfähigkeit wieder zu erlangen [79].

Die Kernfrage unter Berücksichtigung dieser prinzipiell guten Ausgangsbedingungen lautet daher: Woran scheitert die vollständige und dauerhafte Remyelinisierung bei einem Großteil der Patienten?

Prinzipiell umfasst die Remyelinisierung folgende drei entscheidende Schritte:

1. **Rekrutierung** von oligodendroglialen Vorläuferzellen
2. **Differenzierung** zu Oligodendrozyten
3. **Myelinisierung**

Abb. 9 Prozess der Remyelinisierung

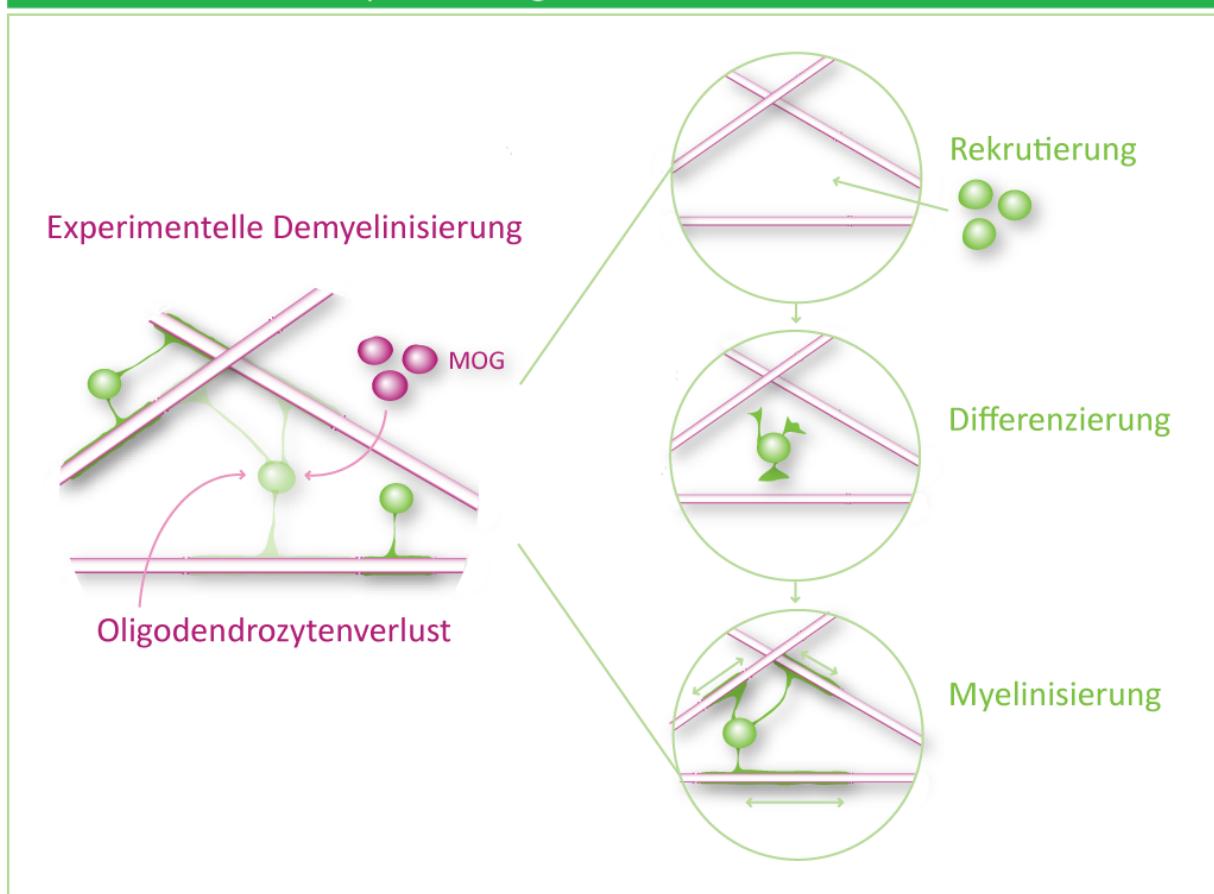


Abb. 9 Prozess der Remyelinisierung nach experimentell induzierter Demyelinisierung. MOG induziert experimentell eine Demyelinisierung und Oligodendrozytenverlust im Gewebe. Daraufhin müssen zunächst ausreichend Vorläuferzellen in eine Läsion rekrutiert werden, um die Voraussetzung für Remyelinisierung zu schaffen. Diese differenzieren sich dann über mehrere Schritte zu myelinisierenden Oligodendrozyten. Der ausdifferenzierte Oligodendrozyt tritt über seine Prozesse in Interaktion mit den Axonen und beginnt mit der Bildung von Myelinscheiden.

1.2.4.1 Rekrutierung

Man geht davon aus, dass in einem ersten Schritt eine ausreichende Rekrutierung und Proliferation von oligodendroglialen Vorläuferzellen erfolgen muss. In einer aktiv entzündlichen Läsion können natürlich trotz abgelaufender Destruktion überlebende Oligodendrozyten vorhanden sein. Jedoch scheint es unwahrscheinlich, dass diese Zellen ein weiteres Mal in ihrem Leben zur Myelinisierung befähigt sind, da sie zwar kompaktes Myelin herstellen können, aber an der korrekten Arrangierung um das Axon scheitern [79].

Die durch die voranschreitende Demyelinisierung angelockten OPC's werden zunächst zur Proliferation angeregt. Nachdem der Zellbestand ausreichend vergrößert wurde, müssen die OPC's den Zellzyklus nun verlassen und sich zu Myelinscheiden-ausbildenden Zellen differenzieren [80, 81]. Wie alle anderen regenerativen Prozesse nimmt die Fähigkeit zu diesem Schritt mit steigendem Alter ab.

1.2.4.2 Differenzierung

Stephen P.J. Fancy und Kollegen haben jüngst Konzepte zur Differenzierungsregulation und zu den beteiligten inhibitorischen Signalwegen ausgearbeitet [82]. Ein besonderes Augenmerk ist dabei auf den wnt-Signalweg gerichtet, dessen Aktivierung in mehreren tierexperimentellen Studien einen negativen Einfluss auf die Differenzierung von Vorläuferzellen hatte. Die Aktivierung des wnt-Signalweges hatte sowohl in der Entwicklung von Jungtieren als auch im adulten Kortex eine Verzögerung der Differenzierung oligodendroglialer Vorläuferzellen zur Folge [82]. Ursächlich kann diese Differenzierungsverzögerung auf der unbedingten Notwendigkeit zur Proliferation von Vorläuferzellen beruhen. Die dringend benötigten Zellen sollen nicht zu früh aus dem Zellzyklus aussteigen können, um eine ausreichende Zellzahl im Gewebe zu gewährleisten. Der wnt-Signalweg scheint daher zwar einen inhibitorischen Einfluss auf die in der Folge unabdingbare Differenzierung, zeitgleich aber auch einen positiven Effekt auf die zunächst wichtige Rekrutierung und Proliferation zu haben, indem die Oligodendrozyten im Zellzyklus festgehalten werden. Der wnt-Signalweg stellt hierbei nur ein Beispiel von vielen dar, darunter auch die Signalwege um Notch- und Lingo-1-Rezeptoren [83, 84]. Bei der Regulierung von Remyelinisierung scheint die Aktivierung der unterschiedlichsten Pfade das empfindliche Zusammenspiel beider Schritte an vielfältigen Stellen ungünstig beeinflussen

zu können. Es scheint daher unwahrscheinlich, dass die Beeinflussung einiger weniger oder gar eines einzelnen Faktors zielführend ist.

1.2.4.3 Myelinisierung

Ein für die Myelinisierung erforderlicher und häufig unterschätzter Faktor ist die Notwendigkeit einer regelgerechten Kommunikation zwischen demyelinisiertem Axon und Oligodendrozyt. Ein bereits geschädigtes Axon kann u. U. nicht mehr mit dem es versorgenden Oligodendrozyten in Interaktion treten, nachdem die Integrität des Axons in Folge (repetitiver) entzündlicher Prozesse beschädigt wurde und es in der Folge nicht mehr zur Ausschüttung pro-remyelinisierender Signale befähigt ist. Zusätzlich haben auch bruchstückhafte Myelinbestandteile, die Abbauprodukte der Myelinscheiden, eine Hemmwirkung auf erfolgreiche Remyelinisierung. Die Entfernung dieser Produkte durch Phagozyten scheint eine Voraussetzung zur Schaffung eines pro-remyelinisierenden Milieus. Mit dem Wissen um die vielen Facetten der Dysregulation stellt die Entwicklung von Therapiestrategien zur signifikanten Steigerung der Remyelinisierung eine Herausforderung dar. Ein wichtiger Ansatz ist jedoch nichtsdestotrotz die Identifizierung und Erforschung aller beteiligten, potentiell inhibitorischen Signalwege, um interventionell den Schritt der Differenzierung zu beeinflussen. Für den Signalweg um den Rezeptor Lingo-1 gibt es dahingehend bereits erste Versuche mit antagonistischen Antikörpern, die in einem geeigneten Zeitfenster Proliferation unterbinden und zum Verlassen des Zellzyklus anregen sollen [84].

Es genügt jedoch nicht, nur das Milieu hemmender und steigernder Signalstoffe zu verändern, es ist auch von entscheidender Bedeutung neue Studien- und Untersuchungsmethoden zu etablieren, um die Biologie der Oligodendrozyten und ihrer Vorläuferzellen sowie deren Interaktion mit Axonen erforschen und verstehen zu können [79].

2. Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund ihrer Funktion im zentralen Nervensystem spielen Oligodendrozyten eine zentrale Rolle für das Verständnis der Multiplen Sklerose. Die Bildung von Myelin, die Isolierung der Axone und das Aufrechterhalten eines homöostatischen Gleichgewichts sind Voraussetzung für die Funktion und das Überleben der Nervenzellen im ZNS. Entsprechend geht man davon aus, dass die Schädigung von Oligodendrozyten ein entscheidender Schritt in der Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose ist. Nach wie vor ist jedoch unklar, wie Oligodendrozyten bei der MS geschädigt werden und in welchem Umfang diese Schädigung durch Remyelinisierungsprozesse kompensiert werden kann. Diese Arbeit hat daher zum Ziel, anhand verschiedener Modelle, folgende Fragen hinsichtlich der Oligodendrozytenpathologie zu untersuchen:

1. Wo setzt die Oligodendrozytenschädigung an? - Lässt sich eine Sequenz der Schädigung von Myelin, Oligodendrozytenfortsätzen und Oligodendrozytenzellkörpern ausmachen?
2. Woran scheitert die Remyelinisierung? - Können wir die Fehlerquellen im Ablauf der Remyelinisierung in einer quantitativen Analyse weiter einengen?
3. Wie können wir die Oligodendrozytenpathologie höher aufgelöst darstellen? – Können wir z.B. lichtmikroskopische *in vivo* Befunde mit ihrer elektronenmikroskopischen Darstellung korrelieren?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tiermodell

Die hier beschriebenen Versuche wurden an 6 bis 14 Wochen alten, weiblichen und männlichen Mäusen (PLP-GFP/bl6 sowie PLP-GFP/BiozziABH) durchgeführt. Nach der EAE Immunisierung bzw. chirurgischen Intervention wurden die Tiere mit Futter und Wasser ad libitum bei einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus und einer Raumtemperatur von 22° C gehalten. Alle Tierversuche wurden nach den Richtlinien der Europäischen Ethikkommission für Tierexperimente und mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

3.1.2 Mauslinien und Bedarf für Tierhaltung

Mausstamm	PLP-GFP/bl6	Hausinterne Verpaarung, Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland
Mausstamm	Biozzi Inbred Mice	Harlan Laboratories, Inc., 64380 Roßdorf, Deutschland http://www.harlan.com/
Mauskäfige	IVC: Eurostandard Typ II long 365 x 207 x 140mm	Tecniplast Deutschland GmbH, 82383 Hohenpeißenberg, Deutschland http://www.tecniplast.de/
Einstreu	Autoklaviertes Weichholzgranulat; Lignocel FS14 Select	Ssniff Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest, Deutschland http://www.ssniff.de/
Futtermittel	Autoklavierbares Haltungsfutter Ratte/Maus	Ssniff Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest, Deutschland http://www.ssniff.de/
Isofluran (Inhalationsnarkotikum)	Forene® 100% (V/V) 250ml	Abbott GmbH & Co. KG, 65205 Wiesbaden, Deutschland http://www.abbott.com/

Narkotikum Rompun	Xylazine 2 %	Bayer Vital GmbH, 51368 Leverkusen, Deutschland http://www.tiergesundheit.bayervital.de/
Metacam®	Meloxicam 1,5mg/ml	cp Pharma, 31303 Burgdorf, Deutschland http://www.cp-pharma.de/
Bepanthen® Augensalbe	Wirkstoff Dexpanthenol	Bayer AG, 51368 Leverkusen, Deutschland http://www.bayer.de/

3.1.3 *Gebrauchslösungen, Reagenzien und Antikörper/Fluoreszenzfarbstoffe*

3.1.3.1 *Gebrauchslösungen*

Agarose		Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, 55216 Ingelheim am Rhein, Deutschland http://www.boehringer-ingelheim.de/
Agarose-Lösung 2%		Im Hause hergestellt, Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland
Destilliertes Wasser	dH ₂ O	Aus dem Hause, Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland
Eis		Im Hause hergestellt, Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland
Ethanol	Vergällt 70%, 5l	CLN GmbH, 85416 Niederhummel, Deutschland http://www.cln-freising.de/
NaCl	0.9%	B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland http://www.bbraun.de/

Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogen-phosphat-Monohydrat	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland http://www.merck.de/
NaOH	BioXtra Natronlauge ≥98%	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
Paraformaldehyd (PFA) 95%		Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
10-fach <u>Phosphate-Buffered-Saline (PBS)</u>	1) 103,23 mg Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 2) 26,52g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 3) 40g NaCl 4) mit H ₂ O bidest. auf 1L auffüllen	Im Hause hergestellt, Institut für Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland
0,1 M PBS	1) 28,4g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 8,5g NaCl in 1L H ₂ O (bi-dest.) lösen (2) 8,3g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in 300ml H ₂ O (bi-dest.) lösen (2) zu (1) bis pH 7,4	Im Hause hergestellt, Institut für Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland
PFA-Lösung 4%	(1) 8g PFA in 1l dH ₂ O lösen (2) unter Rühren auf 55-60° aufheizen (3) falls "wolkig"~ 500µl 1M NaOH hinzufügen (4) Filtrieren und je 500	Im Hause hergestellt, Institut für Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland

	ml der Lösung mit 500 ml 0.2 M PB mischen (5) pH anpassen (7.2-7.8)	
Phosphatpuffer	PB 0.2M	Im Hause hergestellt, Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland
Tissue-Tek	Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V., The Netherlands http://www.sakuraeu.com/
Triton	Triton® X-100	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
Vectashield	VECTASHIELD® Mounting Medium, Fluorescence H-1000	Vector Labs, Burlingame, CA 94010, USA http://www.vectorlabs.com/
Glutaraldehyd 50%		Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA 19440, USA http://www.emsdiasum.com/

3.1.3.2. Reagenzien zur Immunisierung

MOG	Stock solution	über PD Dr. Doron Merkler, doron.merkler@unige.ch
M. tuberculosis H37 RA		Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
IFA (Inkomplettes Freund-Adjuvans)	flüssig	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
Pertussistoxin	Pertussis toxin from <i>Bordetella pertussis</i>	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/

3.1.3.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

NeuroTrace 435-455	NeuroTrace® 435-455 Blue Fluorescent Nissl Stain - solution in DMSO	Molecular Probes®, Custom Laboratory Services, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY 14072, USA http://www.invitrogen.com/
FluoroMyelin®	Red Fluorescent myelin Stain - Solution in water	Molecular Probes®, Custom Laboratory Services, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY 14072, USA http://www.invitrogen.com/
Tollwutvirus	SAD ΔG (CVS G)	über Karl-Klaus Conzelmann, Gene Center, LMU, 81377 München, Deutschland conzelmann@genzentrum.lmu.de

3.1.4 Verbrauchsmaterialien und Instrumente

Deckgläser	Menzel-Gläser, 24 x 24mm, 24 x 32mm, 24 x 50mm, 100 Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, 38116 Braunschweig, Deutschland http://www.menzel.de/
Falcon Röhrchen	BD Falcon 15ml, 50ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ 07417, USA http://www.bdbiosciences.com/
Nagellack	LACURA Beauty 12ml	Premium Cosmetics, GmbH, 73054 Eislingen, Deutschland http://premium-cosmetics.com/
Objektträger	Menzel-Gläser, Größe 76 x 26mm, 50 Stück	Gerhard Menzel GmbH, 38116 Braunschweig, Deutschland http://www.menzel.de/
Petrischalen	Cell Culture Disk 100mm x 20mm Style	Corning Inc., Corning, NY 14831, USA http://www.corning.com/

Pipettenspitzen	epT.I.P.S. 10/200/1000 µl	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland http://www.eppendorf.com/
Sugi	sterile Saugtupfer	Kettenbach GmbH & Co. KG, 35713 Eschenbach, Deutschland http://www.kettenbach.de/
Operationsbesteck	Pinzetten, Scheren	Fine Science Tools GmbH, 69121 Heidelberg, Deutschland http://www.finescience.de/
Injektionsnadeln	BD Microlance 3	Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland http://www.bd.com/de/
Spritzen	Omnifix 20 ml	B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland http://www.bbraun.de/
Chirurgische Klinge	Feather Chirurgische Klinge, Nr. 20	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, 530-0003 Japan http://www.feather.co.jp/
Handschuhe	Peha-soft satin S	Paul Hartmann AG, 89522 Heidenheim, Deutschland http://de.hartmann.info/
UHU® Sekunden- Alleskleber		UHU GmbH & Co. KG, 77815 Bühl, Deutschland http://www.uhu.com/
Lochplatte	Zur Fixierung des Mauskopfes während des NIRB Experiments	Im Hause hergestellt, Institut für Neurowissenschaften, TUM, München, Deutschland

3.1.5 Geräte

Becherglas	250ml Schott Duran	DURAN Group GmbH, 97877 Wertheim/Main, Deutschland http://www.duran-group.com/
Magnetrührer mit Heizplatte	Yellowline MSH basic	IKA-Werke GmbH & CO.KG, 79129 Staufen, Deutschland http://www.ika.com/
Kryostat	Cryo3® 100/115 V, 50/60 Hz - Basic	Sakura Finetek Europe B.V., 2400 Alphen, The Netherlands http://www.sakuraeu.com/
Pipetten	10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland http://www.eppendorf.com/
Sutter Instrument	zur Herstellung von Mikropipetten	Sutter Instrument Company, Novato, CA 94949, USA http://www.sutter.com/
Sharptome®	Crescent Knife Straight	Angiotech Pharmaceuticals Inc., Vancouver, Canada VGA1B6 http://www.angiotech.com/
Stereotaktischer Rahmen	Digital Lab Standard Stereotaxic	Stoelting Company, Wood Dale, IL 60191, USA http://www.stoeltingco.com/
Bohrer Foredom		Foredom, Blackstone Industries Inc., Bethel, CT 06801, USA http://www.foedom.net/
High Precision Multichannel Pump	Perfusionspumpe	Ismatec, IDEX Health and Science GmbH, 97877 Wertheim-Mondfeld, Deutschland http://www.ismatec.com/
Vibratome	Vibratome 1000 Plus Sectioning System	The Vibratome Company, St. Louis, MO 63134, USA http://www.vibratome.com/

Plattformschüttler	Unimax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, 91126 Schwabach, Deutschland http://www.heidolph-instruments.com/
Rasiergerät	Ebony complet	SOLAC c/o Rhenus Logistics, 08393 Meerane, Deutschland http://www.solac.com/

3.1.6 Mikroskopie

Konfokales Mikroskop	FluoView FV1000 Confocal Microscope	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
Olympus SZ51, Olympus SZ57	Mikrodissektions- mikroskop (SZ51), Operationsmikroskop (SZ57)	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
LEICA M205 FA	Fluoreszenz- Dissektionsmikroskop	Leica Microsystems GmbH, 35578 Wetzlar, Deutschland http://www.leica-microsystems.com/
Zwei-Photonen- Mikroskop	Fluo View FV 300	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
2-Photonenlaser	Mai Tai 2-Photonen- Laser	Newport/ Spectraphysics, Irvine, Kalifornien, USA http://www.newport.com/
Weitfeldmikroskop	BX51WI, Research system microscope, BX2WI series	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/

Wasserobjektiv 20x	UMPLFL 20xW/0.50	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
Wasserobjektiv 100x	LUMPLFL 100xW/1.00	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
Kamera	Sensicam qe, cooled digital 12 bit CCD camera system	pco. Imaging AG, 93309 Kelheim, Deutschland http://www.pco.de/

3.1.7 Software und Statistik

Adobe Photoshop CS2 Adobe Illustrator	Bildbearbeitungs- Software	Adobe Systems, Inc., San Jose, Kalifornien, USA http://www.adobe.com/
ImageJ	Image Processing and Analysis in Java	General Public License http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html
Graphpad Prism	Biostatistik und wissenschaftliche Grafiken	GraphPad Software, La Jolla, CA 92037, USA http://www.graphpad.com/
Word & PowerPoint	Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA http://www.microsoft.com/
SAS 9.02	Software für statistische Analysen	SAS Institute GmbH, 69118 Heidelberg, Deutschland http://www.sas.com/

3.2 Methoden

3.2.1 Quantifizierung von Oligodendrozyten, Oligodendrozytenfortsätzen und Myelin zu verschiedenen Zeitpunkten (akut/chronisch) nach EAE Immunisierung

3.2.1.1 Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Zunächst wurden die Tiere mit 0.2 ml Ketamin/Xylazin (100mg/kg KG Ketamin, 5mg/kg KG Xylazin) intraperitoneal anästhesiert. Darauffolgend wurden sie für das akute Modell mit 375 µg MOG/CFA++ und 400 ng Pertussistoxin immunisiert. Die Bestandslösung zu 5mg/ml MOG wurde dafür mit 2mM Natriumazetat (pH3.5) zu 3 mg/ml MOG verdünnt. Zur Erstellung der Immunisierungs-Emulsion wurden 125 µl der MOG-Lösung 1:1 mit 125 µl CFA++ (Mycobacterium tuberculosis in inkomplettem Freund-Adjuvans) gemischt. Dabei wurden je 100 µl der Emulsion subkutan in die Flanken und 50 µl an der Basis des Schwanzes gespritzt. Direkt im Anschluss wurde dann die Pertussis-Lösung (200 ng Pertussistoxin) intraperitoneal gespritzt, die verbleibenden 200 ng an Tag 2 nach Induktion. Für das chronische Modell wurden die Tiere mit einer niedrigeren Einzeldosis immunisiert. An Tag 0 und 7 wurden je 200µg MOG/CFA++ in 250 µl Emulsion gegeben. Die Injektion der Pertussistoxin-Lösung verteilte sich auf je 200 ng an Tag 0, 1, 7 und 8.

Während des gesamten Verlaufs wurden die immunisierten Tiere täglich morgens gewogen und hinsichtlich ihrer neurologischen Defizite anhand einer Standardskala beurteilt (siehe **4.1.1, Diagr. 2**). Am Tag des ersten Auftretens klinischer Symptome ("Onset") bzw. 2, 7 und 14 Tage danach wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und nach chirurgischem Zugang transkardial mit PFA (4%) perfundiert.

3.2.1.2 Gewebeprozessierung

Das perfundierte Rückenmark wurde en bloc mit Wirbelsäule und paravertebraler Muskulatur herausgetrennt und 24 h in PFA (4%) nachfixiert. Anschließend wurde das Rückenmark von sakral nach kranial mikrodisseziert und in 0,1 M PBS überführt. Nach chirurgischer Trennung des lumbalen Abschnitts vom restlichen Rückenmark wurde dieser in Agarose (2%) eingebettet. Mit dem Vibratome wurde der Agaroseblock in 50 µm dünne, longitudinale Scheiben geschnitten, wobei die Schnitte konsekutiv getrennt in 0,1 M PBS/0,1% NaN3 bei 4°C dunkel aufbewahrt wurden.

3.2.1.3 Immunhistochemie

Die Schnitte wurden hinsichtlich ihres Anteils an weißer Substanz unter dem Mikroskop vorbeurteilt. Darauffolgend wurde eine Auswahl an Schnitten mit NeuroTrace (NT) 435-455 und FluoroMyelin wie folgt, *free-floating*, angefärbt. Zunächst erfolgte eine Serie von Waschschritten (3x 10 Minuten) mit 0.1 M PBS plus Triton X100, um das Gewebe für Farbstoffe durchlässiger zu machen. Die Schnitte wurden dann in die immunhistochemische Färbelösung, bestehend aus NT 435-455 in einer Verdünnung von 1:250 mit 0.1 M PBS und FluoroMyelin in einer Verdünnung von 1:500 mit 0.1 M PBS, überführt. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für 120 Minuten inkubiert, bevor drei weitere Waschschritte à 10 Minuten mit 0.1 M PBS ohne TritonX100 erfolgten. Abschließend wurden die Rückenmarksschnitte konsekutiv auf Objekträger aufgezogen, mit Vectashield und Deckgläschchen verschlossen und bei 4°C dunkel gelagert.

3.2.1.4 Mikroskopie

Mit einem Konfokalen Mikroskop (Olympus FV 1000) wurden die verschiedenen Fluophore in drei unterschiedlichen Kanälen erfasst. Kanal 1 zeigte NeuroTrace-gefärbte Zellkerne (Anregung bei 440nm), Kanal 2 die PLP-GFP Fluophore der Oligodendrozyten bzw. deren Fortsäten (Anregung bei 488nm) und Kanal 3 das Myelin-anfärbende FluoroMyelin (Anregung bei 594nm). In den Gewebs-Schnitten der EAE Tiere wurden zunächst unter 20-facher Vergrößerung Läsionen und deren Randbereich in der weißen Substanz aufgesucht. Der "Scan" wurde nun so eingestellt, dass sich der erste Mikroskopieausschnitt (siehe **Abb. 10**) vollständig in der Läsion und dabei möglichst nah am äußeren Geweberand befindet (siehe **Abb. 10**, Kästchen 1). Dabei wurden jeweils 5 µm unter der Oberfläche des Schnitts beginnend 25 Bilder mit einer z-Distanz von 0,6 µm gescannt (Vergrößerung 60x, dreifacher Zoom). Danach wurden weitere, an den ersten Bildstapel nahtlos anschließende, Bildstapel gleicher Tiefenausdehnung eingestellt (Ausschnitte 2 und 3 in **Abb. 10**), welche transversal (vom Rand des Gewebes zum inneren Zentrum) orientiert waren und damit zunehmend Läsionsrandbezirke bzw. periläsionäre Regionen abbildeten.

Abb. 10 Mikroskopie zweier Läsionen eines Rückenmark-Längsschnittes

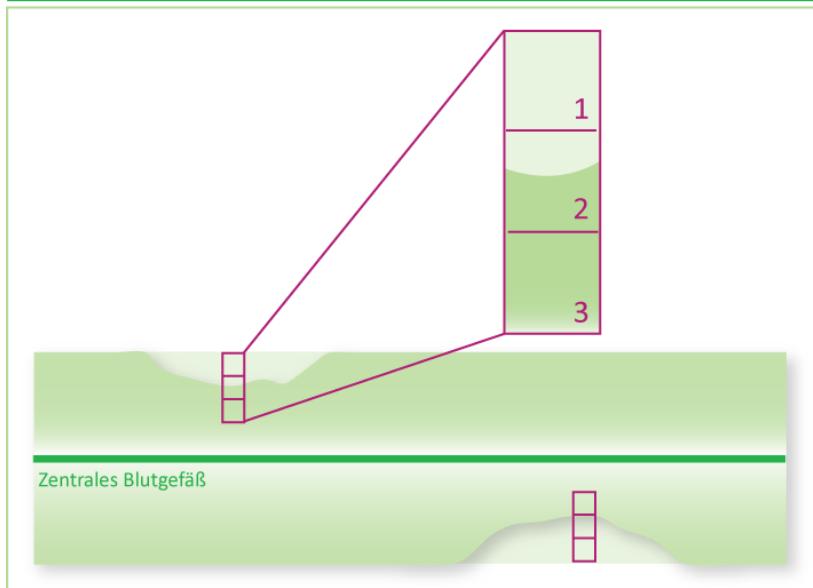


Abb. 10 Durchführung der Mikroskopie.

Konsekutiv wurden in der Läsion drei Bildstapel gescannt: der erste Bildstapel befindet sich im Zentrum der Läsion, der zweite, daran anschließende Bildstapel befindet sich am Rand der Läsion, der dritte Stapel im Übergangsbereich zu normaler weißer Substanz.

Die Laserintensität der drei Kanäle wurde so gewählt, dass alle Strukturen erfasst wurden, eine Sättigung der Detektoren jedoch ausgeschlossen werden konnte. Mit den Kontrolltieren wurde prinzipiell ebenso verfahren, wobei konkordante Regionen in der gesunden weißen Substanz ausgewählt und gescannt wurden.

3.2.1.5 Auswertung

Die Bildstapel wurden mit ImageJ quantitativ analysiert, wobei pro Bildstapel jedes fünfte Bild ausgewertet wurde. Zur Auszählung der Zellen wurde der "Cell Counter Plug-in" von ImageJ verwendet, das Myelin und die Oligodendrozytenfortsätze wurden mit Hilfe des "Trace and Measure Plug-in" manuell ausgemessen. Die Gesamtlänge des Myelins pro Bild und Bildstapel eines EAE immunisierten Tieres wurde mit der Gesamtlänge an Myelin eines gesunden Kontrolltieres verglichen. Analog wurde mit der Oligodendrozytenzellzahl, der Anzahl NT-gefärbter Zellen und den Oligodendrozytenfortsätzen verfahren. Exemplarisch werden die genannten Auswertungsschritte im Ergebnisteil noch verdeutlicht (siehe **4.1.2, Abb. 12**).

3.2.2 Rekonstruktion von kranken und gesunden Oligodendrozyten

3.2.2.1 EAE Induktion und Virusinjektion

Zunächst wurde durch Injektion von 250 µg MOG s.c. und 400 ng Pertussistoxin i.p. eine EAE Immunisierung (wie bereits oben beschrieben) durchgeführt. Nach 7 Tagen mit täglicher Gewichtskontrolle sowie täglichem "Scoring" wurden die (noch gesunden) EAE-immunisierten Tiere sowie die gesunden Kontrolltiere der spinalen Virusinjektion zugeführt. In einem ersten Schritt wurden die Tiere mit einer oralen Medikation von 5 µl Metacam analgesiert und anschließend mit 0,2 µl Ketamin/Xylazin (100mg/kg KG Ketamin, 5mg/kg KG Xylazin) i.p. anästhesiert. Nach der, unter dem Operationsmikroskop durchgeföhrten, chirurgischen Eröffnung der Haut und des Bindegewebes über dem lumbalen Wirbelsäulenabschnitt wurde die paravertebrale Muskulatur teilweise entfernt, um die Wirbelkörper in ihrem Verlauf freizulegen. Nach der partiellen Entfernung des umgebenden Bindegewebes folgte die Laminektomie. Drei Wirbelkörper wurden beidseitig an den Wirbelbögen durchtrennt, um den dorsalen Abschnitt am Dornfortsatz kontrolliert abzuheben. Das lumbale Rückenmark liegt danach über einer Länge von drei Wirbelkörpern frei. Über den geplanten Injektionsstellen in der weißen Substanz, sowohl zentral paravenös als auch am lateralen, äußerem Rand des Rückenmarks, wurde die Dura mater vorsichtig angeritzt, um eine Schädigung des empfindlichen Gewebes durch den Druck der Mikropipetten auf die stabile Dura zu vermeiden. Mit Mikropipetten wurden 0.5 µl des Tollwutvirus SAD ΔG in einer Verdünnung von 1:2 mit 0.1 M PBS stereotaktisch in einer Tiefe von 20 µm injiziert. Dabei wurden je nach Kondition des Tieres zwischen 3-5 Injektionen durchgeführt. Nach einer Spülung des Operationsfeldes mit NaCl 0.9% und der Durchführung blutstillender Maßnahmen wird die Muskulatur mit vier Stichen verschlossen und die darüberliegende Haut ebenfalls vernäht. Postoperativ wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte gehalten und durch subkutane 0.9%-ige NaCl-Injektionen rehydriert. Am ersten Tag nach der Operation erfolgte eine zweite Gabe von 5 µl Metacam zur Schmerzstillung.

Weiterhin wurde nun ein tägliches "Scoring" von Gewicht und klinischen Ausfällen durchgeführt. Durchschnittlich entwickelten die EAE-immunisierten Tiere am Tag 12 nach Immunisierung und Tag 5 nach der Virusinjektion erste Anzeichen der EAE. Am Tag 2 nach "Onset" wurden die Tiere bei einem durchschnittlichen Scoring-Punktwert von 2.5 mit Isofluran narkotisiert und nach chirurgischem Zugang transkardial mit PFA (4%) perfundiert.

3.2.2.2 Mikroskopie

Unter 60-facher Vergrößerung wurden mit dem Konfokalen Mikroskop die vereinzelten, doppelt positiv gefärbten Oligodendrozyten identifiziert und mit einem Zoom von 1 in ihrer Tiefenausdehnung gescannt. Dabei wurden drei verschiedene Kanäle gescannt um alle drei Fluophor-Farbstoffe (PLP-GFP der Mauslinie, Virusfarbstoff *CherryRed* und die immunhistochemische Zellkernfärbung NT 435-455, siehe **3.2.1.3**) parallel darzustellen. Die Vergrößerung wurde so gewählt, dass der Zellkörper zentral im Mikroskopie-Ausschnitt liegt und sich davon ausgehend die Fortsätze in alle Raumrichtungen ausbreiten. Die Laserstärke orientierte sich an der Detektion der Fortsätze, welche zur Rekonstruktion optimal dargestellt werden müssen.

3.2.2.3 Bildverarbeitung

Die konfokal gescannten Oligodendrozyten wurden manuell in Adobe Photoshop rekonstruiert. Die Messung der Längen der Oligodendrozytenfortsätze, sowie deren Anordnung, Verzweigung und Anzahl wurde mit dem "NeuronJ Plug-in" von ImageJ durchgeführt bzw. bestimmt.

3.2.3 Near-infrared Branding (NIRB) Experiment

3.2.3.1 In-vivo Mikroskopie: Zugang zum Kortex

Eine PLP-GFP/bl6 Maus wurde mit 5 µl Metacam oral analgesiert und mit 0.2 µl Ketamin/Xylazin intraperitoneal (100mg/kg KG Ketamin, 5mg/kg KG Xylazin) anästhesiert. Der Kopf wurde rasiert und mit Alkoholtupfern von feinen Häarchen befreit. Anschließend wurde nach sagittalem, chirurgischem Hautschnitt das Bindegewebe zwischen Haut und Schädelknochen entfernt. Im Bereich des Parietallappens wurde nun lateral der Sutura sagittalis die Bohrstelle ausgemacht. Mit dem Bohrer wurde unter 30-facher Vergrößerung bei maximaler Drehgeschwindigkeit und intermittierend leichtem Druck die Schädeldecke auf ca. 30 µm ausgedünnt. Die Dicke wurde dabei wiederholt unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop ausgemessen. Um den Knochen noch weiter auszudünnen, wurde im Anschluss das „Sharptome Crescent Knife“ mit einem Durchmesser von ca. 1.5 mm benutzt, mit welchem die Knochenlamellen unter Beibehaltung der Integrität des Schädelns bis auf eine Dicke von nun ca. 20 µm abgeschabt wurden. Um die konische Ausdünnung wurde eine

transparente, eigens zu diesem Zweck angefertigte, runde Plastikschale mit zentralem Loch (Lochplatte) auf den Knochen geklebt, welche in einen Rahmen eingespannt wurde, um den Kopf während der Dokumentation der Oligodendrozyten und der *in-vivo* Mikroskopie stabil zu halten.

3.2.3.2 Mikroskopie

Mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop wurden durch die ausgedünnte Knochendecke *in-vivo* Bildstapel eines individuellen Oligodendrozyten mit einer Vergrößerung von 60 und 2.5-fachem Zoom, sowie Übersichtsaufnahmen von 60x und 20x (jeweils ohne Zoom) gescannt. Unter dem Fluoreszenz-Dissektions-Mikroskop wurde anschließend der charakteristische Oligodendrozyt in Bezug zu auffälligen Gefäßstrukturen mit absteigenden Vergrößerungen sowohl unter normalem Licht, als auch unter Fluoreszenzlicht dokumentiert. Nach einer Isofluran-Narkose des Tieres erfolgte die transkardiale Perfusion für Elektronenmikroskopie mit 2.5% Glutaraldehyd/2% PFA/0.1M PBS. Der Schädel wurde in 2.5% Glutaraldehyd/2% PFA/0.1M PBS 24 Stunden postfixiert.

Nach Postfixation wurde am 2. Tag die ausgedünnte Stelle unter dem Fluoreszenz-Dissektions-Mikroskop ausgemacht, anschließend der Schädelknochen entfernt und mit spitzer Skalpellklinge ein Quader aus dem Hirngewebe um den dokumentierten Oligodendrozyten ausgestochen. Die Orientierung des Quaders im Kopf wurde durch eine Markierung festgehalten und nach dessen Überführung in EM PBS wurde er durch eine Palisade aus Micropins in einem Schälchen fixiert. Die Zelle wurde unter dem Mikroskop wieder aufgefunden und ein zweites Mal mit fixen Vergrößerungen und Belichtungseinstellungen dokumentiert. Danach wurde der Gewebeblock in Agarose (2%) mit der Gehirnoberfläche nach oben eingebettet. Mit dem Vibratom wurden drei 20 μ m Schnitte geschnitten, wobei sich die Zelle voraussichtlich bereits im ersten Schnitt befindet. Der Oligodendrozyt wurde in einem dieser Schnitte ein letztes Mal lichtmikroskopisch aufgefunden und analog dokumentiert. Danach wird der Gewebsschnitt in einer Parafilm-Kammer mit EM PBS temporär auf einem Objektträger eingeschlossen. Unter 60-facher Vergrößerung werden hochauflösende konfokale Detailaufnahmen des Oligodendrozyten gemacht. Um die Struktur von Interesse ausreichend zu dokumentieren, wurden von den fixierten Vibratom-Schnitten mit dem Konfokalen Mikroskop sowohl niedrig- als auch hochauflösende Bildserien gescannt.

Abb. 11 Dokumentation des Oligodendrozyten

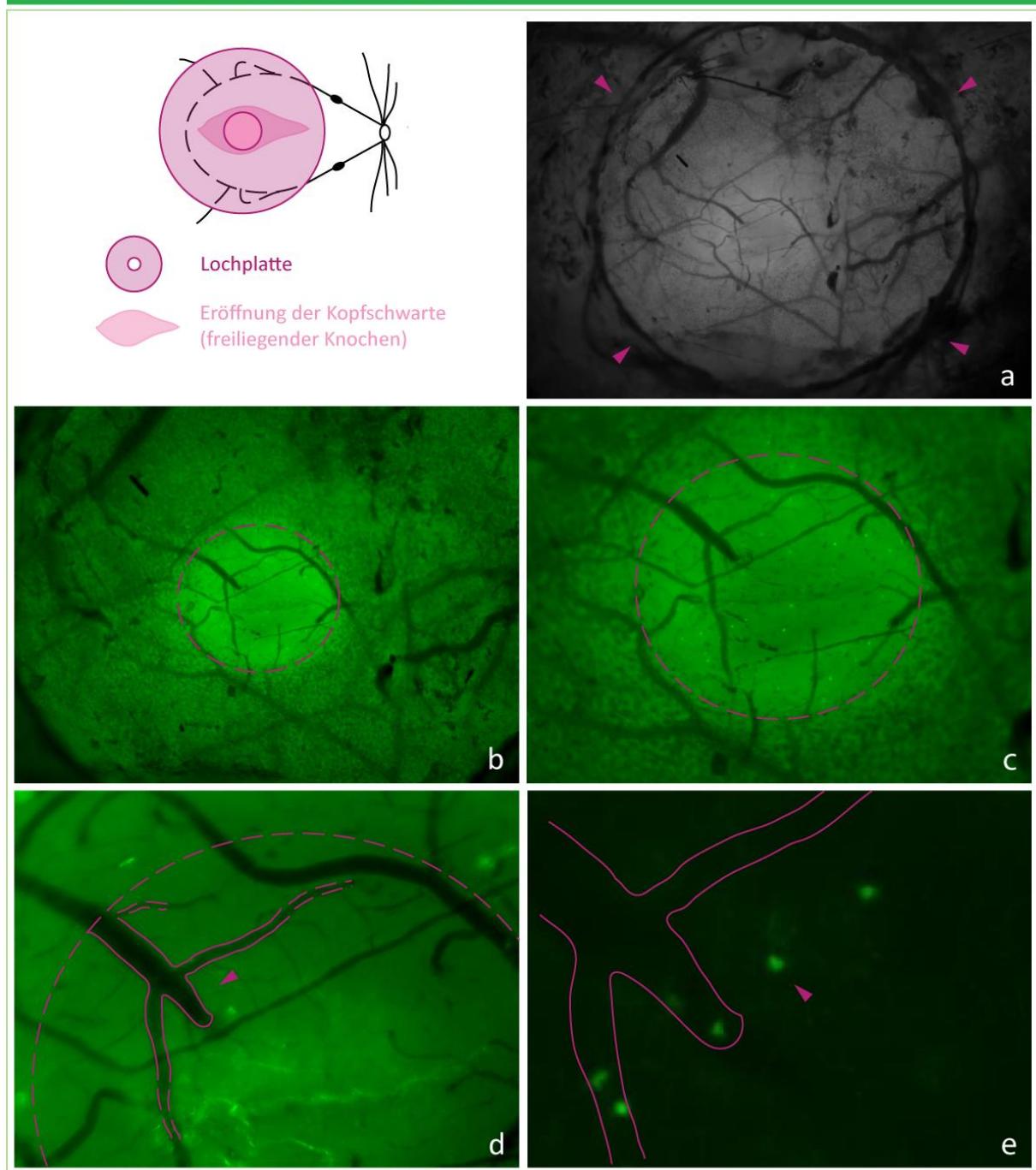


Abb. 11 Dokumentation des Oligodendrozyten Ausgedünnte Schädelkalotte in unterschiedlicher Vergrößerung: (a) 30-fache Vergrößerung. Die magentafarbenen **Pfeilköpfe** heben die Öffnung der Lochplatte (siehe **Skizze** oben links) hervor, an welcher der Schädel fixiert wurde. (b) 50-fache Vergrößerung. Der Bereich im Inneren des magentafarbenen, gestrichelten Kreises entspricht einer Stelle maximal ausgedünnten Knochens (etwa 30 µm). Der umgebende Knochen ist von der Struktur unruhig ("Pünktchen"), da hier der spongiöse Teil des Knochens noch erhalten ist. (c) 100-fache Vergrößerung. Man beachte die sich gabelnde Gefäßstruktur im Inneren des Kreises. (d) 160-fache Vergrößerung. **Pfeilkopf** ist auf die Stelle ausgerichtet, an der sich der Oligodendrozyt von Interesse befindet (in dieser Fluoreszenzeinstellung nicht sichtbar). Magentafarbene **Linie** betont die orientierende Gefäßstruktur. (e) Ausschnitt aus 160-facher Vergrößerung:

Pfeilkopf markiert den Oligodendrozyten, welcher im Folgenden für das NIRB ausgewählt wurde. Magentafarbene **Linie** stellt auch hier den Gefäßverlauf da.

3.2.3.3 *Near-infrared Branding*

Die NIRB Markierungen wurden mit einer speziell angefertigten Apparatur auf der Basis eines Olympus FV300 Multiphotonen-Mikroskops und eines femtosekunden-gepulsten Titan-Saphir Lasers ausgeführt. Mit Hilfe eines polarisierten Lichtstrahl-Splitters kann Einfluss auf die Stärke des Laserstrahls genommen werden, wobei für das NIRB die volle Laserstärke ausgenutzt wurde. Für das Setzen der Markierungen verwendeten wir ein 60x, 1.42 NA Öl-, ein 25x, 1.05 NA Wasser- und ein 60x, 0.9 NA Wasser-Immersions-Objektiv. Im Anschluss an die bereits beschriebenen hochauflösten Dokumentationsscans wurde der Objektträger auf unser Multiphoton-Setup transferiert um die Struktur zu markieren. Idealerweise wurde eine 25 µm x 25 µm große Box gebrannt, welche 1.0 µm oberhalb der Struktur positioniert wurde. Die Stärke der NIRB Markierungen wurden durch die Komponenten Laserstärke und die Dauer der Laserexposition festgelegt. Nachdem das Gewebe den Laserstrahl im Verlauf abschwächt, stellt die Tiefe bzw. die z-Position der Markierung im Gewebe einen Einflussfaktor auf Laserstärke und Größe des NIRB im Gewebe dar. Darauffolgend brannten wir eine noch kleinere Box mit einer Ausdehnung von 6.5 µm x 6.5 µm direkt in das z- Niveau der Struktur. Gegebenenfalls wurde zusätzlich noch ein runder Punkt (1-2 µm) direkt neben die Struktur gesetzt. Um die NIRB Markierungen sichtbar zu machen, wurden von den Oligodendrozyten (bzw. den anderen Strukturen unseres Interesses) auch nach dem NIRB Zwei-Photonen- und konfokale Bildserien unter Verwendung eines Emissionsfilter für gelb-grüne Fluophore (z.B. 520-560nm für die Struktur) und eines DsRed Emissionsfilters (575-630nm) für die von der Markierung ausgehende Fluoreszenz gemacht. Für die Dokumentation wurden dabei 4x, 0.1 NA Luft, 60x, 1.42 NA Öl-Immersions- und 20x, 0.5 NA, 25x, 1.05 NA, 60x, 0.9 NA Wasser-Immersions- Objektive verwendet.

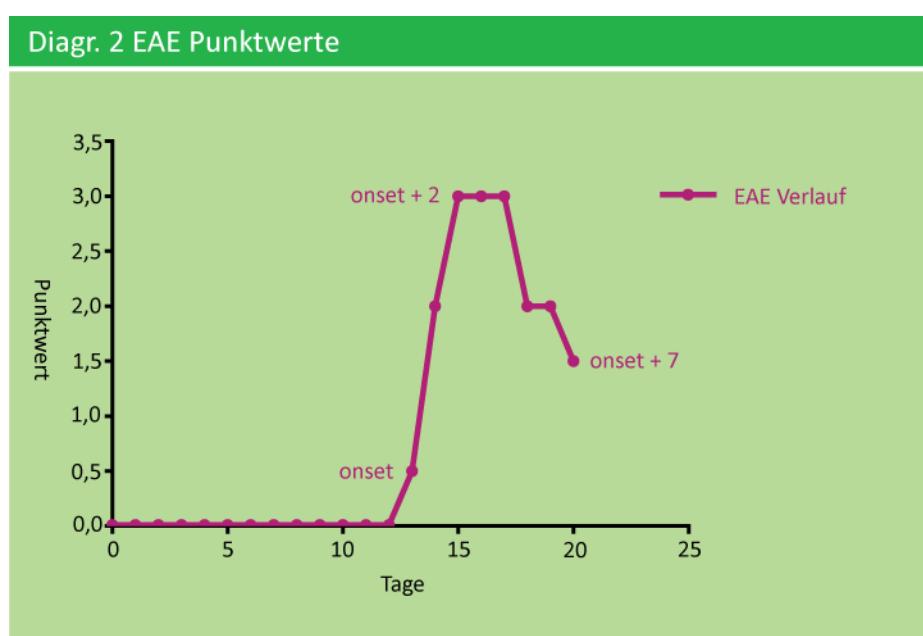
Die weitere Prozessierung des Gewebes sowie die korrelierenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Derron Bishop, Indiana, USA, übernommen. Weitere Informationen dazu finden sich im Ergebnisteil dieser Arbeit.

4. Ergebnisse

4.1 Akutes Modell der Multiplen Sklerose

4.1.1 Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Um die Oligodendrozytenpathologie in akuten entzündlichen Läsionen darzustellen, induzierten wir in der ersten Versuchsserie ein akutes EAE Modell (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis, siehe Kapitel 3.2.1.1). In diesem Modell entwickelten die immunisierten Tiere im Durchschnitt nach 12 Tagen erste klinische Anzeichen der Erkrankung ("Onset"). In den meisten Fällen fielen sie zunächst durch eine isolierte, distal beginnende Schwanzschwäche auf. In den folgenden Tagen kamen dann Lähmungen der Hinterbeine hinzu, auf deren Basis die Tiere anhand eines EAE Scores klassifiziert wurden. Bei fortlaufender täglicher Beobachtung ergab sich durchschnittlich folgender Verlauf:



Diagr. 2 Beispielhafter Krankheitsverlauf der immunisierten Kohorte.

An Tag 12 nach Immunisierung entwickeln die Mäuse erste Anzeichen der Erkrankung mit Punktwerten von 0.5-1 (Punkteverteilung: 0, keine erkennbaren klinischen Zeichen; 0.5, leichte Schwanzschwäche; 1, ausgeprägte Lähmung des Schwanzes; 1.5, Gangunsicherheit; 2, Parese der Hinterbeine; 2.5, Parese der Hinterbeine mit partiellem Nachziehen; 3, Plegie der Hinterbeine 3.5, Plegie der Hinterbeine und Parese der Vorderbeine; 4, Tetraplegie; 5, moribund) Im weiteren Verlauf nimmt die klinische Symptomatik noch deutlich zu und erreicht zwei Tage nach "Onset" ihr Maximum. Danach zeigt die Symptomatik zunächst einen plateauartigen Verlauf und ist 6 Tage nach "Onset" wieder rückläufig. Die beschrifteten Punkte zeigen die Zeitpunkte an, die für eine Analyse des Gewebes ausgewählt wurden.

Mit dem Wissen um einen derartigen Verlauf wurden spezifische Zeitpunkte festgelegt, die die unterschiedlichen Krankheitsphasen repräsentieren sollen: "Onset" für die initiale Krankheitsphase, "Onset + 2 Tage" für das Maximum der Krankheitsaktivität und "Onset + 7 Tage" für die frühe Remissionsphase.

4.1.2 Auswertung der Ergebnisse

Um die Sequenz der Oligodendrozytenschädigung besser zu verstehen, wurden verschiedene Kompartimente der Oligodendrozyten (das Myelin, die Zellfortsätze und die Zellkörper) separat quantifiziert. Diese Vorgehensweise gründet auf der Frage, in welcher Reihenfolge die Oligodendrozyten-Kompartimente geschädigt werden.

Abb. 8 Hypothesen zur Demyelinisierung

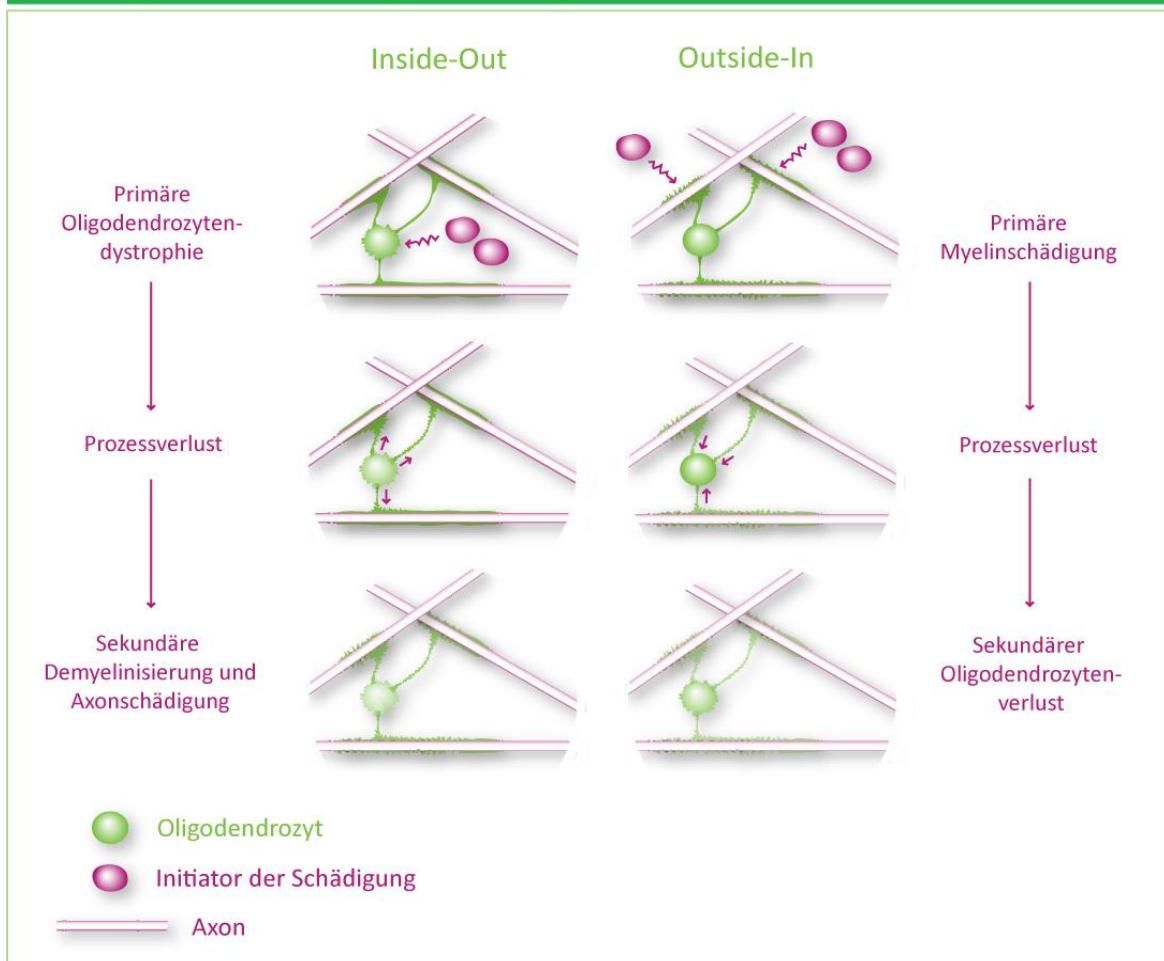


Abb. 8 Vorstellung zum Ablauf von Demyelinisierung. Links: Primäre Oligodendrozytendystrophie mit konsekutivem Prozessverlust und erst sekundärer Demyelinisierung ("Inside-Out"). Rechts: Myelin als primäres Target mit darauffolgendem Prozessverlust und erst sekundärem Oligodendrozyten-Zellkörper-Verlust ("Outside-In").

Prinzipiell sind 2 Möglichkeiten denkbar (siehe **Abb. 8**): (1) Es handelt sich um eine primäre Myelinschädigung, gefolgt von einem Verlust der Fortsätze und Zellkörper ("Outside-In") oder (2) um eine primäre Oligodendrozytenpathologie, welche nach Untergang des Zellkörpers einen Verlust der Fortsätze nach sich zieht und erst in der Konsequenz die Demyelinisierung bedingt ("Inside-Out").

Die verschiedenen Zellkompartimente wurden dabei wie folgt analysiert: Die Oligodendrozytenzellkörper wurden unter Verwendung des "Cell Counter Plug-in" von ImageJ manuell ausgezählt (siehe Kapitel **3.2.1.5**). Dabei wurde jeweils die Gesamtanzahl an Oligodendrozyten in einem kompletten konfokalen Bildstapel, sowohl von krankem Gewebe, als auch von gesundem Kontrollgewebe quantifiziert (siehe **Abb. 12**). Ebenfalls ausgezählt wurden sämtliche in den Bildstapeln detektierbaren Zellkerne. Diesem Schritt liegt die Überlegung zugrunde, ein quantifizierbares Maß für die Entzündung im jeweiligen Läsionsgebiet ausmachen zu wollen. Die Zellkerne beziehungsweise deren Zellkörper stellen vermutlich Entzündungszellen dar, die das Gewebe in verschiedenem Ausmaß infiltriert haben. Die Zellkerne wurden mit einer Neurotrace-Färbung (NT) immunhistochemisch angefärbt. Angesichts der z.T. großen Zelldichte wurde nur jedes fünfte Bild eines Bildstapels ausgewertet und nicht der komplette Stapel, wie bei der Auszählung der Oligodendrozytenzellkörper. Nachdem die Neurotrace-markierten Zellen nur ein Mittel zur Verifizierung einer Läsion und zur Quantifizierung der Entzündung darstellen, ist die tatsächliche Anzahl auch weit weniger relevant als der relative Unterschied zwischen krankem und gesundem Tier beziehungsweise zwischen den verschiedenen Krankheitstagen. Nichtsdestotrotz wurden die NT-positiven Zellen noch um die Anzahl der zu detektierenden Oligodendrozyten im jeweiligen Bild reduziert, um tatsächlich nur die Anzahl infiltrierter und nicht noch zusätzlich der ortsständigen Oligodendrozyten zu erfassen.

Das mit der FluoroMyelin® Färbung dargestellte Myelin wurde manuell markiert, um die Gesamtlänge von Myelin im jeweiligen Gesichtsfeld und letztlich Bildstapel zu quantifizieren. Auch hier wurde beispielhaft jedes fünfte Bild eines Stapels ausgewertet. Durch die Überlagerung des zu bearbeitenden Bildes mit einem artifiziellen Gitter (siehe **Abb. 12**, 16-Felder-Gitter) wurde die Auswertung bei gleichem Informationsgewinn wesentlich effizienter, nachdem ein geringerer Anteil des Myelins markiert werden musste, jedoch die Ergebnisse durch die Beibehaltung desselben Auswertungsschemas nicht verzerrt wurden.

Sämtliche eben beschriebenen Schritte wurden auch auf die GFP-positiven Zellfortsätze angewandt (siehe **Abb. 12**).

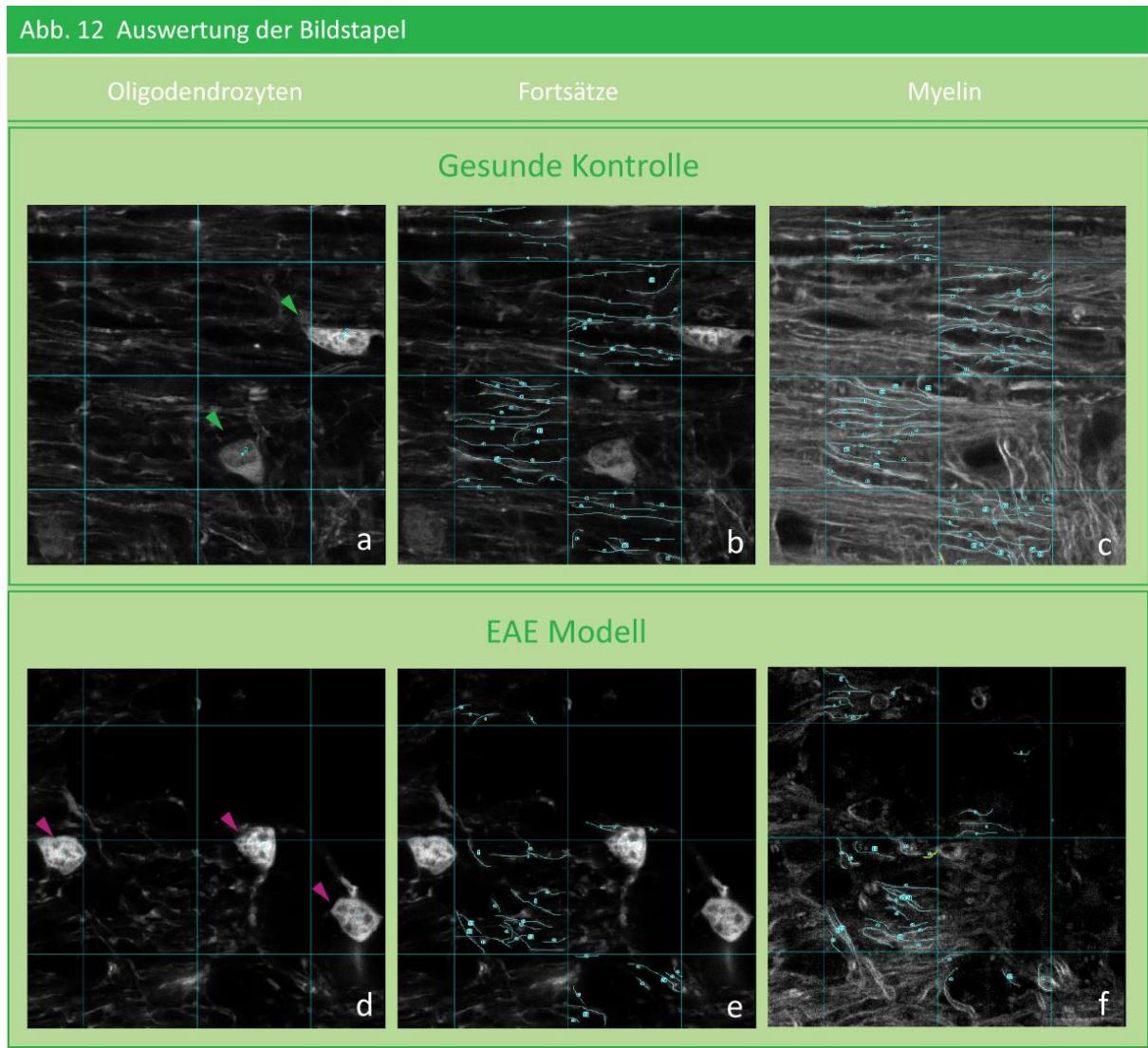


Abb. 12 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen. Die obere Bilderreihe der Grafik (a, b, c) stellt gesundes, die untere Reihe (d, e, f) EAE-immunisiertes Rückenmarksgewebe dar. Von links nach rechts sind dabei jeweils drei Kanäle dargestellt, welche separat ausgewertet wurden. (a, d) Die Zellkörper der Oligodendrozyten (siehe **Pfeilköpfe**) stellen sich durch das GFP-Fluophor, welches in Tieren der Linie PLP-GFP exprimiert wird, dar und wurden mit dem "Cell Counter Plug-in" von ImageJ nummeriert und ausgezählt. (c, f) Das Myelin (hellgraue Linien) wurde histoimmunologisch mit FluoroMyelin® angefärbt und unter Verwendung eines 594 nm Lasers detektiert. Das nun sichtbare Myelin wurde manuell markiert (hellblaue Linien mit Nummerierung) und anschließend vermessen. (b, e) Die Zellfortsätze, welche sich ebenfalls durch das in der verwendeten Mauslinie exprimierte GFP-Fluophor darstellen, wurden zunächst manuell markiert (hellblaue Linien mit Nummerierung) und dann ihre (Gesamt-)Längen gemessen.

4.1.3 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit vom Erkrankungszeitpunkt

Die Immunisierung der Kohorte (8 Tiere; 3 zum Zeitpunkt "*Onset*", 3 zum Zeitpunkt "*Onset + 2*", 2 zum Zeitpunkt "*Onset + 7*") mit MOG führte im Verlauf zur partiellen Zerstörung verschiedener Komponenten des ZNS. Das Augenmerk dieser Arbeit liegt dabei auf der Sequenz, in der die unterschiedlichen zellulären Kompartimente der Oligodendrozyten (Zellkörper, Fortsätze und Myelin) geschädigt werden. Wie aus dem Graph in **Abb. 13** hervorgeht, ist bereits zu Erkrankungsbeginn ("*Onset*") ein deutlicher Verlust aller drei Komponenten zu verzeichnen, welcher über die Dauer der akuten Krankheitsphase ("*Onset*", "*Onset + 2*", "*Onset + 7*") weiter zunimmt. Während die Myelinlänge am Tag des "*Onset*" bereits nur noch 43% (SD=24) der Myelinlänge in der gesunden Kontrollgruppe beträgt, fällt diese im Verlauf weiter auf 35% (SD=27) ab. Interessanterweise ist der Verlust an Myelin deutlich stärker ausgeprägt als der Verlust von Zellfortsätzen und Zellkörpern. Während die Gesamtlänge der Zellfortsätze ebenfalls deutlich abnimmt (von 62% (SD=31) über 59% (SD =22) auf 55% (SD=23) des Kontrollwerts an den Tagen "*Onset*"/ "*Onset + 2*"/ "*Onset + 7*") bleibt die Oligodendrozytenzahl erstaunlicherweise relativ konstant. Im Durchschnitt gehen in den ersten Tagen (bis "*Onset + 2*") nur durchschnittlich 29% der Oligodendrozyten verloren, wohingegen zu diesem Zeitpunkt bereits 41% ihrer Fortsätze und 57% des Myelins zerstört wurden. Des Weiteren kann die Beobachtung gemacht werden, dass zum Zeitpunkt "*Onset + 7*" nicht nur keine weitere Abnahme der Oligodendrozytenanzahl, sondern sogar ein Wiederanstieg auf 94% (SD=33) des Ausgangswertes der Kontrollgruppe zu verzeichnen ist. Diese Beobachtung hat zu Untersuchungen im Rahmen eines chronischen Modells der Multiplen Sklerose Anlass gegeben, deren Ergebnisse ausführlich im zweiten Teil dieser Arbeit beschrieben werden.

Abb. 13 Gewebeschädigung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt

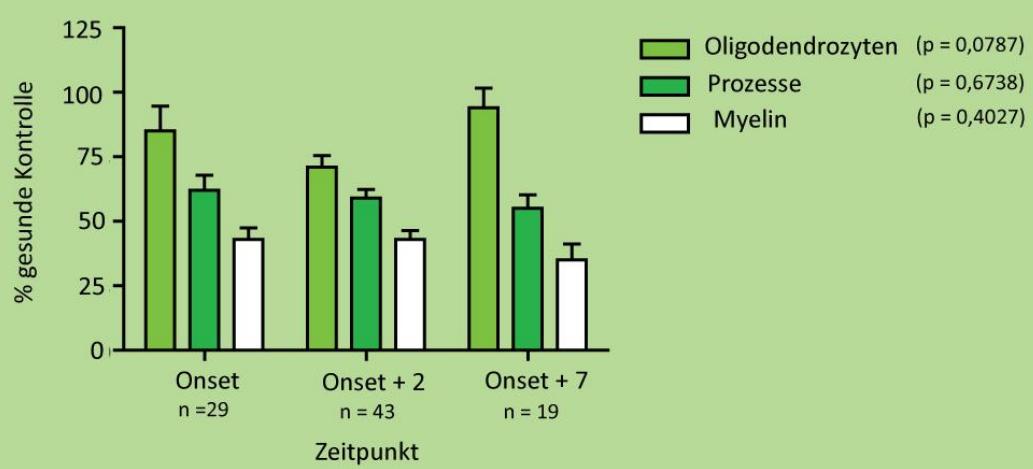
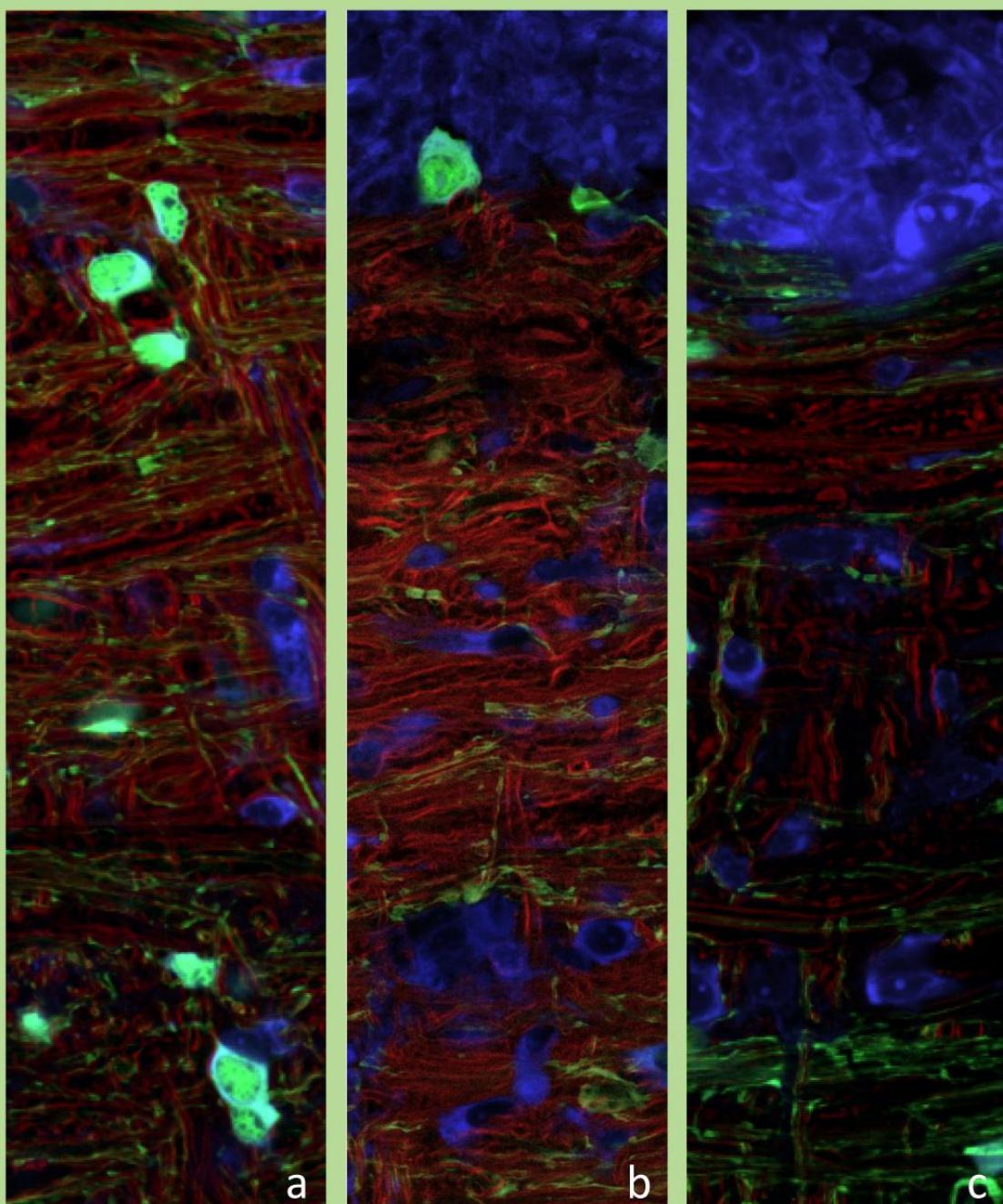


Abb. 13 Gewebeschädigung in Abhängigkeit vom Erkrankungszeitpunkt.

Oben: Konfokale Aufnahmen immunhistochemisch aufbereitenden Rückenmarks. Pseudorote Linien stellen mit FluoroMyelin angefärbtes Myelin dar, pseudogrüne Linien und Zellkörper sind GFP-positive Oligodendrozyten mit ihren Fortsätzen. Blau stellen sich mit Neurotrace (440 nm) angefärbte Zellkerne dar, welche die Infiltrationsdichte in Läsionen aufzeigen sollen: (a) gesunde Kontrolle (b) "Onset + 2", (c) "Onset + 7".

Unten: Zu drei verschiedenen Zeitpunkten ("Onset", "Onset + 2", "Onset + 7") werden die verschiedenen Zellkompartimente quantifiziert. Zu beobachten ist die einheitliche Sequenz Oligodendrozyten > Prozesse > Myelin zu allen drei Zeitpunkten, sowie der steigende, wenn auch nicht signifikante, Substanzerlust aller Komponenten in den gewählten Läsionsausschnitten im zeitlichen Verlauf. Wir vermuten, dass angesichts einer Zunahme der Läsionsgröße im zeitlichen Verlauf auch die absolute Anzahl der geschädigten Oligodendrozyten zunimmt. Zum Zeitpunkt "Onset + 7" verzeichnen wir einen Wiederanstieg der Oligodendrozyten, welchen wir zum Anlass nehmen, Untersuchungen über einen längeren Zeitraum im Rahmen eines chronischen Modells anzustellen (siehe **Kapitel 4.2**). Für die statistische Auswertung wurde ein 3-Gruppenvergleich im Rahmen eines f-Testes durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Anzahl n repräsentiert die Anzahl der Bildstapel bei 3 bzw. 2 Tieren pro Gruppe (siehe **4.1.3**).

4.1.4 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte

Während ich im vorangegangenen Abschnitt die Veränderungen von Myelin, Oligodendrozyten und ihren Fortsätzen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Auftreten erster klinischer Krankheitszeichen dargestellt habe, haben wir des Weiteren die Abhängigkeit der Oligodendrozytenschädigung vom Ausmaß der Entzündung analysiert. Da die Entzündung mit hoher Wahrscheinlichkeit einen wesentlichen Beitrag zur Gewebsschädigung leistet, haben wir den Verlust der einzelnen Zellkomponenten in Abhängigkeit vom Ausmaß der entzündlichen Infiltration (gemessen als Dichte NT-positiver Zellen) ausgewertet (siehe **Abb. 14**).

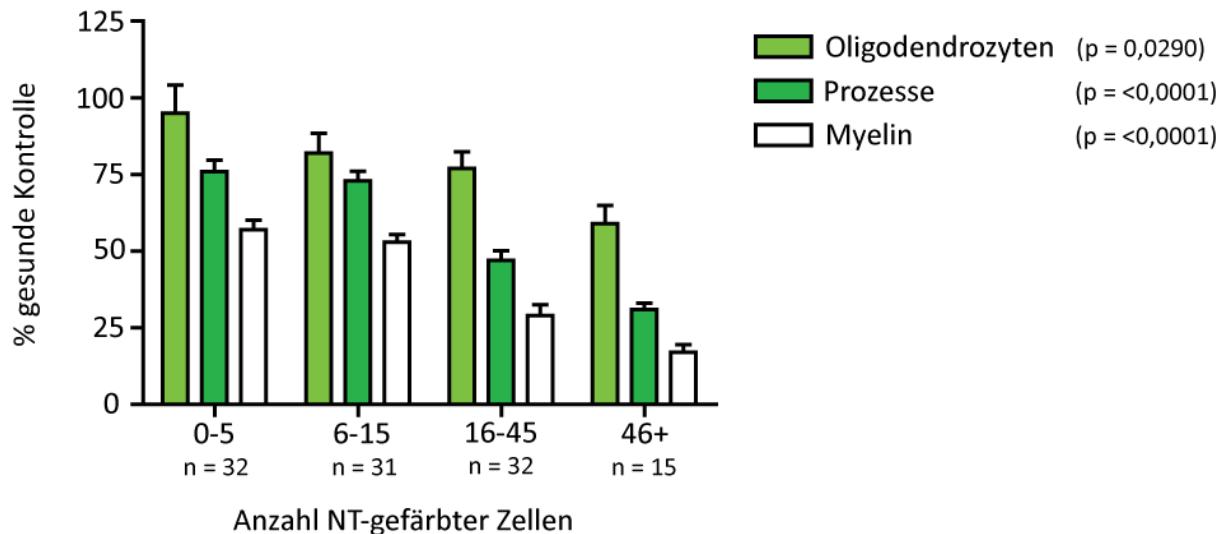


Abb. 14 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte. Die drei quantifizierten Zellkompartimente Zellkörper, Fortsätze und Myelin sind in Abhängigkeit der Dichte infiltrierter Zellen aufgetragen. Zu beobachten ist: (1) Mit steigender Infiltrationsdichte geht zunehmender Substanzerlust aller drei Kompartimente einher. (2) In jedem Infiltrationsstadium ist das Myelin am stärksten in seiner Substanz geschädigt, gefolgt von den Oligodendrozytenfortsätzen. Der Verlust an Zellkörpern ist am geringsten ausgeprägt. Für die statistische Auswertung des Vergleichs der vier Gruppen (0-5; 6-15; 16-45; 46+ NT-gefärbte Zellen) wurde ein f-Test durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die Anzahl n repräsentiert die komplette Anzahl der Bildstapel jeder Gruppe bei 3 bzw. 2 Tieren pro Gruppe (siehe 4.1.3).

Diese Auswertung ergibt die folgenden Schlussfolgerungen: (1) mit zunehmender Infiltrationsdichte nimmt das Ausmaß der Oligodendrozytenschädigung zu; (2) unabhängig vom Ausmaß der Infiltration kann man dieselbe Sequenz beobachten, welche schon im ersten Abschnitt deutlich wurde: der Myelinverlust ist deutlich ausgeprägter als der Verlust von Prozessen oder Oligodendrozytenzellkörpern. In Bereichen mit geringer Infiltration (0-5 Zellen/Bild) beträgt der Verlust an Myelin 43%, bei einer Reduktion der Oligodendrozytenfortsätze um 24% und einem Verlust an Oligodendrozyten von nur 5%. Mit steigenden Entzündungszellzahlen sinkt die Anzahl an Oligodendrozyten von 95% (SD=52) bei 0-5 NT-Zellen/Bild über 82% (SD=36) bei 6-15 NT-Zellen/Bild und 77% (SD=31) bei 16-45 NT-Zellen/Bild auf 59% (SD=23) des Kontrollwertes bei über 46 NT-Zellen/Bild. Dahingegen ist die Länge ihrer Prozesse im hochentzündlichen Stadium (>46 NT-Zellen/Bild) um über zwei Drittel auf 31% (SD=8) des Ausgangswertes gefallen. Die Myelindichte fällt mit steigender Inflammation noch drastischer, auf 57% (SD=18) des Kontrollwertes bei geringster und 17% (SD=10) bei stärkster Entzündung, ab.

Die oben aufgeführten Daten beziehen sich jeweils auf die gesamte Läsion mit dem angrenzenden Übergangs- und Randbereich. Um das maximale Ausmaß der Oligodendrozytenschädigung zu untersuchen, beschränken wir uns nachfolgend ausschließlich auf das Läsionszentrum, welches sich im Gesichtsfeld des zentralen, ersten Bildstapels der Läsion präsentiert (siehe Kapitel 3.2.1.4). In Abhängigkeit von der Dichte NT-positiver Zellen als mikroskopisches Korrelat für das entzündliche Geschehen ergeben sich folgende Zahlen für die untersuchten Komponenten Myelin, Oligodendrozytenzellkörper und -fortsätze im Zentrum der Läsion (Bildstapel 1):

Abb. 15 Gewebeschädigung im Zentrum der Läsion

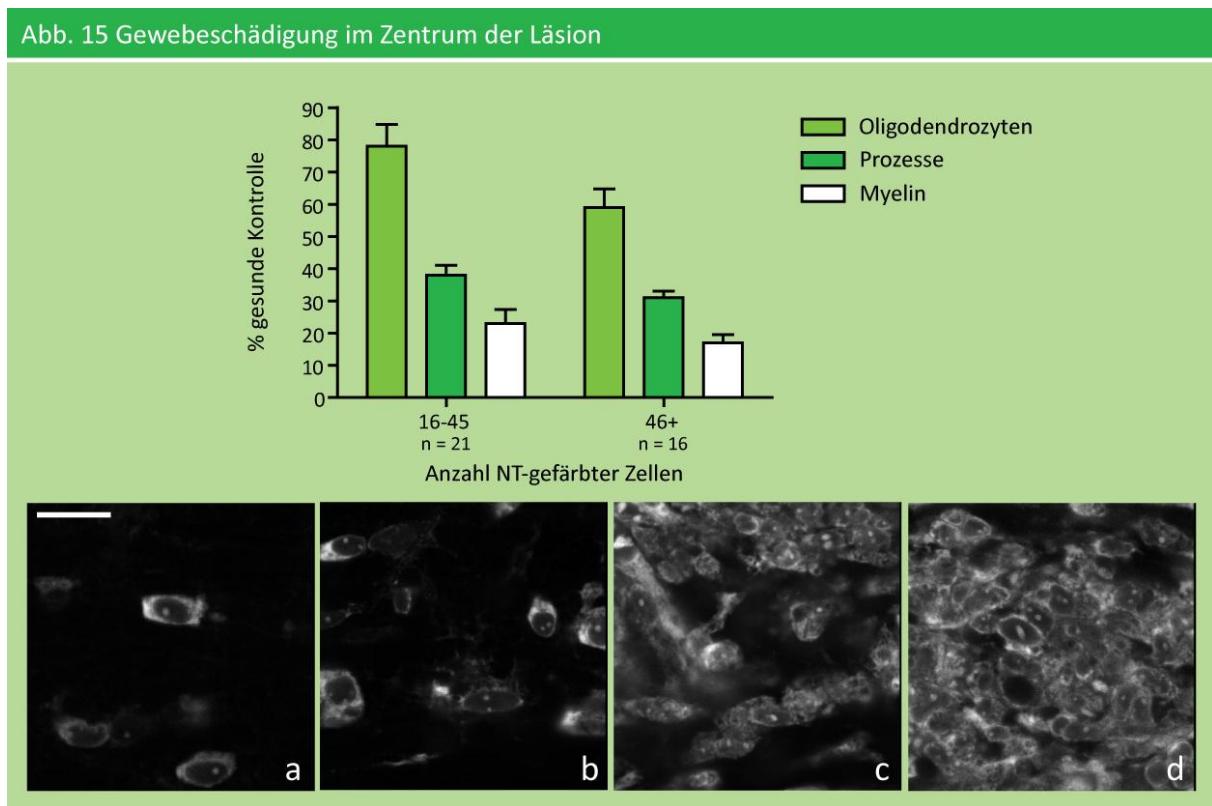


Abb. 15 Oligodendrozytenschädigung im Zentrum der Läsion. Oben: Im Zentrum der Läsionen werden ausschließlich Infiltrationsstadien von über 15 Zellen/Bild (16-45; 46+ NT gefärbte Zellen) beobachtet. Der zunehmende Substanzerlust und dessen Sequenz (Myelinverlust > Prozessverlust > Oligodendrozytenzellkörperverlust) ist vergleichbar mit den Zahlen, die wir auch in der Auswertung der gesamten Läsion erheben konnten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die Anzahl n repräsentiert die komplette Anzahl der Bildstapel jeder Gruppe bei 3 bzw. 2 Tieren pro Gruppe (siehe 4.1.3). Unten: Konfokale Aufnahmen Neurotrace-markierter Zellen (grau) in unterschiedlicher Dichte. (a) 0-5 Zellen/Bild, (b) 6-15 Zellen/Bild, (c) 16-45 Zellen/Bild, (d) 46 und mehr NT-markierte Zellen/Bild. Die Länge des weißen Balkens in (a) beträgt 5 µm.

Im Läsionszentrum ist der Verlust der drei Gewebskomponenten unterschiedlich stark ausgeprägt. Es besteht dabei ein direkter Zusammenhang mit dem quantifizierten Ausmaß an Entzündung im unmittelbaren Umfeld. Mit zunehmender Anzahl an infiltrierten Entzündungszellen nehmen die Gesamtlängen an Myelin und Prozessen sowie die Anzahl an Oligodendrozyten kontinuierlich ab. Im Läsionszentrum können erwartungsgemäß über die Dauer des untersuchten Zeitraums ("Onset" bis "Onset + 7") ausschließlich Infiltrationsdichten von > 15 Zellen pro Bild eines Bildstapels ausgemacht werden. Die Sequenz der Schädigung entspricht dabei der, die wir auch in den vorangegangenen Untersuchungen beobachten konnten. Bei starker entzündlicher Aktivität (16-45 Zellen/Bild) beträgt die Anzahl der Oligodendrozyten noch 78% (SD=31) des Kontrollwertes, während in Läsionszentren mit sehr starker entzündlicher Aktivität (>46 Zellen/Bild) nur noch 59% (SD=23) der Oligodendrozyten vorhanden sind. Der Verlust an Prozessen beträgt in Zentren mit starker Entzündung 62% und steigt in Zentren mit sehr starkem entzündlichem Geschehen auf 69%. Das Myelin stellt auch im Läsionszentrum die am stärksten geschädigte Komponente dar, mit Werten von 23% (SD=20) bzw. 17% (SD=10) des Kontrollwertes in den Bereichen mit hoher bzw. sehr hoher entzündlicher Infiltration.

4.1.5 Rekonstruktion einzelner Oligodendrozyten

Die Injektion modifizierter Tollwutviren vom Typ SAD ΔG [85] in das Rückenmark führt zur fluoreszenten Markierung einzelner Neurone und Gliazellen. Die Injektion des Virus in gesunde und EAE-immunisierte PLP-GFP Mäuse ermöglichte uns die Doppelfärbung einzelner GFP-positiver Oligodendrozyten mit einem zweiten, spektral unterschiedlichen Farbstoff (*cherry red*, siehe 3.2.2.2). Die Virusinjektion ist notwendig, da die Dichte der GFP-positiven Oligodendrozyten in den PLP-GFP Mäusen zu hoch für die Rekonstruktion einzelner Zellen und ihrer Fortsätze ist. Die Virusinjektion hingegen erreicht nur einzelne Zellen, von denen ein Teil durch GFP-Expression als Oligodendrozyten erkennbar wird. Einzelne GFP und *cherry red* doppelt-positive Zellen wurden einschließlich ihrer Fortsätze mit hochauflöster konfokaler Mikroskopie dokumentiert. Nach der Anfertigung von Projektionen, welche die dreidimensionale Zellgestalt auf eine zweidimensionale Fläche reduzierten (*Image J*), konnten die Zellkörper und ihre Fortsätze rekonstruiert werden. Im direkten Vergleich zeigt **Abb. 16** drei Kontroll-Oligodendrozyten sowie drei Oligodendrozyten aus EAE Läsionen zum Zeitpunkt "Onset + 2". Exemplarisch kann hier gezeigt werden, dass

sich gesunde Oligodendrozyten und Oligodendrozyten in EAE Läsionen deutlich in ihrer Morphologie unterscheiden. Die Untersuchung auf Einzelzellebene unterstützt die Ergebnisse aus dem akuten Quantifikations-Modell und lässt die Hypothese zu, dass im EAE Modell bei (noch) intaktem Zellkörper die Anzahl der Zellfortsätze, sowie deren Verzweigungen und Längen abnehmen.

Abb. 16 Rekonstruktion gesunder und EAE-Oligodendrozyten

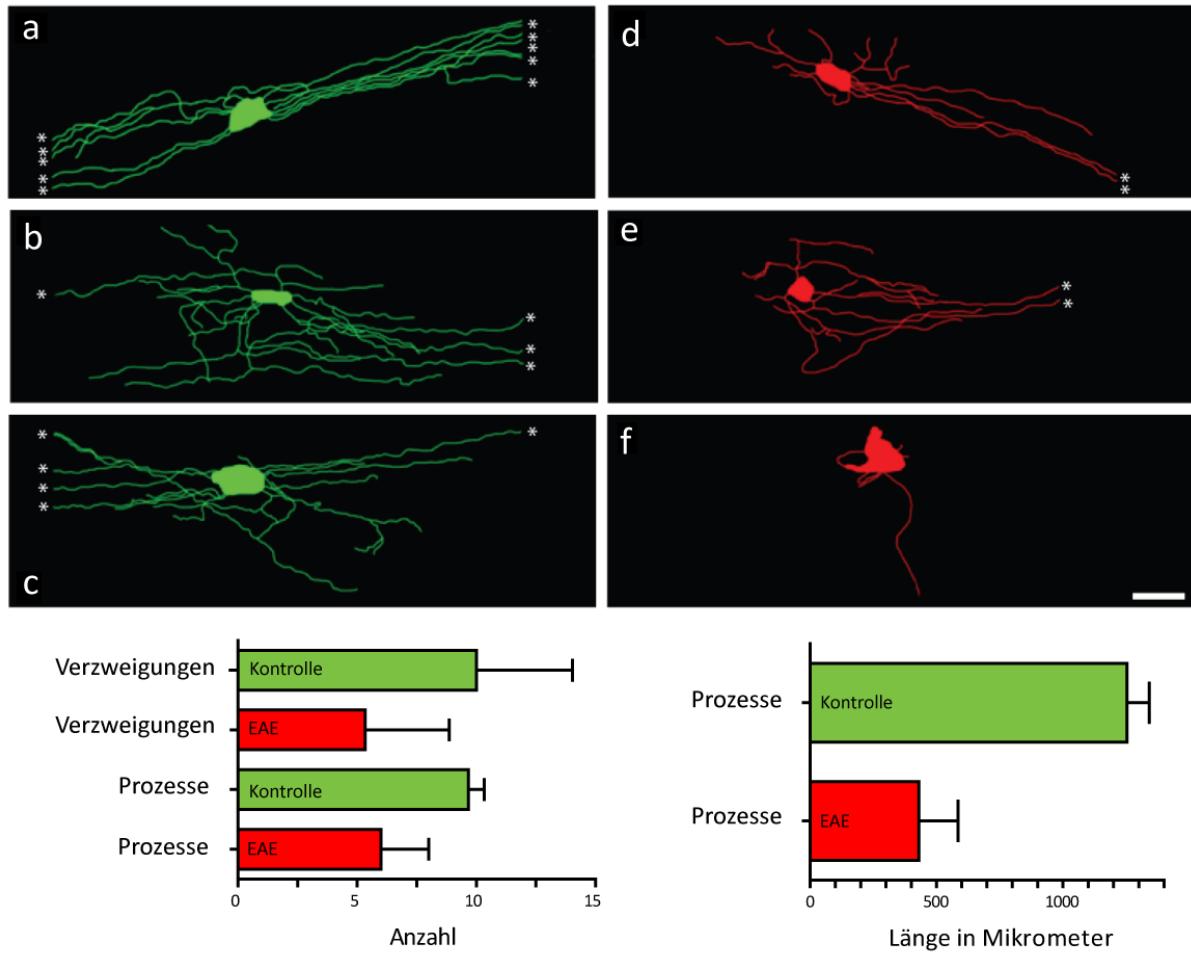


Abb. 16 Rekonstruktion von Oligodendrozytenzellkörpern inklusive ihrer Fortsätze. Oben: Rekonstruktion dreier pseudogrün-gefärbter Oligodendrozyten aus Kontrollgewebe (a, b, c) und Rekonstruktion dreier pseudorot-gefärbter Oligodendrozyten, welche zum Zeitpunkt "Onset + 2" innerhalb einer Läsion lokalisiert sind (d, e, f). Der weiße Balken in (f) entspricht 5 μm . Sternchen (*) zeigen Fortsätze an, die durch die Wahl des Objektivs (60x, 1-facher Zoom) artifiziell limitiert wurden. Unten: Die Graphen verdeutlichen exemplarisch die Unterschiede in der Anzahl von Prozessen beziehungsweise deren Verzweigungen (links), sowie den Unterschied im Hinblick auf die Gesamtlängen der Prozesse eines gesunden bzw. kranken Zellkörpers (rechts).

4.2 Chronisches Modell zur Remyelinisierung

4.2.1 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit vom Erkrankungszeitpunkt

Um zu untersuchen, welches Schädigungsmuster Oligodendrozyten im chronischen Krankheitsverlauf zeigen und wie gegebenenfalls die Schädigung kompensiert werden kann, haben wir die Oligodendrozytenpathologie in einem chronischen EAE-Tiermodell untersucht. Diese kann in Biozzi ABH Mäusen (insgesamt 8 Tiere; 2 Tiere als Referenz "Gesunde Kontrolle", 3 Tiere zum Zeitpunkt "Onset +2", 3 Tiere zum Zeitpunkt "Onset + 84") durch Immunisierung mit MOG induziert werden [86]. Analysiert wurde dafür ein akuter Zeitpunkt "Onset + 2" und ein späterer Zeitpunkt "Onset + 84". Der Zeitpunkt "Onset + 2" dient dazu, einen Vergleich zum akuten Tiermodell herstellen zu können und um einen Ausgangswert in Bezug auf die weitere Entwicklung zu haben. Der zweite Zeitpunkt des Modells beschreibt den chronischen Status 84 Tage nach der Immunisierung. Wie aus **Abb. 17** (siehe unten) ersichtlich wird, ist bereits zum Zeitpunkt "Onset + 2" eine Abnahme aller drei untersuchten Gewebskomponenten zu verzeichnen. Dabei ist die Abnahme an Myelin größer als der Verlust an Prozessen beziehungsweise Oligodendrozyten. Am Tag "Onset + 2" beträgt die Dichte an Oligodendrozyten 89% (SD=48) des gesunden Kontrollwertes, wohingegen der Anteil an Prozessen nur noch 69% (SD=27) und der Anteil an Myelin 55% (SD=22) des Kontrollwertes betragen. Diese Zahlen beziehen sich dabei auf die gesamte Läsion einschließlich ihres Randbereichs.

Zum späteren Zeitpunkt "Onset + 84" können drei Beobachtungen gemacht werden, welche sich ebenfalls auf das gesamte Läsionsareal beziehen:

- (1) Im chronischen Stadium entspricht die Sequenz der Oligodendrozytenschädigung weiterhin der bereits zu "Onset + 2" beobachteten Abfolge: der Anteil an Myelin ist stärker verringert als der Anteil an Prozessen und der Anteil an Prozessen wiederum stärker verringert als der an Oligodendrozyten.
- (2) Zum Zeitpunkt "Onset + 84" kann man eine ausgeprägte Zunahme an Oligodendrozyten verzeichnen. Bezogen auf die gesunde Kontrolle beträgt die Dichte an Oligodendrozyten am Tag 85 278% (SD=130).
- (3) Im direkten Vergleich zwischen "Onset + 2" und "Onset + 84" fällt der prozentuale Anteil an Myelin im Verlauf um weitere 14%. Trotz dramatisch steigender Oligodendrozyten-Zellzahl ist daher keine Zunahme an Myelin, sondern eine Stagnation oder sogar eine

weitere Abnahme zu beobachten. Die Oligodendrozytenfortsätze verändern sich im zeitlichen Verlauf zwischen "Onset + 2" und "Onset + 84" nicht wesentlich.

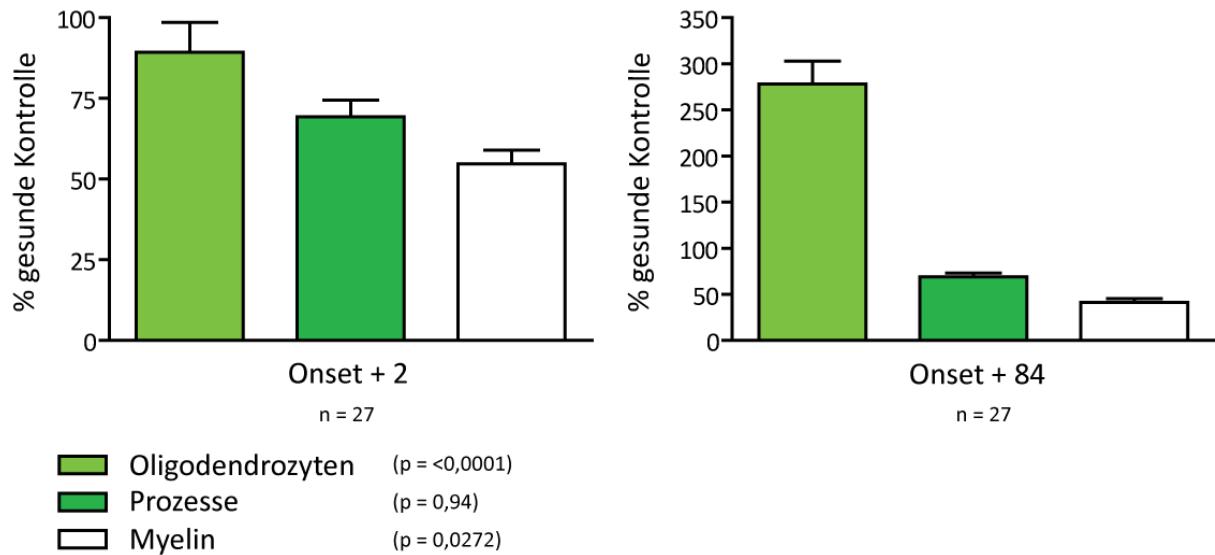


Abb. 17 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt. Zu einem akuten Zeitpunkt "Onset + 2" (links) und einem chronischen Zeitpunkt "Onset + 84" (rechts) wurden die oligodendrozytären Kompartimente (Zellkörper, Prozesse und Myelin) quantifiziert. Die Prozentangaben beziehen sich dabei auf Werte, die in der Analyse von Kontrollgewebe gewonnen wurden. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen beider Graphen. Für die statistische Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die Anzahl n repräsentiert die komplette Anzahl der Bildstapel einer Gruppe (9 Bildstapel pro Tier, bei 3 Tieren pro Gruppe, siehe 4.2.1).

Um den starken Anstieg von Oligodendrozytenzellkörpern genauer zu beschreiben, wurde im Folgenden die Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von ihrer Position innerhalb einer Läsion untersucht.

4.2.2 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Lage innerhalb einer Läsion

Für die Läsionen wurde durch die Scan-Methode (siehe 3.2.1.4) ein zentraler Läsionsbereich, sowie eine Marginalzone definiert. Dies ermöglicht eine differenziertere Darstellung des Gewebszustandes in Abhängigkeit von der Lokalisation der auszuwertenden Bilder innerhalb der Läsion. Unabhängig von der Lokalisation wird in diesem Teil der Quantifikation weiterhin

zwischen einem akuten Zeitpunkt "Onset + 2" und dem chronischen Zeitpunkt "Onset + 84" unterschieden. Einen Überblick über die Ergebnisse liefert **Abb. 18**.

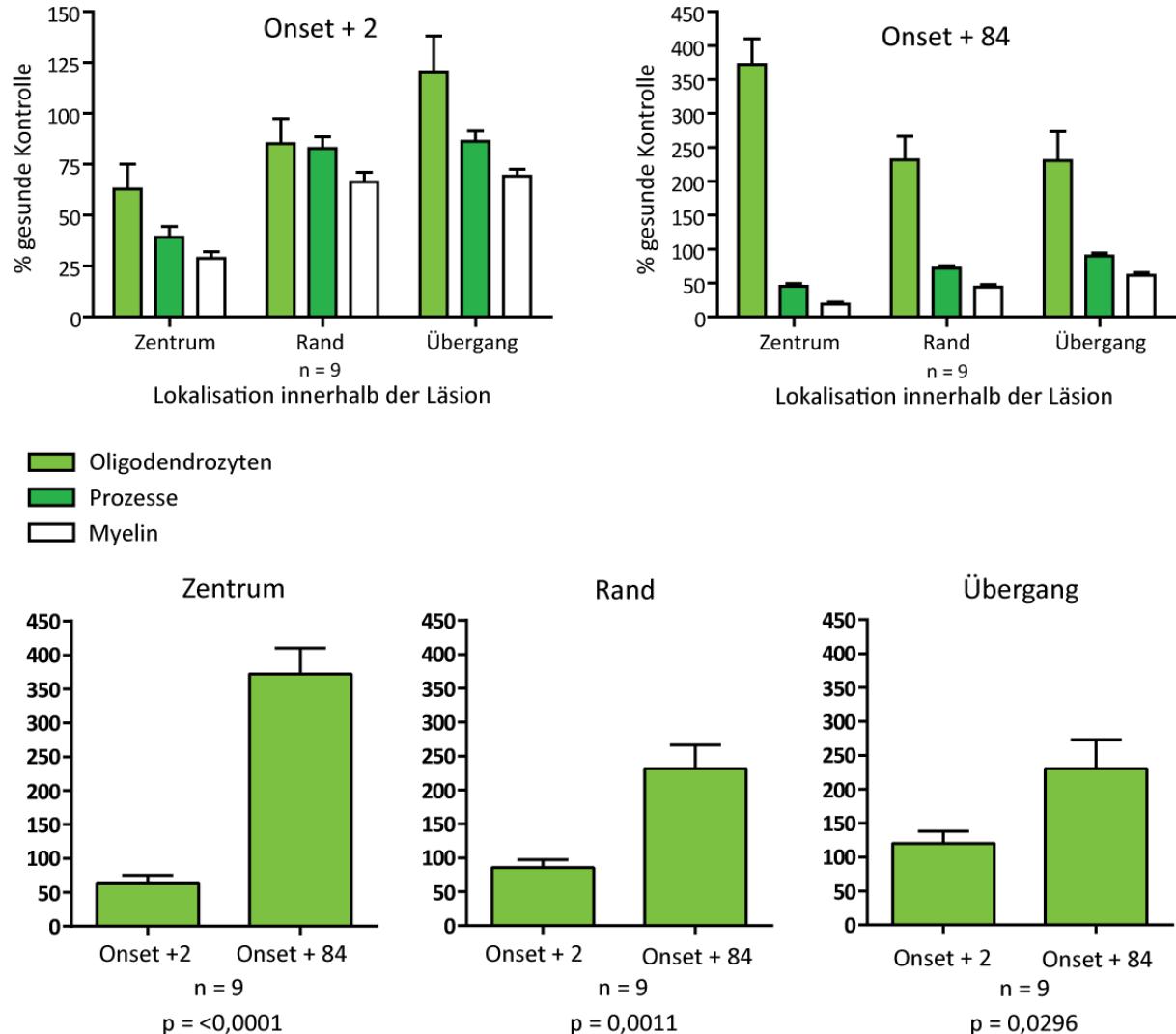


Abb. 18 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Lage innerhalb einer Läsion. Links oben: Akuter Zeitpunkt "Onset + 2". Rechts oben: Chronischer Zeitpunkt "Onset + 84". Das Zentrum der Läsion wird von Bildstapel 1 erfasst (siehe Scan-Methode Kapitel 3.2.1.4), der Randbereich wird durch Bildstapel 2, welcher sich direkt neben Bildstapel 1 befindet, erfasst, und die Übergangszone der Läsion stellt Bildstapel 3 dar. Unten: Oligodendrozytenanzahl zu "Onset + 2" verglichen mit "Onset + 84" jeweils für das Zentrum, den Rand und den Übergang. Die Prozentangaben beziehen sich auf Werte, die anhand einer gesunden Kontrollgruppe erhoben wurden. Für die statistische Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an, die Anzahl n repräsentiert die komplette Anzahl der Bildstapel einer Gruppe (9 Bildstapel pro Tier, bei 3 Tieren pro Gruppe, siehe 4.2.1).

Abb. 18 zeigt eine eindeutige Sequenz der Schädigung: Über alle Lokalisationen hinweg ist der Myelinverlust deutlich ausgeprägter als der Verlust oligodendrozytärer Fortsätze bzw. Zellkörper. Im Zentrum der Läsion ist der Substanzverlust dabei besonders hoch. Bei der Auswertung des akuten Zeitpunktes "*Onset + 2*" sind die Oligodendrozyten durchschnittlich um 37% vermindert, die Prozesse hingegen bereits um 61% und das Myelin gar um 71%. Im Randbereich der Läsion und im Übergangsbereich zu gesundem Gewebe fällt die Schädigung geringer aus. Während das Myelin hier um 34% (Rand) bzw. 31% (Übergang) vermindert ist, liegt der Anteil an Prozessen 17% bzw. 14% unter den Werten einer entsprechenden Kontrollgruppe. Insgesamt ist eine negative Korrelation zwischen zunehmendem Abstand vom Läsionszentrum und dem Ausmaß der Schädigung zu beobachten. Die Gewebsschädigung ist demzufolge umso größer, je zentraler der Bildstapel orientiert liegt. Interessanterweise findet man im äußeren Randbereich jedoch bereits zum akuten Zeitpunkt 20% (SD=54) mehr Oligodendrozyten als in der gesunden Kontrolle.

Für den chronischen Zeitpunkt "*Onset + 84*" muss zur Darstellung der Ergebnisse eine breitere Skalierung angesetzt werden. Mit zunehmender Orientierung zum Zentrum der Läsion steigt die Anzahl an Oligodendrozyten von durchschnittlich 231% (SD=128) in der Außenzone auf 372% (SD=113) im Zentrum der Läsion. Dies lässt auf eine massive Infiltration und/oder Proliferation von Oligodendrozyten bzw. deren Vorläuferzellen schließen. Verglichen mit dieser massiven Zunahme an Zellkörpern ist es bemerkenswert, dass keine Zunahme der Oligodendrozytenfortsätze zu beobachten ist. Die Gesamtlänge der Oligodendrozytenfortsätze beträgt im Übergangsbereich 90% (SD=14) der Kontrolle, sinkt dann auf 72% (SD=11) im Randbereich und fällt auf ein Minimum von 45 % (SD=12) im Zentrum der Läsion. Damit ist der Anteil an Prozessen bei steigender Zellzahl nicht nur nicht stagniert, sondern im Vergleich zum akuten Zeitpunkt sogar noch weiter gefallen. Für das Myelin ergibt sich ein ähnliches Bild. Der Anteil an Myelin fällt mit Annäherung an das Zentrum von 61% (SD=12) über 44% (SD=11) auf 19% (SD=9) der Kontrolle und liegt damit ebenfalls unter den entsprechenden Werten für den akuten Zeitpunkt ("*Onset + 2*").

Mögliche Ursachen für die massive Zunahme von Zellkörpern bei geringen und weiter abnehmenden Werten für die Prozesse und das Myelin sollen in der Diskussion näher erörtert werden.

4.2.3 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte

Abb. 19 veranschaulicht den Zustand und die Entwicklung der Oligodendrozyten-Kompartimente im Hinblick auf die Infiltrationsdichte zum akuten Zeitpunkt "*Onset + 2*" und zum chronischen Zeitpunkt "*Onset + 84*". Der akute Zeitpunkt wird im chronischen Modell ausgewertet, um einen Vergleich zu "*Onset + 84*" herstellen zu können. Anhand der infiltrierten Zellen werden unterschiedliche "Entzündungsstadien" definiert: 0-5 Zellen/Bild entspricht geringer entzündlicher Infiltration, 6-15 Zellen/Bild entspricht mittlerer entzündlicher Infiltration, 16-45 Zellen/Bild starker und über 46 Zellen/Bild sehr starker entzündlicher Infiltration.

Zu beobachten ist, dass zum akuten Zeitpunkt, mit steigender Infiltrationsdichte, das Ausmaß der Oligodendrozytenschädigung zunimmt. Im Stadium geringer Entzündung sind durchschnittlich noch 100% (SD=71) der Oligodendrozyten (bezogen auf den Referenzwert der gesunden Kontrolle) vorhanden. Die Gesamtlänge der Prozesse beträgt in diesem Stadium 86% (SD=9) und die Länge an Myelin 80% (SD=4). Bei starker Entzündung beträgt der Oligodendrozytenverlust immer noch nur 10% und steigt erst bei sehr starker Entzündung sprunghaft auf 50% an. Mit den Gesamtlängen an Prozessen bzw. Myelin verhält es sich wie bereits im akuten Modell beobachtet: die Dichte an Prozessen sinkt im Stadium starker bzw. sehr starker Infiltrationsdichte auf 55% (SD=23) bzw. 38% (SD=18), die Dichte an Myelin fällt auf 41% (SD=12) bzw. 27% (SD=10) der gesunden Kontrolle.

Grundsätzlich ist in jedem Entzündungsstadium die gleiche Sequenz zu verzeichnen: die Zellkörper werden weniger stark geschädigt als die peripheren Zellkompartimente (Prozesse und Myelin).

Zum chronischen Zeitpunkt "*Onset + 84*" bietet sich augenscheinlich ein völlig anderes Bild:

- (1) Zunächst ist anzumerken, dass 84 Tage nach Immunisierung selbst im Läsionszentrum keine sehr hohe entzündliche Infiltration (>46 Zellen/Bild) mehr auszumachen ist.
- (2) Weiterhin kann beobachtet werden, dass in jedem Stadium nach wie vor die Gesamtlänge an Myelin stärker reduziert ist, als die Gesamtlänge an Fortsätzen oder die Anzahl an Oligodendrozyten. Durchschnittlich beträgt die Differenz zwischen Prozessen und Myelin relativ konstant 25%.
- (3) Die Differenz zwischen Oligodendrozyten und Prozessen bzw. Oligodendrozyten und Myelin hingegen ist in Abhängigkeit vom Ausmaß der Entzündung deutlich variabler. Zum Zeitpunkt "*Onset + 84*" steigt die Anzahl der Oligodendrozyten mit zunehmender

Entzündungsaktivität drastisch an: Bei geringer Entzündung (0-5 Zellen/Bild) werden unter Bezugnahme auf die Kontrolle 226% (SD=115) mehr Oligodendrozyten quantifiziert. Bei mittlerer Entzündung (6-15 Zellen/Bild) sind es schon 319% (SD=116) und bei starker Entzündung (16-45 Zellen/Bild) 417% (SD=128). Während also Myelin und Prozesse mit zunehmender Infiltrationsdichte immer mehr geschädigt werden, steigt gleichzeitig die Anzahl an Oligodendrozytenzellkörpern.

Abb. 19 Oligodendrozyten in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte

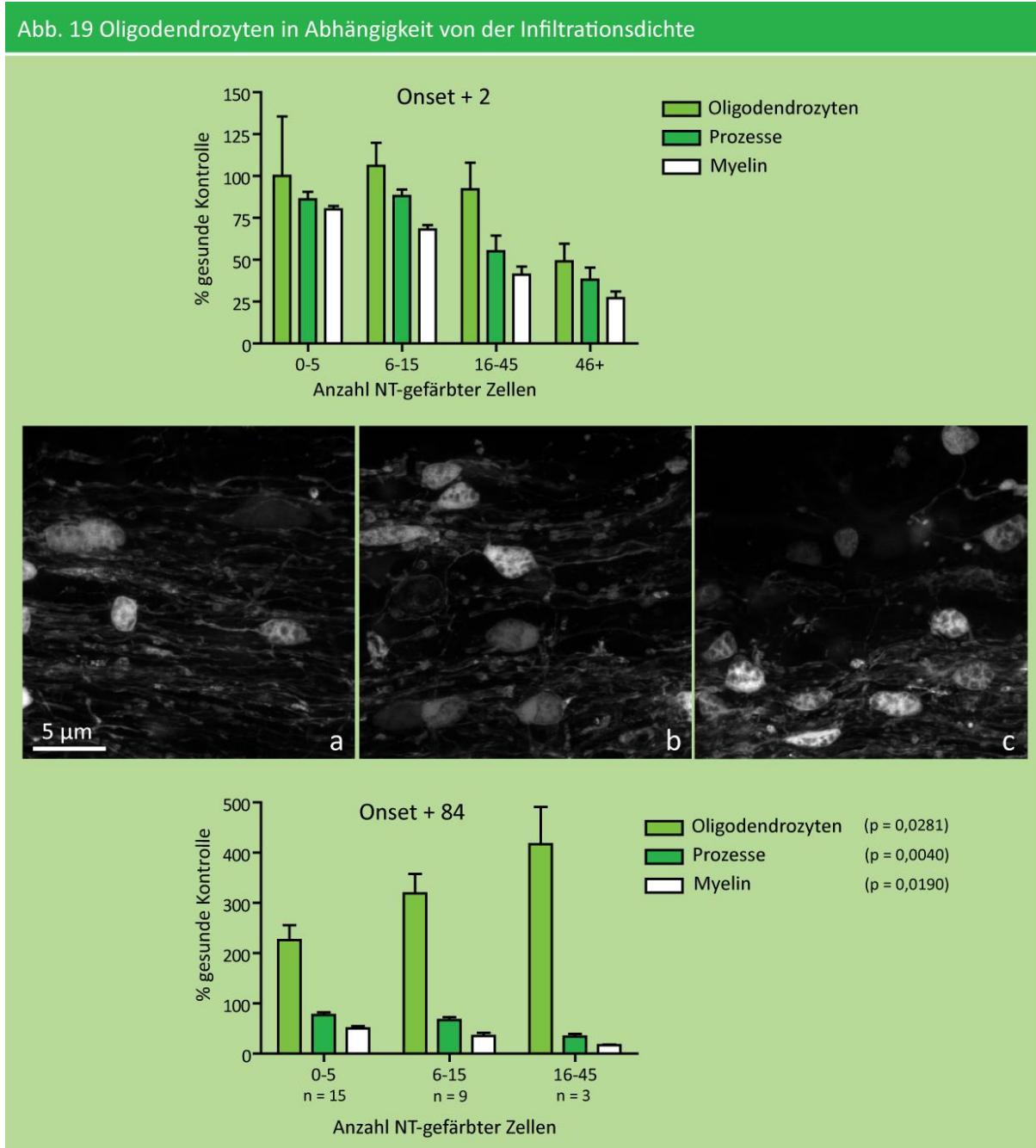


Abb. 19 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte. Beide Graphen quantifizieren die Zellkompartimente Myelin, Prozesse und Zellkörper in Abhängigkeit von der Dichte NeuroTrace (NT)-markierter Zellkerne als Korrelat für Entzündungsaktivität. **Oben:** Graph "Onset + 2". Mit

steigender Anzahl NT-gefärbter Zellkerne nimmt der Substanzverlust zu (Verlust von Myelin > Verlust von Prozessen > Verlust von Oligodendrozytenzellkörpern). **Mitte:** Konfokale Bilder (60-fache Vergrößerung, 3-facher Zoom) zur Veranschaulichung der Oligodendrozytenzunahme zum Zeitpunkt "Onset + 84". Abgebildet ist nur der GFP-Kanal mit Oligodendrozytenzellkörpern (grau) und deren Fortsätzen (graue Linien). **(a)** 0-5 NT-gefärbte Zellen/Bild, **(b)** 6-15 NT-gefärbte Zellen/Bild, **(c)** 16-45 NT gefärbte Zellen/Bild. Die NT-gefärbten Zellen selbst stellen sich aufgrund eines unterschiedlichen Emissionsspektrums in einem anderen Kanal dar und sind hier nicht abgebildet. **Unten:** Graph "Onset + 84". Zu beachten ist der Wiederanstieg von Oligodendrozytenzellkörpern in Abhängigkeit von der Anzahl NT-gefärbter Zellen. Für die statistische Auswertung wurde ein f-Test durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die Anzahl n repräsentiert die komplette Anzahl der Bildstapel einer Gruppe.

4.3 Near-infrared Branding

4.3.1 Etablierung der Methode und ihre Möglichkeiten

Um die Genese der Oligodendrozytenpathologie besser zu verstehen, ist es erforderlich, sowohl Beobachtungen auf zellulärer Ebene anzustellen, als auch subzelluläre Vorgänge und zelluläre Interaktionen untereinander zu untersuchen. Die Lichtmikroskopie ermöglicht, dass wir das Verhalten von Zellen *in vivo* nachvollziehen können. Die Auflösungsfähigkeit des Lichtmikroskops bleibt dabei jedoch auf die Einzelzellebene beschränkt, wodurch wichtige subzelluläre Veränderungen verborgen bleiben. Um subzelluläre Strukturen untersuchen zu können, müsste das Gewebe zusätzlich elektronenmikroskopisch untersucht werden. Die Elektronenmikroskopie offenbart jedoch ebenfalls nur einen eingeschränkten Eindruck dessen, was sich tatsächlich im Gewebe abspielt, da sie keine dynamischen Informationen erheben kann. Ideal wäre es daher, lichtmikroskopische mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu korrelieren, um eine umfassende und detaillierte Einsicht in die Abläufe in Geweben zu bekommen.

Das Verfahren, welches von Derron Bishop, Ivana Nikic und Mary Brinkoetter zu diesem Zweck etabliert und von mir angewandt wurde, ist das "Near-infrared Branding" [87]. NIRB macht eine Korrelation zwischen Licht- und Elektronenmikroskopie in intaktem Gewebe verschiedener Herkunft möglich (siehe **Abb. 20 a, g, h**) und es ermöglicht, durch eine spezielle Scan-Methode Linien und Punkte gezielt in unmittelbarer Umgebung einer spezifischen Struktur zu setzen, ohne diese zu zerstören oder zu verändern [87]. In einer kurzen Skizze des Verfahrens werden die Durchführung und die Vorteile der Methode deutlich: Mit einem gepulsten Laser setzen wir bei einer Wellenlänge von 910 nm ganz

gezielt Linien-Scans und Punkt-Scans, so dass Rahmen-Markierungen um Strukturen besonderen Interesses entstehen. Die Stärke der Linie wird von der Laserstärke und der Anzahl an Laserdurchgängen beeinflusst und kann so individuell eingestellt werden (siehe **Abb. 20, d**). Die entstandenen Markierungen sind autofluoreszent und können darauf-folgend unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Nach selektiver Fotooxidation der NIRB-Markierung mit Diaminobenzidin (siehe **Abb. 20, f**) kann diese auch im Elektronenmikroskop aufgefunden werden, wobei gleichzeitig das Fluophor GFP der Mauslinie nicht oxidiert wird und sich GFP-positive Strukturen somit nicht verändern. Dabei ist im Besonderen die Mikrometerpräzision der Technik bemerkenswert, welche unter Verwendung eines Objektivs mit großer numerischer Apertur Markierungen zulässt, die bis zu 3-4 μm an die Struktur des Interesses herangesetzt werden, ohne dass man dabei unmittelbare Gefahr läuft, diese zu zerstören. Der gepulste Laser brennt Linien bzw. Punkte mit einer Tiefenausdehnung von circa 4 μm in das Gewebe, so dass eine dreidimensionale Markierung der Struktur möglich ist und Volumina von weniger als $70\mu\text{m}^3$ definiert werden können. Dieses geringe Volumen ermöglicht eine weitere Prozessierung des Gewebes innerhalb von Stunden und verspricht somit eine enorme zeitliche Effizienz.

Abb. 20 Definierte Markierungen durch NIRB

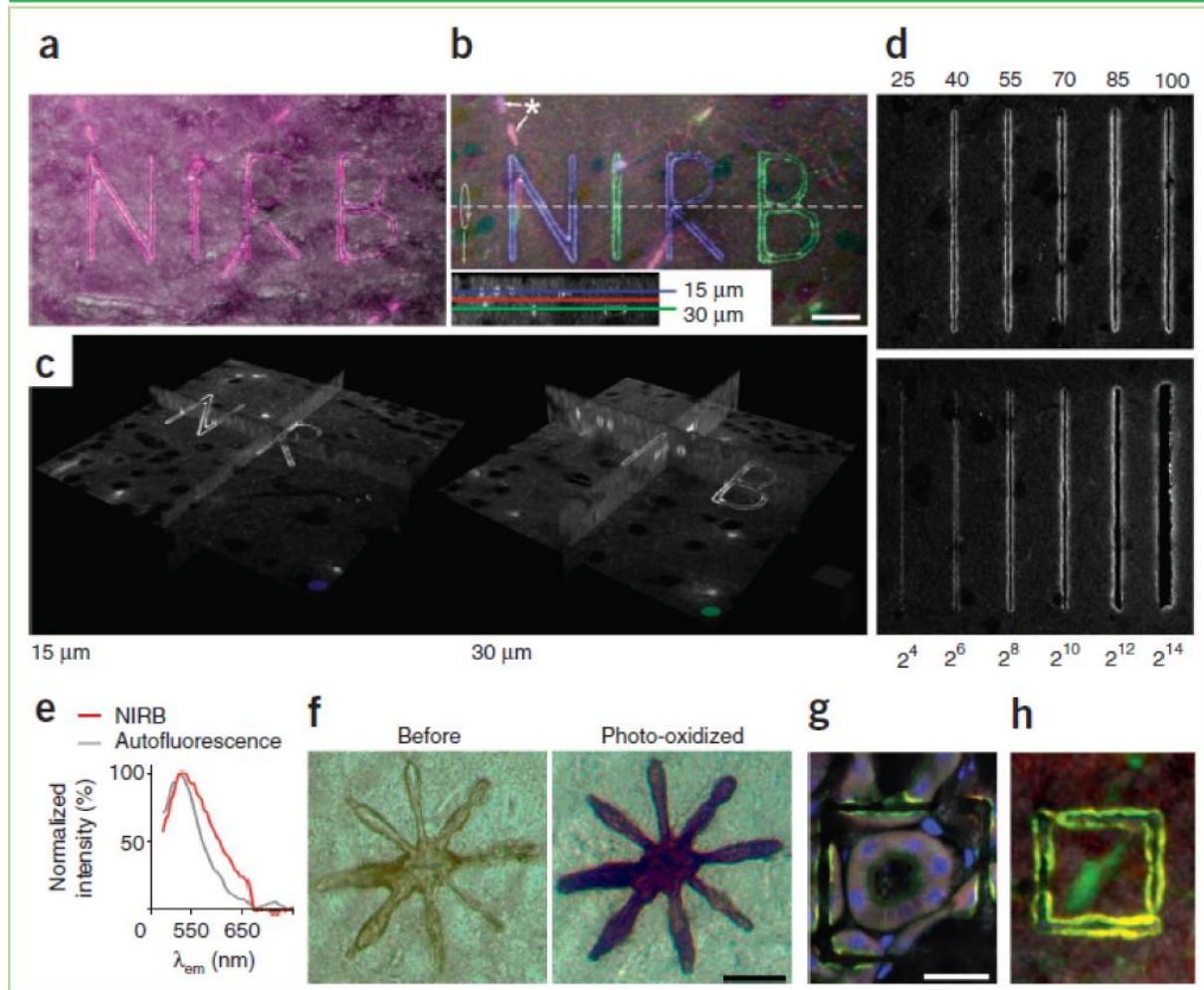


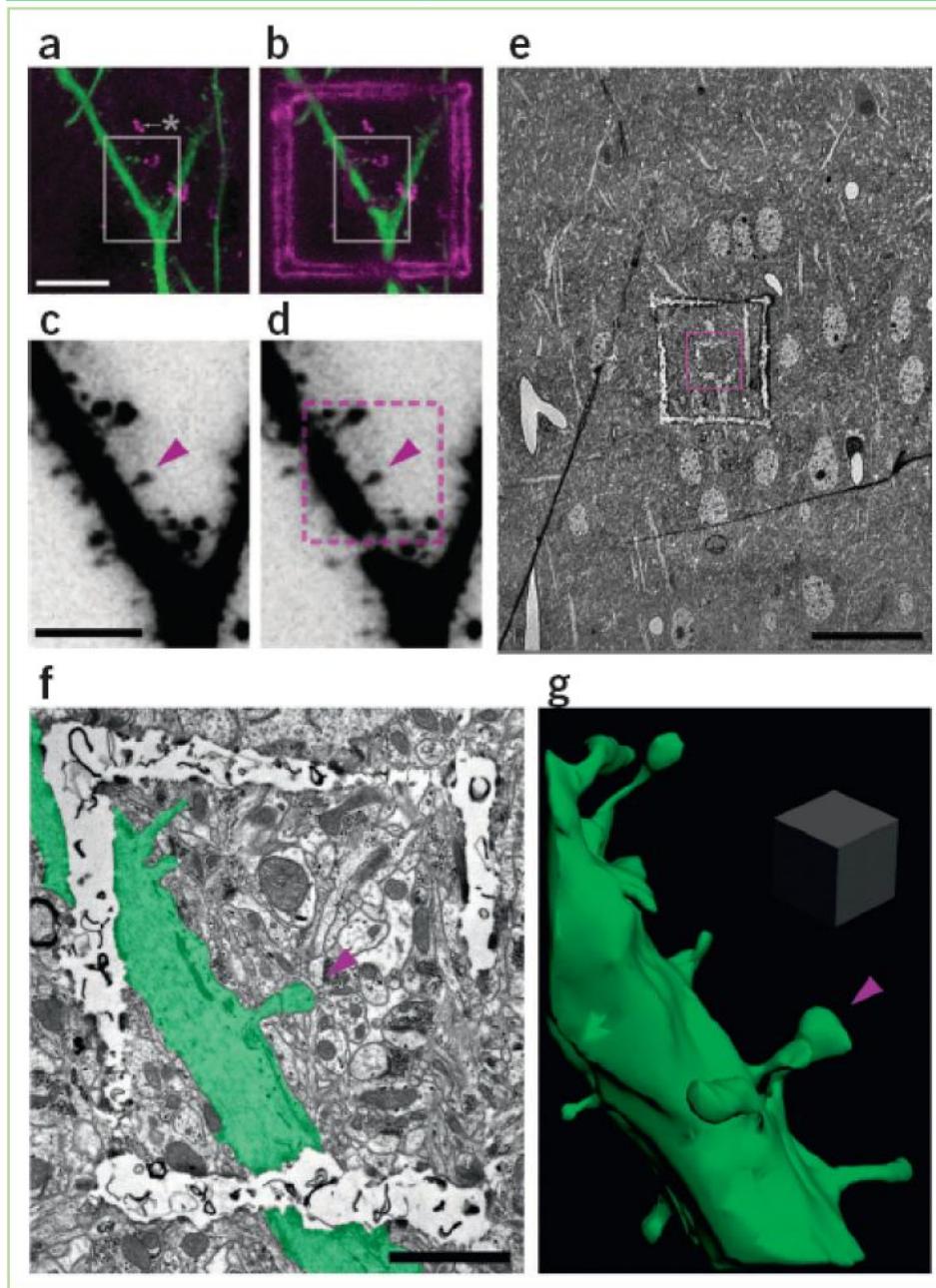
Abb. 20 Definierte Markierungen durch NIRB (Abb. übernommen aus [87]). (a-c) Zwei-Photonen Aufnahmen von NIRB Markierungen in Glutaraldehyd-fixierten Vibratorm-Schnitten von murinem zerebralem Kortex. Projektionen maximaler Intensität mit Überlagerung von Durchlicht-Aufnahme (Graustufen) und NIRB Fluoreszenz (Magenta). (a) Pseudogefärbte Projektion von drei Ebenen (x-z Projektion). (b) Die Buchstaben N und R wurden in einer Tiefe von 15 μm in das Gewebe gebrannt, wohingegen die Buchstaben I und B in einer Tiefe von 30 μm gebrannt wurden. Die rote Linie stellt eine mittlere Tiefe dar. Erythrozyten zeigen Auto-Fluoreszenz (Sternchen). (c) Die dreidimensionale Darstellung zeigt die Position der 15 μm tiefen Ebene (links) und der 30 μm tiefen Ebene (rechts). (d) Abbildungen von NIRB Markierungen, welche mit Linien-Scans ansteigender Laserstärke (oben) und ansteigender Anzahl von Laserdurchgängen (unten) gemacht wurden; Länge der Scanlinie 106 μm . (e) Fluoreszenz-Emissions-Spektrum der NIRB Markierungen verglichen mit der Autofluoreszenz des Gewebes nach Anregung mit einem 488-nm Laser (normalisierte Intensität). (f) Durchlicht-Aufnahmen einer NIRB Markierung vor (links) und nach (rechts) Fotooxidation mit Diaminobenzidin. (g, h) NIRB Markierungen eines Nierentubulus (g; Kern, blau) oder eines Makrophagen in einem Lymphknoten (h; GFP-markiert in einer Cx3cr1GFP/+ Maus, grün). Größenverhältnisse: Balken, 25 μm (a, b); 50 μm (f) und 25 μm (g, h).

4.3.2 Anwendung des NIRB: Re-Identifizierung und elektronenmikroskopische Rekonstruktion dendritischer Fortsätze

Um die neu etablierte NIRB-Technik auszutesten, wurden exemplarisch Fortsätze apikaler Dendriten von kortikalen Neuronen in transgenen Thy1GFPs-Mäusen re-identifiziert und rekonstruiert [87]. Zunächst wurden zur exakten Dokumentation der Zielstruktur niedrig- und hochauflöste konfokale Bildstapel von Dendriten und deren Fortsätzen in fixierten Vibratom-Schnitten angefertigt. Um die Struktur zu markieren, wurde zunächst ein größeres Kästchen oberhalb des dendritischen Fortsatzes und darauffolgend ein kleineres Kästchen im Niveau der Zielstruktur gebrannt (siehe **Abb. 21, a-d**). Die NIRB Markierungen wurden foto-oxidiert und das Gehirngewebe ausgeschnitten. Im Rahmen der Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie wurden halb-dünne Schnitte angefertigt, in welchen das größere Kästchen lichtmikroskopisch identifiziert wurde. Daraufhin wurde der Gewebsblock in ultra-dünne Scheiben geschnitten, welche unter dem Transmissions-Elektronenmikroskop konsekutiv untersucht wurden (siehe **Abb. 21, e und f**). In diesen ultra-dünnen Schnitten konnte das kleinere Kästchen mit der entsprechenden Zielstruktur ausfindig gemacht und darauffolgend der lichtmikroskopisch dokumentierte Zielfortsatz hochauflöst dreidimensional rekonstruiert werden.

Abb. 21 Near-infrared Branding dendritischer Fortsätze (Abb. übernommen aus [87]) - Siehe nächste Seite.
(a, b) Konfokale Darstellung apikaler Dendriten in einem kortikalen Vibratom-Schnitt einer Thy1-GFPs Maus vor (a) und nach (b) NIRB Markierung. Das **Sternchen** weist auf Lipofuszin-Granula hin. (c, d) Vergrößerte und invers kontrastierte Abbildungen der in (a) und (b) rechteckig hervorgehobenen Ausschnitte (**Pfeilköpfe** markieren den Zielfortsatz) vor (c) und nach (d) NIRB Markierung. Das innere NIRB Kästchen mit einer Seitenlänge von 6,5 μm wird durch die gestrichelte magentafarbene Linie hervorgehoben. (e) Niedrig-energetisches elektronenmikroskopisches Bild der Zielregion nach dem Umschalten von dicker zu ultradünner Schnittdarstellung. Das äußere NIRB Kästchen ist leicht auffindbar, das innere Kästchen wird durch die magentafarbene Linie hervorgehoben (umrahmt). (f) Ultradünne Schnitte durch den Zielfortsatz (siehe **Pfeilkopf**) und seinen Dendriten (Pseudofärbung in grün). Das innere Kästchen ist in dieser Abbildung deutlich sichtbar. (g) Dreidimensionale Darstellung des Fortsatzes (siehe **Pfeilkopf**) basierend auf der Zusammenstellung konsekutiver, elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Größenverhältnisse: Balken 10 μm (a, b), 5 μm (c, d), 25 μm (e), 2 μm (f). Der Würfel in (g) hat eine Seitenlänge von 1 μm .

Abb. 21 Near-Infrared Branding dendritischer Fortsätze



4.3.3 NIRB und Oligodendrozytenpathologie

Angewandt auf die Untersuchung der Oligodendrozytenpathologie erlaubt es die NIRB-Technik, dynamische *in vivo* Untersuchungen einzelner Oligodendrozyten mit einer Analyse der subzellulären Vorgänge zu verbinden. Um die prinzipielle Durchführbarkeit dieses Ansatzes zu evaluieren, wurde folgender Pilotversuch durchgeführt: Ein einzelner Oligodendrozytenfortsatz wurde zunächst niedrig- und hochauflösend lichtmikroskopisch dokumentiert (siehe **Kapitel 3.2.3.2**) und anschließend mit der NIRB Technik markiert (siehe **Abb. 22**).

Abb. 22 NIRB eines Oligodendrozytenfortsatzes

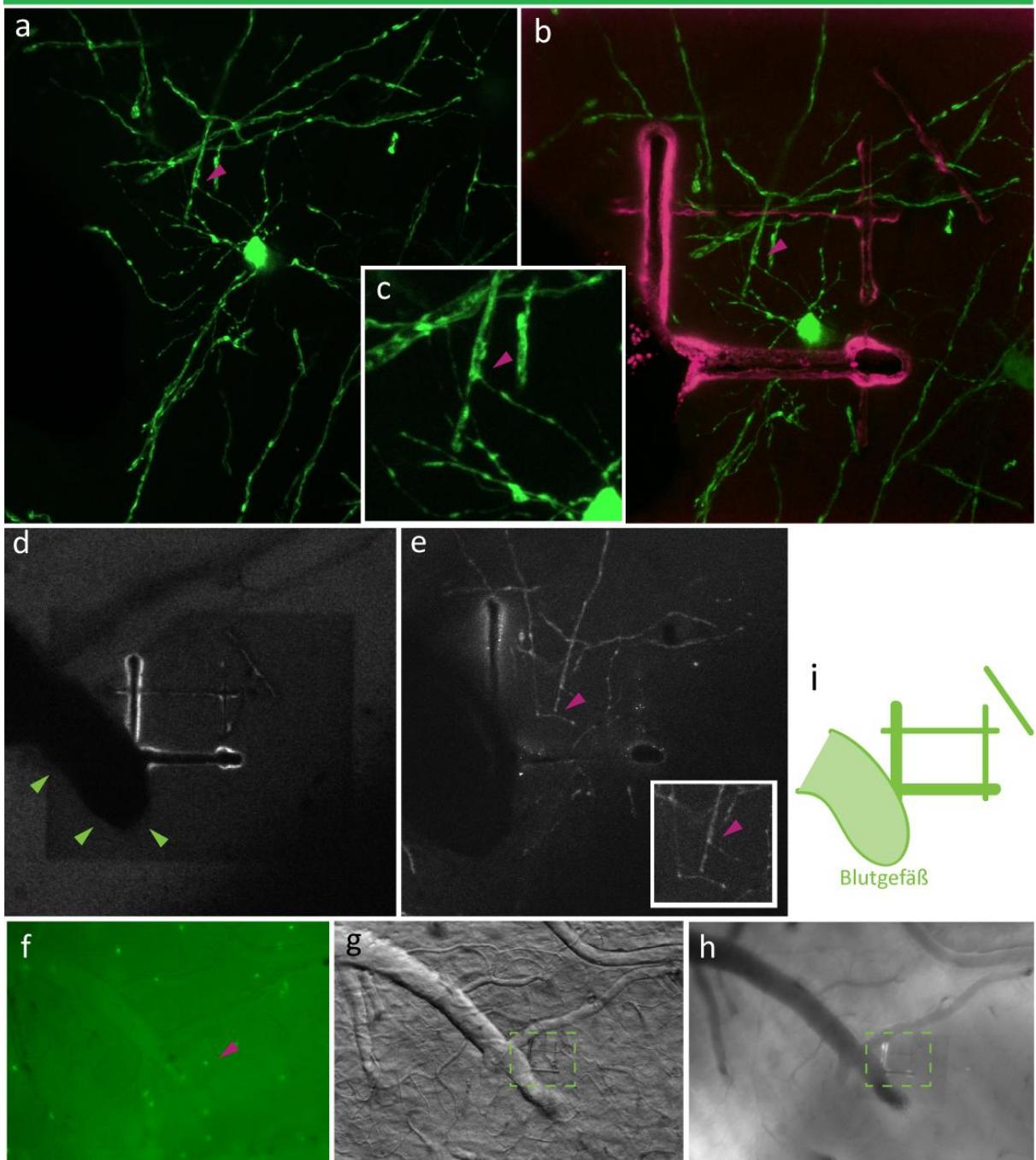


Abb. 22 NIRB eines Oligodendrozytenfortsatzes. Konfokale Übersichtsaufnahme des Oligodendrozyten (a) vor und (b) nach NIRB (60-fache Vergrößerung, 2-facher Zoom, Projektion maximaler Intensität). Magentafarbene **Pfeilköpfe** weisen auf den ausgewählten Fortsatz hin. (c) Vergrößerter Ausschnitt des Fortsatzes. (d) Konfokale Aufnahme der NIRB Box (20-fache Vergrößerung, einfacher Zoom). Die grünen **Pfeilköpfe** weisen auf ein vorbeiziehendes Gefäß hin, welches durch seine vom umliegenden Hirngewebe verschiedenen Gewebseigenschaften die Stärke der linken bzw. unteren Linie beeinflusst. Das dunklere Rechteck im Bild ist Folge eines vorhergegangenen konfokalen Scans ("Ausbleichen" des Gewebes). (e) Zwei-Photonenmikroskopische Aufnahme (2PM, 60-fache Vergrößerung, zweifacher Zoom) mit Betonung des Fortsatzes durch

den **Pfeilkopf** (siehe auch Bildausschnitt in (e)). (i) Skizze der NIRB Box mit Beeinflussung der Strichstärke links bzw. unten durch das vorbeiziehende Blutgefäß bei gleichen Lasereinstellungen für alle Linien-Scans. (f) Übersicht mit dem Dissektionsmikroskop (160-fache Vergrößerung, Fluoreszenz). Der **Pfeilkopf** betont den ausgewählten Oligodendrozyten, die umliegenden, sich schwach darstellenden, Gefäßstrukturen werden zur Orientierung genutzt. (g) NIRB Markierung (umrahmt von grüner **Box**) bei 160-facher Vergrößerung. (h) Autofluoreszente Aufnahme (160-fache Vergrößerung) nach NIRB (umrahmt von grüner **Box**).

Die Bilder in **Abb. 22** demonstrieren, dass es möglich ist, mit der NIRB Methode feine Strukturen wie einen Oligodendrozytenfortsatz zu markieren, ohne diesen zu verändern. Die konfokalen Bilder (siehe **Abb. 22, a, b, c**) zeigen den Oligodendrozytenzellkörper mit seinen Fortsätzen vor und nach NIRB. Das Wiederauffinden desselben Fortsatzes vor und nach NIRB setzt eine exakte Dokumentation voraus, auf welche bereits in **Kapitel 3.2.3.2** hingewiesen wurde. Unter dem Dissektionsmikroskop wurden dazu mit verschiedenen Einstellungen und in unterschiedlichen Vergrößerungen Aufnahmen des Gewebsausschnittes mit und ohne NIRB Markierung gemacht (siehe **Abb. 22, f-h**). Der Oligodendrozyt und der von mir ausgewählte Fortsatz, welcher sich mittig in der NIRB Markierung befindet, unterscheiden sich in den konfokalen Aufnahmen vor bzw. nach NIRB nicht. Bei gleichen Lasereinstellungen für alle Linien, präsentieren sich die Linien, welche die NIRB Box unten und links begrenzen deutlich stärker als die rechte bzw. obere Linie. Dies liegt an der Beeinflussung des Laserstrahls durch das vorbeiziehende Blutgefäß mit seinen vom umliegenden Hirngewebe verschiedenen Struktureigenschaften. Wie in **Abb. 22 g** und **h** ersichtlich kann die Box unter dem Dissektionsmikroskop leicht ausgemacht werden und anschließend der Elektronenmikroskopie zur weiteren Analyse und Interpretation zugeführt werden (siehe Beispiel in **Abb. 21, e** und **f**).

Diese Pilotversuche belegen, dass die NIRB Technik grundsätzlich für eine Untersuchung einzelner Oligodendrozytenkompartimente geeignet ist und bereiten die Basis für zukünftige Experimente, im Rahmen derer die Oligodendrozytenpathologie in entzündlichen Läsionen mit ultrastruktureller Auflösung untersucht werden kann.

5. Diskussion

5.1 Sequenz der Schädigung

Der Ablauf der Oligodendrozytenschädigung in entzündlichen Läsionen ist noch nicht hinreichend verstanden. Um die Sequenz der Oligodendrozytenschädigung zu beschreiben, muss man sich mit verschiedenen Kompartimenten der Oligodendrozyten auseinandersetzen: Dem Myelin und seinen Bestandteilen (Myelin-basisches-Protein (MBP), Proteolipid-Protein (PLP), Myelin-assoziiertes-Glykoprotein (MAG) und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) etc.), den Oligodendrozyten als myelinbildenden Zellen und schließlich ihren Fortsätzen, die das vom Zellkörper gebildete Myelin zu einer Isolierschicht um Axone arrangieren. Im Ablauf der Oligodendrozytenschädigung ist unklar, ob es sich bei dem Geschehen um einen Prozess handelt, der von innen nach außen ("*Inside-Out*") oder von außen nach innen ("*Outside-In*") abläuft. "*Inside-Out*" bedeutet hier, dass man von einem Prozess ausgeht, bei dem die Oligodendrozyten als Myelinbildner an erster Stelle geschädigt werden. In der Konsequenz würden dann ihre Fortsätze absterben und das Myelin abgebaut werden. "*Outside-In*" dahingegen beschreibt einen primären Angriff auf das Myelin und erst ein sekundäres Absterben der distalen und später proximalen Fortsätze mit dem finalen Untergang des Oligodendrozyten-Zellkörpers. In den Versuchen im Rahmen des akuten Modells zur Demyelinisierung konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

- 1) Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf kommt es zu einem deutlichen Verlust aller drei beobachteten Kompartimente (Myelin, Oligodendrozyten-Fortsätze, Oligodendrozyten-Zellkörper).
- 2) Zu allen beobachteten Zeitpunkten zeigt sich eine eindeutige Schädigungssequenz: der Myelinverlust ist am stärksten, der Verlust der Oligodendrozyten-Fortsätze geringer und der Untergang von Zellkörpern ist am geringsten ausgeprägt. Dies entspricht dem "*Outside-In*" Szenario.
- 3) Die Schädigung aller Oligodendrozytenkompartimente ist von der Zahl infiltrierter Zellen abhängig. Es handelt sich dabei um eine positive Korrelation: mit steigender Anzahl an infiltrierten Zellen, steigt auch das Ausmaß der Oligodendrozytenschädigung an (gemäß unter 2 genannter Sequenz). Die Anzahl infiltrierter Zellen korreliert dabei mit der Lokalisation innerhalb einer Läsion: Im Läsionszentrum ist die

Anzahl infiltrierter Zellen höher und die Schädigung der Oligodendrozyten stärker ausgeprägt als in den Randzonen.

- 4) In der Rekonstruktion einzelner Oligodendrozyten kann zwar nicht direkt eine Aussage über die Sequenz abgeleitet werden, wohl aber über den morphologischen Zustand von EAE-Oligodendrozyten im Gegensatz zu gesunden Oligodendrozyten. Die Zellfortsätze der kranken Oligodendrozyten sind in Anzahl, Verzweigung und Länge verringert. Diese Morphologie spricht für ein distales Absterben der Fortsätze, welches von distal nach proximal voranschreitet und letztendlich den Zellkörper erreicht.

Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen gelangt man zu der Annahme, dass das Myelin das primäre Target in der MS Pathogenese darstellt. Hinsichtlich des Schädigungsmechanismus existieren verschiedene Hypothesen. Denkbar wäre zum einen eine Kreuzreaktion ("Molekulares Mimikry") zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen [45] oder eine "Bystander-Reaktion" beziehungsweise eine Kombination aus beiden Reaktionen. "Bystander-Reaktion" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass es aufgrund einer allgemeinen Infektion im Körper zu unspezifischen entzündlichen Reaktionen käme, im Rahmen derer inflammatorische Zytokine oder Superantigene autoreaktive Zellen zu aktivieren vermögen [45]. Zum anderen könnte es sich um einen Antikörper-vermittelten Prozess handeln, bei dem es zu einer Antikörperbildung gegen Myelin kommt. Die neurologische Symptomatik eines MS Patienten wird entscheidend von der Myelinschädigung und deren pathologischen Folgen bestimmt. Die Zerstörung von Myelin resultiert in einem Verlust der Isolationsschicht eines Axons. Das Axon liegt nach der Demyelinisierung "frei", was es empfindlicher für schädigende Mediatoren wie beispielsweise freie Radikale macht und somit einen Beitrag zum Axonverlust leisten kann. Zusätzlich kann die saltatorische Erregungsleitung nicht mehr aufrecht erhalten werden, weshalb das Axon seine Potentiale nun kontinuierlich und daher verlangsamt weiterleiten muss. Des Weiteren kommt es gemäß dem "*Outside-In*"-Modell zu einem Absterben der Oligodendrozyten-Fortsätze. Die Zellfortsätze sind für die Interaktion und Kommunikation zwischen dem Zellkörper und Axonen von Nervenzellen zuständig und bewerkstelligen die homöostatische Versorgung des Axons. Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen ist der

Ausfall der Fortsätze im Hinblick auf die korrekte neurologische Funktion von Nervenzellen denkbar ungünstig.

Abb. 23 Hypothesen zur Demyelinisierung

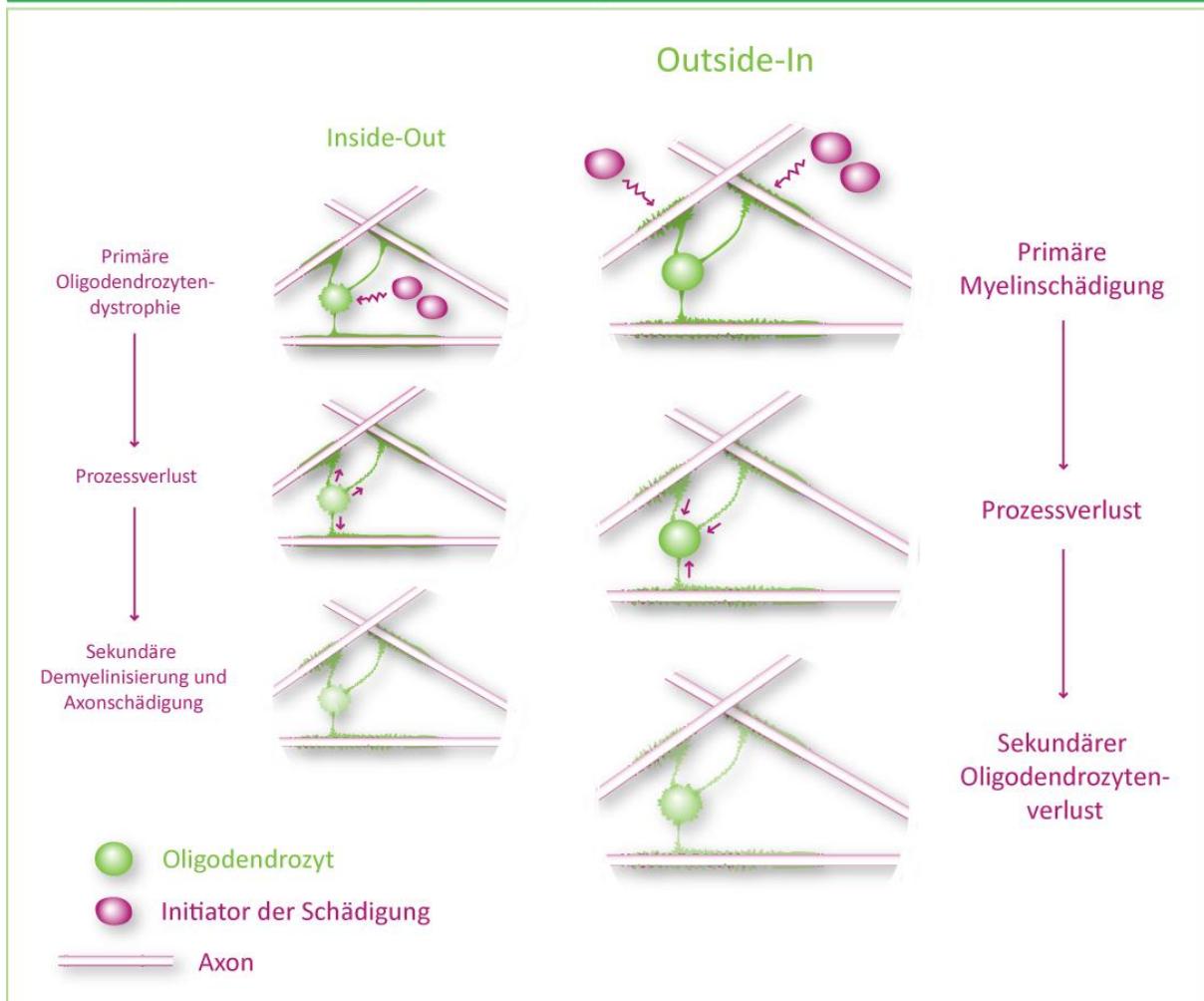


Abb. 23 Vorstellung zum Ablauf von Demyelinisierung. **Links:** Primäre Oligodendrozytendystrophie mit konsekutivem Prozessverlust und erst sekundärer Demyelinisierung. **Rechts:** Myelin als primäres Target mit darauffolgendem Prozessverlust und erst sekundärem Oligodendrozyten-Zellkörper-Verlust.

Wenn man nun davon ausgeht, dass dem Myelin eine entscheidende Rolle in der MS Pathogenese zukommt, ist es wichtig, im nächsten Schritt den Mechanismus der Myelinschädigung zu entschlüsseln und therapeutische Strategien zu entwickeln, die diese Myelinschädigung begrenzen können. Vorstellbar wären beispielsweise Strategien, die die Produktion potentiell schädigender Antikörper limitieren. Ein wichtiges Beispiel für den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von spezifischen Antikörpern ist die Anwendung von Rituximab, einem CD20-Antikörper, welcher u.a. sehr effektiv in der Behandlung von Non-

Hodgkin Lymphomen angewandt wird [88]. Auch in der Therapie der RRMS imponierte der CD20-Antikörper durch seinen Einfluss auf die entzündliche Aktivität [89]. Rituximab reduzierte in großen klinischen Studien sowohl die Anzahl der Krankheitsschübe, als auch die Anzahl Gadolinium-anreichernder Läsionen in MRT-Untersuchungen [89].

Insgesamt begründen der o. g. Gewebsuntergang, bestehend aus der Zerstörung von Myelin, dem Verlust von Fortsätzen und der Schädigung von Oligodendrozytenzellkörpern, die Formation der typischen MS Läsionen. In den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wird ein homogenes Bild der Läsionen beobachtet. Meinen Ergebnissen zufolge ist eine Läsion scharf begrenzt und geht zum akuten Zeitpunkt, insbesondere im Läsionszentrum, mit einem ausgeprägten Verlust an Myelin und Fortsätzen und einem Verlust von Oligodendrozytenzellkörpern einher. Der Zellkörperverlust selbst erscheint jedoch in Anbetracht der Zerstörung der beiden anderen Komponenten eher nachrangig (siehe auch Abb. 12).

Es gibt einige Hypothesen, welche einen Erklärungsansatz für die Entstehung MS-typischer Läsionen geben. Lucchinetti et al. beschrieben MS-Läsionen ebenfalls als intraindividuell homogen, wobei sie in verschiedenen Individuen vier verschiedene Muster charakterisierten (siehe auch Kapitel 1.2.2). Allerdings beobachteten sie einen ausgeprägten Oligodendrozytenverlust insbesondere am Rand einer Läsion [90], wohingegen in meinen Untersuchungen der Zellkörperverlust im Zentrum einer Läsion am ausgeprägtesten ist. Weiterhin unterscheiden sich unsere Studien dahingehend, dass der Oligodendrozytenverlust durch Lucchinetti et al. qualitativ festgestellt, jedoch nicht quantifiziert wurde. Daher könnte der von mir beobachtete und dominierende Untergang von Myelinscheiden und oligodendrozytären Fortsätzen möglicherweise einfach unbeschrieben geblieben sein, da sowohl auf den Zustand der Myelinscheiden, als auch den der Fortsätze in den Arbeiten nicht näher eingegangen wird [71]. Unter Berücksichtigung dessen, konnte eine Sequenz bisher nicht herausgearbeitet werden, da kein Hinweis gefunden werden konnte, ob der Oligodendrozytenverlust im Gegensatz zu dem Verlust der anderen Kompartimente nicht nachrangig erscheint.

Eine andere Theorie zur Pathogenese der Multiplen Sklerose wurde von Prineas und Kollegen aufgestellt. Sie sprechen von einem "Läsionskontinuum" und gehen davon aus, dass der Erkrankung immer dieselbe Ätiologie zu Grunde liegt, welche aber durch genetische

Faktoren sowie Umwelteinflüsse moduliert würde [91]. In einem individuellen Patienten beobachteten sie verschiedene Läsionsmuster, weshalb sie von einem Konzept intraindividueller Heterogenität ausgehen [91]. Demzufolge würden sich die akuten Läsionen eines einzelnen Patienten in ihrer Morphologie deutlich unterscheiden. Diese Beobachtung konnte ich in meinen Versuchen nicht machen. Die verschiedenen Läsionen eines Tieres (im Durchschnitt 3-4 Läsionen pro Tier) wiesen zum vergleichbaren Zeitpunkt alle ähnliche Merkmale auf und waren intraindividuell sehr homogen. Des Weiteren beschrieben Prineas und Kollegen ein initiales Absterben der Oligodendrozyten im Akutstadium und schlossen daher auf ein primär degeneratives Krankheitsgeschehen. Auch diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Ergebnissen aus meiner quantitativen Untersuchung der verschiedenen Kompartimente und der Rekonstruktion von Oligodendrozyten. Aufgrund des frühen und ausgedehnten Nachweises infiltrierender Zellen entspricht die Schädigungsinitiation für mich einem entzündlichen Geschehen. Bereits ganz zu Beginn der Läsionsformation bilden die infiltrierten Zellen die stärkste Fraktion unter allen Gewebsbestandteilen, weshalb für mich die Entzündung nicht lediglich eine direkte Konsequenz neurodegenerativen Gewebsuntergangs ist.

Allerdings liegt der Gewebsschädigung in allen Tieren, aufgrund der experimentellen Krankheitsinduktion, tatsächlich dieselbe Ätiologie zugrunde. Dies ist ein Aspekt, der die Aussagekraft des Tiermodells limitiert. Das Tiermodell lässt keine allgemeingültigen Aussagen zu, nach der die gewonnenen Erkenntnisse bedingungslos auf jeden MS Patienten übertragen werden können. Es ist weiterhin vorstellbar, dass dem Krankheitsbild verschiedene Ursachen zugrunde liegen, und dass das EAE Modell im Idealfall nur einen Teil, jedoch nicht die komplette MS Pathologie abbildet. Ein Beispiel für die These unterschiedlicher Krankheitsentitäten der MS liefert das Krankheitsbild Neuromyelitis optica. Lange Zeit wurde die Neuromyelitis optica als eine Variante der Multiplen Sklerose gehandelt; eine Vorstellung, welche erst in der jüngeren Vergangenheit durch den Nachweis spezifischer Aquaporin-Antikörper widerlegt werden konnte [92]. Ob sich dies in Zukunft für weitere Krankheitsformen, welche bislang als Varianten der MS gelten, herausstellen wird, bleibt abzuwarten. Das Modell liefert jedoch die Grundlage dafür, ähnliche Untersuchungen der Oligodendrozytenpathologie auch im ZNS-Gewebe von MS Patienten anzustreben. Unter der Annahme eines "*Outside-In*"-Modells erscheint es weiterhin

aussichtsreich, den Fokus zukünftiger experimenteller Untersuchungen auf die zuerst betroffenen Myelinscheiden und deren *in vivo* Veränderungen im Krankheitsmodell zu legen.

5.2 Remyelinisierung

Multiple Sklerose führt zu fokalen, demyelinisierten Herden im ZNS, welche ursächlich für eine Leistungsverzögerung im Nervensystem sind und dadurch die neurologische Symptomatik der MS mitbedingen. Die erfolgreiche Remyelinisierung demyelinisierter Läsionen ist demnach eine wichtige Voraussetzung für Krankheitsremission. Dass Remyelinisierung in MS Läsionen zumindest teilweise stattfinden kann, wurde bereits nachgewiesen [77]. Leider musste man jedoch feststellen, dass Remyelinisierung, aus bisher ungeklärten Ursachen, nicht in allen Patienten in gleichem Ausmaß und mit gleichem Erfolg stattfindet [77]. Prinzipiell setzt Remyelinisierung drei Schritte voraus (siehe auch **Abb. 9**, Kapitel **1.2.4**):

- 1) **Rekrutierung.** Es müssen ausreichend Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC) in die Läsion einwandern.
- 2) **Differenzierung.** Die immigrierten OPC's müssen sich zu prämyelinisierenden Oligodendrozyten und danach zu Myelin-produzierenden Oligodendrozyten differenzieren (siehe auch Kapitel **1.2**).
- 3) **Myelinisierung.** Die Myelin-produzierenden Zellen müssen in Interaktion mit den Axonen befähigt sein, das Myelin in Form von Myelinscheiden um das Axon zu arrangieren.

In jüngster Zeit wurden immer wieder Versuche zur Stimulation der Remyelinisierung gestartet, welche am ersten Schritt, der Rekrutierung, ansetzen. Grund für die Bemühungen waren Beobachtungen, die u. a. von Lucchinetti und Kollegen publiziert wurden [68]. Sie verzeichneten in ihren Untersuchungen von bioptischen und autoptischen Proben eine ausgeprägte Apoptose von Oligodendrozyten in MS-typischen Läsionen [68]. Auch andere Gruppen beobachteten apoptotische Oligodendrozyten in MS-Läsionen und damit einen absoluten Oligodendrozytenmangel im Akutstadium eines MS-Schubes [71]. Diese Erkenntnis lässt darauf hoffen, dass durch die Etablierung einer ausreichenden Anzahl an Oligodendrozyten in einer Läsion, die Basis zur erfolgreichen Remyelinisierung geschaffen

würde. Mit dem Ziel diese Limitation zu überwinden, wurde eine Vielzahl von Transplantationsstudien durchgeführt, im Rahmen derer sowohl adulte neurale Stammzellen, als auch Vorläuferzellen transferiert wurden und ihre Fähigkeit zur Bildung terminal ausgereifter Oligodendrozyten untersucht wurde [93]. Um für transplantierte Zellen die besten Voraussetzungen zu schaffen, forscht man zudem an der Einflussstärke von Transkriptionsfaktoren wie *Olig1*, welcher die Differenzierung (potentiell transplantiert) neuraler Vorläuferzellen zu Oligodendrozyten fördert und auch die Ausbildung von Prozessen sowie die Expression von MBP begünstigt [94]. Sowohl mit der Transplantation allein, als auch mit der zusätzlichen Stimulation durch Transkriptionsfaktoren konnte man zwar eine Reduktion von Läsionen, aber keine vollständige Remyelinisierung erzielen [95].

Meine eigenen Untersuchungen in einem Modell zur Multiplen Sklerose haben jedoch gezeigt, dass zum chronischen Zeitpunkt "*Onset + 84*" sehr viele Oligodendrozyten in einer Läsion nachweisbar sind. Durchschnittlich sind 278% mehr Zellkörper nachweisbar als in vergleichbarem gesunden Gewebe und sogar 289% mehr als zum akuten Zeitpunkt "*Onset + 2*". Unter dem Aspekt einer um das 2,8-fach gesteigerten Oligodendrozytenanzahl in einer chronischen Läsion scheint für mich die Remyelinisierung nicht an der Rekrutierung bzw. Migration von oligodendrozytären Zellen zu scheitern.

Auch andere Gruppen stützen diese Ergebnisse und berichten, sowohl in *post-mortem* Analysen von zerebralem Gewebe, als auch in Läsionen entsprechender Tiermodelle, keine Oligodendrozytenapoptose beobachtet zu haben [79, 96]. Sie berichten vielmehr, dass in chronischen Läsionen theoretisch (noch) ausreichend Oligodendrozyten-Vorläuferzellen bzw. Oligodendrozyten vorhanden seien; eine Beobachtung, welche mit den Ergebnissen meiner eigenen Untersuchungen konform geht. Unter dieser Voraussetzung ergibt sich die Überlegung, ob eine Unfähigkeit zur terminalen Differenzierung der Oligodendrozyten das Ausmaß der erfolgreichen Remyelinisierung limitiert. Oligodendrozyten besitzen Myelin-Promotor-Gene im Zellkern, welche die Differenzierung zum myelinisierenden Oligodendrozyten fördern. Diese Myelin-Promotor-Gene sind zunächst inaktiv, um die Zelle an der Ausdifferenzierung zu hindern, damit sie somit im Zellzyklus festgehalten wird, um eine ausreichende Proliferation im Gewebe zu gewährleisten. Proliferation und Differenzierung schließen sich demzufolge gegenseitig aus: wo Proliferation, da keine Differenzierung und *vice versa*. Einen möglichen Hinweis darauf, dass die Umstellung von

Proliferation auf Differenzierung fehlerhaft läuft, ist meine Beobachtung, dass ich trotz der bereits beschriebenen massiven Zunahme der Zellkörperzahl, bestenfalls eine geringfügige Zunahme an Zellfortsätzen (als Hinweis auf terminale Differenzierung von Oligodendrozyten) und keine Zunahme an Myelin quantifiziere. Im Hinblick auf die regulativen Vorgänge der Myelin-Promotor-Gene, welche in Kapitel **1.2.1** näher beschrieben wurden, bestehen nun zwei Möglichkeiten:

- 1)** Die prämyelinisierenden Oligodendrozyten werden durch Milieu-spezifische Faktoren (Entzündungsmediatoren, Abbauprodukte), trotz ausreichender Rekrutierung und Proliferation, daran gehindert den Zellzyklus zu verlassen. Daher sind in der Läsion zwar genügend Oligodendrozyten-Zellkörper nachweisbar, allerdings ist keine Zunahme an Zellfortsätzen zu verzeichnen, die auf eine Ausdifferenzierung der Zellen hinweisen würde.
- 2)** Die Myelinisierung stellt einen komplexen Vorgang dar, der der Kommunikation zwischen Zellfortsatz und dem zu myelinisierenden Axon bedarf. Fehlerhafte Kommunikation aufgrund nicht-rezeptiver Axone oder mangelnder bzw. pathologischer veränderter Fortsätze machen den Remyelinisierungsprozess daher abortiv.

Hinweise darauf, dass die Differenzierung die Schlüsselstelle für erfolgreiche Remyelinisierung darstellt, gibt es viele. Unter anderem wurde dazu in Kapitel **1.2.4.2** dieser Arbeit auf einige wichtige Signalwege hingewiesen. Einer davon ist der Signalweg um *Lingo-1*, einem positiven Schlüsselregulator der Oligodendrozytenproliferation, welcher zur Erfüllung dieser Funktion gleichzeitig negativ auf die Differenzierung von Oligodendrozyten wirkt. Bezuglich der negativen Wirkung auf die Differenzierung veröffentlichten Jepson und Kollegen nun ihre Vorstellung zum Mechanismus: Über eine homophile Interaktion des *Lingo-1*-Proteins mit sich selbst, und damit gleichzeitiger Funktion als Ligand und Rezeptor, verhindert *Lingo-1* die terminale Maturation von Oligodendrozyten [97]. Eine Unterbrechung dieser Protein-Protein-Interaktion zu einem geeigneten Zeitpunkt könnte sich daher als förderlich für Remyelinisierung erweisen. Des Weiteren werden Untersuchungen angestellt, die darauf abzielen, Stammzellen so zu beeinflussen, dass sie sich bevorzugt zu Oligodendrozyten differenzieren. Bai und Kollegen präsentierten dazu im Juni 2012 eine

Arbeit zum hepatozytären Wachstumsfaktor HGF ("Hepatocyte Growth Factor"), der von mesenchymalen Stammzellen produziert wird und die Remyelinisierung und funktionelle Erholung in einem Modell der Multiplen Sklerose förderte und zugleich die Einwanderung von Astrozyten verhinderte, welche u.a. für die Bildung glialer Narben verantwortlich zu sein scheinen [95]. In Folge der Injektion von HGF beobachteten sie im EAE Modell tatsächlich eine Abnahme von Läsionen sowie eine funktionelle Genesung [95]. In einer jüngst erschienen Arbeit berichteten Miron et al., dass zum Zeitpunkt des Remyelinisierungsbeginns eine Veränderung der verschiedenen Phänotypen von Mikroglia und Makrophagen stattfände [98]. Mikroglia respektive Makrophagen würden sich bevorzugt zu antientzündlichen bzw. immunmodulatorischen Formen differenzieren. Als spezifischer Faktor hierfür konnte Aktivin-A, ein Mitglied der TGF β -Familie, identifiziert werden [98]. Diese sogenannten M2-Makrophagen könnten eine Oligodendrozyten-Differenzierung induzieren, nachdem in Versuchen im Rahmen einer M2-Depletion deutlich wurde, dass diese mit einer gestörten Oligodendrozyten-Differenzierung einhergeht.

Neben der Erforschung endogener Faktoren spielt auch die Erforschung exogener Substanzen, welche das Potential besitzen Einfluss auf den Differenzierungsprozess zu nehmen, eine große Rolle. Olesoxime, eine cholesterol-ähnliche Verbindung, welche für seine neuroprotektiven und neuroregenerativen Eigenschaften im peripheren Nervensystem bereits bekannt ist, steht ebenfalls im Verdacht, die terminale Maturation der Oligodendrozyten sowie Myelinbildung *in vitro* und *in vivo* zu fördern, ohne jedoch einen negativen Effekt auf Proliferation oder Überleben der Zellen auszuüben [99]. Die Therapie mit Olesoxime führte in zwei Maus-Modellen dazu, dass in post-interventionellen MRT-Untersuchungen weniger Läsionen nachweisbar und klinisch eine Erholung der motorischen Funktionen zu beobachten waren [99]. Diosgenin, ein pflanzliches Steroid, fördert ebenfalls die Oligodendrozytenmaturation ohne Migration, Proliferation oder Überlebensfähigkeit zu beeinflussen. Dieser Effekt wird vermutlich über Östrogenrezeptoren vermittelt [100]. Ganz aktuell gibt es verschiedene, unterschiedlich vielversprechende Ansätze, um die Differenzierung einerseits und die Myelinbildung andererseits zu stimulieren, allerdings wird zunehmend deutlich, dass beide Schritte kaum voneinander getrennt betrachtet werden können. Viele regulatorische, mitogene Faktoren erfüllen verschiedene Funktionen und haben sowohl einen Effekt auf die Differenzierung, als auch auf die Remyelinisierung. In einer Co-Kultur aus Neuronen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen kann *in vitro* nach 14

Tagen Remyelinisierung beobachtet werden [101]. Jedoch sind die Bedingungen in dieser Kultur grundsätzlich verschieden von den Bedingungen, die in EAE- Läsionen bzw. MS- Läsionen vorherrschen. Das Milieu aus inflammatorischen Zellen und Myelinisierungs- feindlichen Bruchstücken in MS Läsionen als Folge des Gewebsuntergangs wirken inhibitorisch auf reparative Prozesse. Insofern müssen unter diesen erschwertem Bedingungen zusätzliche Stimulatoren gefunden werden, welche das Potential besitzen Remyelinisierungsprozesse zu verstärken. Ein Beispiel für einen solchen Stimulator ist Neuregulin 1. Neuregulin 1 fördert nicht nur Myelinisierung, sondern verbessert über die Stimulation axonaler Signale die Kommunikation zwischen Axonen und Oligodendrozyten mit dem Ziel, deren Überlebenszeit zu verlängern [101]. Die Überlebenszeit spielt insofern eine wesentliche Rolle, als dass die Bildung von MBP, die Ausbildung von Prozessen und die Arrangierung von Myelinscheiden ein langwieriger Prozess ist, der entscheidend von der Vitalität der Oligodendrozyten abhängt. Allerdings haben aktuelle Untersuchungen ergeben, dass gerade MS Patienten unter einem verminderten Ansprechen auf Neuregulin 1 leiden [102]: Neuregulin 1 bindet an ErbB4, einen Rezeptor, welcher auf den Immunzellen im peripheren Blut von MS Patienten schwächer exprimiert ist, als im Blut von gesunden Individuen. Auch auf eine Stimulation zur ErbB4 Expression sprechen MS Patienten deutlich schlechter an.

Des Weiteren vermutet man, dass die Voraussetzung zur erfolgreichen Remyelinisierung auch daran scheitern könnte, dass geschädigte Axone weniger rezeptiv für Remyelinisierungsprozesse wären [96]. Meine eigenen Untersuchungen dazu ergaben stagnierende bzw. weiter sinkende Werte für die Menge an quantifiziertem Myelin im zeitlichen Verlauf in einer EAE Läsion bei gleichzeitig steigenden Oligodendrozytenzahlen im chronischen Verlauf.

Aus der Zusammenschau aller Ergebnisse ziehe ich folgende Schlüsse:

- 1)** Prinzipiell scheint Remyelinisierung nicht an der Rekrutierung bzw. Migration von Vorläuferzellen zu scheitern.
- 2)** Nachdem die Anzahl der Oligodendrozyten-Prozesse stagniert, scheinen die Zellen an ihrer terminale Ausdifferenzierung gehindert zu sein, was den Prozess abortiv werden lässt.

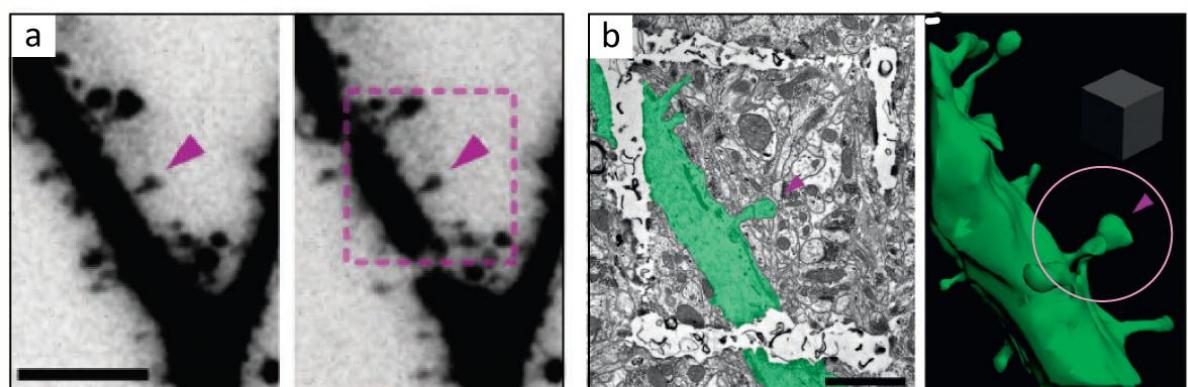
Insgesamt rücken für mich die Regulation der Differenzierung von Oligodendrozyten und die daran beteiligten, vielfältigen Signalwege in das Zentrum von Interesse. Die komplexen Signalkaskaden müssen aufgeschlüsselt werden, um ein vollständiges Bild ihres Wirkungsspektrums zu erfassen und um zu verhindern, Remyelinisierung an einer Stelle zu fördern, sie gleichzeitig aber an anderer Stelle zu hemmen. Zum anderen muss das umgebende entzündliche Milieu detaillierter studiert werden. Nachdem ungeklärt bleibt, inwieweit nicht nur Oligodendrozyten an der Prozessausbildung scheitern, sondern auch Axone nicht empfänglich für Remyelinisierung sind, spielt die Untersuchung der Kommunikation zwischen den beteiligten Zellen und zellulären Komponenten eine wichtige Rolle. Eine Möglichkeit zelluläre Interaktionen auf subzellulärer Ebene besser verstehen zu lernen, bietet das neu etablierte Verfahren *Near-infrared Branding*, welches im Folgenden diskutiert werden soll.

5.3 *Near-infrared Branding*

In der Vergangenheit hat sich bereits gezeigt, dass die Anwendung und Weiterentwicklung von Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie von großem Nutzen für viele Teilbereiche der Biologie war. Durch verschiedene Methoden ist es uns heute möglich, Gewebe in lichtmikroskopischer und Zellorganellen in elektronenmikroskopischer Auflösung zu studieren und Molekülstrukturen auf atomarem Level zu rekonstruieren [103]. Stärken der Lichtmikroskopie sind dabei die Möglichkeit zur dynamischen *in vivo*-Bildgebung sowie die Fähigkeit auch seltene Ereignisse zu detektieren, während sich die Elektronenmikroskopie durch seine extrem hohe Auflösungsfähigkeit auszeichnet. Die Kombination beider Methoden sollte es somit ermöglichen, dass sowohl immer kleinere Detailstrukturen erfasst, als auch immer größere Gewebsvolumina rekonstruiert werden können. Vor diesem Hintergrund ist es wünschenswert, eine breit anwendbare Technik zu haben, die es ermöglicht, Ultrastruktur in Zusammenhang mit ihrem Gewebskontext zu setzen. *Near-infrared Branding* stellt ein eben solches Verfahren dar, welches die Korrelation von Licht- und Elektronenmikroskopie ermöglicht. NIRB erlaubt die gezielte Markierung spezifischer Strukturen, ohne diese morphologisch zu verändern oder zu zerstören. Mit einem gepulsten Laser werden durch das "Einbrennen" von Linien und Punkten Rahmenmarkierungen geschaffen, wobei die Stärke der Markierung durch das Verändern verschiedener Parameter

individuell reguliert werden kann. Die Rahmen-Markierungen zeichnen sich durch Autofluoreszenz aus, was die Dokumentation unter dem Lichtmikroskop ermöglicht, bevor die Markierungen durch selektive Photo-Oxidation mit Diaminobenzidin unter dem EM wiederaufgefunden werden können. Das Verfahren besticht durch seine enorme Präzision: Unter Verwendung eines Objektivs mit großer numerischer Apertur können Markierungen bis zu 3-4 μm an die Struktur von Interesse herangesetzt werden, ohne diese zu verändern. Durch die Tiefenausdehnung von ca. 4 μm werden Volumina von weniger als 70 μm^3 definiert, was eine enorme zeitliche Effizienz bei der Weiterverarbeitung verspricht. Des Weiteren kann NIRB vielseitig in verschiedenen Geweben und bei verschiedenen Spezies angewandt werden. Wie bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, wurde für das NIRB ein spezifischer apikaler Dendrit eines Neurons unter dem Lichtmikroskop markiert und das Gewebe anschließend der elektronenmikroskopischen Auswertung zugeführt. Dabei bot der Testdurchlauf eine Überraschung: Musste man nach Beurteilung der lichtmikroskopischen Bilder noch davon ausgehen, einen einzelnen dendritischen Fortsatz zu untersuchen, zeigte die elektronenmikroskopische Analyse des Gewebsstücks einen zweiten Fortsatz (siehe rosa Kreis in **Abb. 23**), welcher sich dicht neben dem ersten befand. Dieser Schluss wäre mit der bloßen optischen Darstellung des Gewebes nicht möglich gewesen.

Abb. 24 Darstellung eines dendritischen Fortsatzes in LM und EM



Quelle: Bishop, D., I. Nikic, et al. (2011). Nat Meth 8(7): 568-570.

Abb. 24 Darstellung eines dendritischen Fortsatzes in Lichtmikroskopie (LM) und Elektronenmikroskopie (EM). (a) LM: vergrößerte und kontrast-invertierte Aufnahme des Fortsatzes (**Pfeilkopf**) vor (**links**) und nach (**rechts**) NIRB. (b) Links: EM. Ultradünner Schnitt durch den Zielfortsatz (**Pfeilkopf**) und seinen Dendriten (pseudo-grün). Rechts: Dreidimensionale Rekonstruktion des Fortsatzes (**Pfeilkopf**) basierend auf seriellen EM Aufnahmen. Balken in (a) 5 μm , Balken in (b) 2 μm .

Im Hinblick auf Multiple Sklerose ermöglicht *Near-infrared Branding* feine Strukturen wie Oligodendrozytenfortsätze zu markieren (siehe Abb. 22, Kapitel 4.3.3) und damit gezielt elektronenmikroskopisch auswertbar zu machen. Die Interaktion eines Oligodendrozyten mit Neuronen und anderen (sub-)zellulären Strukturen könnte dann lichtmikroskopisch *in vivo* beobachtet und anschließend elektronenmikroskopisch auf einer detaillierteren Ebene untersucht werden.

Nachdem sich in den vorangegangenen Abschnitten zum chronischen EAE-Modell herausgestellt hat, dass prinzipiell genügend Oligodendrozyten zur Remyelinisierung in chronischen MS Läsionen vorhanden sind, ist es umso interessanter, deren Morphologie bzw. die Morphologie ihrer Fortsätze auf subzellulärer Ebene und ultrastrukturell zu analysieren. Es lässt sich vermuten, dass das Problem ungenügender Remyelinisierung nicht in fehlender Zellmigration oder Proliferation begründet liegt, sondern eher an einem remyelinisierungsfeindlichen Milieu, welches eine Art Remyelinisierungsblockade darstellt. Eine andere Möglichkeit wäre die fehlerhafte Interaktion bzw. Kommunikation zwischen Axonen und Oligodendrozyten. Wünschenswert wäre die Untersuchung einzelner Zellfortsätze eines immigrierten Oligodendrozyten *in vivo*, um deren Differenzierungsstadium und Fähigkeit zur Kontaktaufnahme mit Axonen auf Einzelzellebene elektronenmikroskopisch zu evaluieren.

Anhand der Morphologie von Oligodendrozyten-Fortsätzen liefert NIRB dann die Möglichkeit Läsionen auf subzellulärer Ebene zu beschreiben und anhand dessen unterschiedliche Läsions-Subtypen auf ultrastruktureller Basis neu zu definieren. Doch nicht nur Oligodendrozyten stellen ein lohnenswertes Untersuchungsobjekt dar: Durch quantitative Analysen konnte das Myelin als primäres Target der MS Pathogenese identifiziert werden. Diese begründete Annahme bietet nun einen Ausgangspunkt dahingehend, *in vivo* Veränderungen des Myelins zu untersuchen, um die Initiation der MS Pathogenese verstehen zu lernen. In elektronenmikroskopischer Auflösung ließen sich dann Einblicke in die Interaktion von Makrophagen oder anderer Immunzellen mit Myelin gewinnen, eine potentielle "Remyelinisierungsblockade" auf ultrastruktureller Ebene definieren oder ein Zusammenhang mit verschiedenen Schädigungsstadien eines Axons herstellen. Es existieren viele Ideen hinsichtlich dessen, wie das Myelin primär geschädigt wird. Unabhängig jedoch davon, in welche Richtung sich die Forschung von diesem neuen Ausgangspunkt entwickelt: Alle neu gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, das Wissen um die Pathogenese der MS

in naher Zukunft zu vervollständigen, neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten zu definieren und die Erfolgsaussichten bereits etablierter Therapieansätze zu stärken.

6. Zusammenfassung

In einem EAE-Tiermodell zur Multiplen Sklerose kommt es in den untersuchten akuten Läsionen zu einem deutlichen Verlust von Myelin, Oligodendrozyten-Fortsätzen und Oligodendrozyten-Zellkörpern. Der Verlust von Myelin erwies sich stets ausgeprägter als der Verlust von Fortsätzen; die Oligodendrozyten-Zellkörper erschienen von den drei untersuchten Kompartimenten am stabilsten, mit einer vergleichsweise geringen Reduktion der Zellkörper-Anzahl. Dies lässt darauf schließen, dass das Myelin den primären Angriffspunkt in der MS Pathogenese darstellt. Der Schädigungsprozess scheint von der Anzahl infiltrierter, potentiell inflammatorischer Zellen abhängig zu sein, nachdem in Läsionen mit ausgeprägter Infiltration ein größeres Schädigungsausmaß zu beobachten ist.

Nach stattgehabter Schädigung respektive Demyelinisierung sind grundsätzlich drei entscheidende Schritte zur Remyelinisierung erforderlich: Rekrutierung und Differenzierung der Oligodendrozyten, sowie die daran anschließende Myelinisierung von Axonen. Meinen eigenen Untersuchungen in einem chronischen EAE-Tiermodell zufolge, scheint angesichts deutlich erhöhter Oligodendrozytenzahlen die Rekrutierung als initialer Schritt nicht der limitierende Faktor zu sein. Allerdings ist eine Reduktion der Zellfortsätze zu quantifizieren, was eine fehlerhafte Ausdifferenzierung der Oligodendrozyten denkbar erscheinen lässt.

Mit Hilfe neu etablierter Methoden, wie dem von mir im letzten Teil der Arbeit angewandten *Near-infrared Branding* können einzelne Oligodendrozytenfortsätze oder *in vivo* Veränderungen des Myelins selektiv in elektronenmikroskopischer Auflösung untersucht werden, um neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Initiation der MS Pathogenese zu gewinnen.

7. Literaturverzeichnis

1. Murray, T.J., *Multiple Sclerosis: the history of a disease*. Vol. 1. 2005, New York: Demos Medical Publishing.
2. Hein, T. and W. Hopfenmüller, *Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland*. Der Nervenarzt, 2000. 71(4): p. 288-294.
3. Wasay M, K.I., Khealani B, Sheerani M., *MS in Asian countries*. Int MS J. , 2006 13(2): p. 58-65.
4. Beck, C.A., et al., *Regional variation of multiple sclerosis prevalence in Canada*. Multiple Sclerosis, 2005. 11(5): p. 516-519.
5. Cook, S.D., B.M. Blumberg, and P.C. Dowling, *Epidemiological studies on multiple sclerosis*. Neurology, 1985. 35 (10): p. 1528-9.
6. Baranzini, S.E., et al., *Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis*. Nature, 2010. 464(7293): p. 1351-1356.
7. Willer, C.J., et al., *Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. 100(22): p. 12877-12882.
8. Ramagopalan, S.V. and G.C. Ebers, *Sequencing the multiple sclerosis genome: more questions than answers*. The Lancet Neurology, 2010. 9(8): p. 757-759.
9. Fugger, L., M.A. Friese, and J.I. Bell, *From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(6): p. 408-417.
10. Oksenberg, J.R. and S.E. Baranzini, *Multiple sclerosis genetics- is the glass half full, or half empty?* Nat Rev Neurol, 2010. 6(8): p. 429-437.
11. Barcellos, L.F., et al., *HLA-DR2 Dose Effect on Susceptibility to Multiple Sclerosis and Influence on Disease Course*. The American Journal of Human Genetics, 2003. 72(3): p. 710-716.
12. Dyment, D.A., et al., *Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance*. Human Molecular Genetics, 2005. 14(14): p. 2019-2026.
13. *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. Nature, 2011. 476(7359): p. 214-219.
14. Nielsen, N.M., et al., *Familial Risk of Multiple Sclerosis: A Nationwide Cohort Study*. American Journal of Epidemiology, 2005. 162(8): p. 774-778.
15. Oksenberg, J.R., et al., *Multiple sclerosis: Genomic rewards*. Journal of Neuroimmunology, 2001. 113(2): p. 171-184.
16. Pekmezovic T, D.J., Milenkovic M, Jarebinski M, Stojasavljevic N, Mesaros S, Kisic D, Kostic J., *Lifestyle factors and multiple sclerosis: A case-control study in Belgrade*. Neuroepidemiology, 2006. 27(4): p. 212-6.
17. Munger, K.L., et al., *Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis*. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2006. 296(23): p. 2832-2838.
18. Munger, K.L., et al., *Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis*. Neurology, 2004. 62(1): p. 60-65.
19. McDowell TY, A.S., Culpepper WJ, Langenberg P, Royal W, Bever C, Bradham DD, *Sun exposure, vitamin D and age at disease onset in relapsing multiple sclerosis*. Neuroepidemiology, 2011. 36(1): p. 39-45.

20. Willer, C.J., et al., *Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study*. BMJ, 2005. 330(7483): p. 120.
21. Ramagopalan, S.V., et al., *Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways*. The Lancet Neurology, 2010. 9(7): p. 727-739.
22. Dean, G. and M. Elian, *Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1997. 63(5): p. 565-568.
23. Pakpoor, J., et al., *The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis*. Multiple Sclerosis Journal, 2012.
24. Cermelli, C. and S. Jacobson, *Viruses and Multiple Sclerosis*. Viral Immunology, 2000. 13(3): p. 255-267.
25. Levin, L.I., et al., *Temporal Relationship Between Elevation of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis*. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2005. 293(20): p. 2496-2500.
26. DeLorenze, G.N., et al., *Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis: Evidence of Association From a Prospective Study With Long-term Follow-up*. Arch Neurol, 2006. 63(6): p. 839-844.
27. Wiendl, H. and B. Kieseier, *Multiple Sklerose- Klinik, Diagnostik, Therapie*. 1 ed. Klinische Neurologie, ed. R. Hohlfeld, J. Noth, and H. Reichmann. Vol. 1. 2010, Stuttgart: W. Kohlhammer GmbH.
28. Wiendl, H., et al., *Multiple Sklerose – Revision der neuen McDonald-Diagnosekriterien*. Der Nervenarzt, 2006. 77(10): p. 1235-1245.
29. Compston, A., et al., *McAlpine's Multiple Sclerosis* Vol. 4. 2005, Philadelphia: Churchill Livingstone. 1008.
30. Stuke, K., et al., *Symptomatology of MS: results from the German MS Registry*. Journal of Neurology, 2009. 256(11): p. 1932-1935.
31. McDonald, W.I., A. Compston, and G.D. Edan G, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS, *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis*. Annals of Neurology, 2001. 50(1): p. 121-7.
32. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria"*. Annals of Neurology, 2005. 58(6): p. 840-846.
33. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria*. Annals of Neurology, 2011. 69(2): p. 292-302.
34. Klotz, L., et al., *Diagnostik der Multiplen Sklerose 2010 Revision der McDonald-Kriterien*. Der Nervenarzt, 2011. 82(10): p. 1302-1309.
35. Ragonese, P., et al., *Mortality in multiple sclerosis: a review*. European Journal of Neurology, 2008. 15(2): p. 123-127.
36. Confavreux, C., S. Vukusic, and P. Adeleine, *Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process*. Brain, 2003. 126(4): p. 770-782.
37. Confavreux, C. and S. Vukusic, *Age at disability milestones in multiple sclerosis*. Brain, 2006. 129(3): p. 595-605.
38. Leray, E., et al., *Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis*. Brain, 2010. 133(7): p. 1900-1913.

39. Lalmohamed, A., et al., *Causes of death in patients with multiple sclerosis and matched referent subjects: a population-based cohort study*. European Journal of Neurology, 2012. 19(7): p. 1007-1014.
40. Breij, E.C.W., et al., *Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis*. Annals of Neurology, 2008. 63(1): p. 16-25.
41. Oppenheimer, D., *The cervical cord in multiple sclerosis*. Neuropathol Appl Neurobiol. 1978. 4(2): p. 151-62.
42. Brück, W. and C. Stadelmann, *Inflammation and degeneration in multiple sclerosis*. Neurological Sciences, 2003. 24(0): p. s265-s267.
43. Matzinger, P., *An Innate Sense of Danger*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002. 961(1): p. 341-342.
44. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. 296(5566): p. 301-5.
45. Sospedra, M. and R. Martin, *IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS**. Annual Review of Immunology, 2005. 23(1): p. 683-747.
46. Dhib-Jalbut, S., *Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis*. Neurology, 2007. 68(22 suppl 3): p. S13-S21.
47. Bartholomaeus, I., et al., *Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions*. Nature, 2009. 462(7269): p. 94-98.
48. Henderson, A.P.D., et al., *Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions*. Annals of Neurology, 2009. 66(6): p. 739-753.
49. Río, J., et al., *Interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis*. Journal of Neurology, 2005. 252(7): p. 795-800.
50. Kinkel RP, K.C., O'Connor P, Murray TJ, Simon J, Arnold D, Bakshi R, Weinstock-Gutman B, Brod S, Cooper J, Duquette P, Eggenberger E, Felton W, Fox R, Freedman M, Galetta S, Goodman A, Guarnaccia J, Hashimoto S, Horowitz S, Javerbaum J, Kasper L, Kaufman M, Kerson L, Mass M, Rammohan K, Reiss M, Rolak L, Rose J, Scott T, Selhorst J, Shin R, Smith C, Stuart W, Thurston S, Wall M; CHAMPIONS Study Group., *IM interferon beta-1a delays definite multiple sclerosis 5 years after a first demyelinating event*. Neurology, 2006. 66(5): p. 678-84.
51. Rudick, R.A., et al., *Estimating long-term effects of disease-modifying drug therapy in multiple sclerosis patients*. Multiple Sclerosis, 2005. 11(6): p. 626-634.
52. Kleinschnitz, C., et al., *Multiple-Sklerose-Update zur Pathophysiologie und neuen immuntherapeutischen Ansätzen*. Der Nervenarzt, 2007. 78(8): p. 883-911.
53. Wiendl, H. and R. Hohlfeld, *Multiple sclerosis therapeutics*. Neurology, 2009. 72(11): p. 1008-1015.
54. Barnes, M.P., et al., *Intravenous methylprednisolone for multiple sclerosis in relapse*. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1985. 48(2): p. 157-159.
55. Milligan, N.M., R. Newcombe, and D.A. Compston, *A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects*. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1987. 50(5): p. 511-6.
56. Grauer, O., et al., *Glukokortikosteroid-Therapie bei Optikusneuritis und Multipler Sklerose Evidenz aus klinischen Studien und praktische Empfehlungen*. Der Nervenarzt, 2001. 72(8): p. 577-589.
57. Gold, R., F. Buttigereit, and K.V. Toyka, *Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders*. Journal of Neuroimmunology, 2001. 117(1-2): p. 1-8.

58. Aktas, O., et al., *Orales Fingolimod bei Multipler Sklerose*. Der Nervenarzt, 2011. 82(2): p. 215-225.
59. Hohlfeld, R., F. Barkhof, and C. Polman, *Future clinical challenges in multiple sclerosis: Relevance to sphingosine 1-phosphate receptor modulator therapy*. Neurology, 2011. 76(8 Suppl 3): p. S28-37.
60. Ropper, A.H., *Selective Treatment of Multiple Sclerosis*. New England Journal of Medicine, 2006. 354(9): p. 965-967.
61. Havrdova, E., et al., *Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study*. The Lancet Neurology, 2009. 8(3): p. 254-260.
62. Warnke, C., et al., *Progressive multifokale Leukenzephalopathie unter Natalizumab*. Der Nervenarzt, 2011. 82(4): p. 475-480.
63. Henze, T., *Managing specific symptoms in people with multiple sclerosis*. The International MS Journal, 2005. 12(2): p. 60-8.
64. Boissy, A.R. and J.A. Cohen, *Multiple sclerosis symptom management*. Expert Review of Neurotherapeutics, 2007. 7(9): p. 1213-1222.
65. Crayton, H.J. and H.S. Rossman, *Managing the symptoms of multiple sclerosis: A multimodal approach*. Clinical Therapeutics, 2006. 28(4): p. 445-460.
66. Zeis, T. and N. Schaeren-Wiemers, *Lame Ducks or Fierce Creatures? - The Role of Oligodendrocytes in Multiple Sclerosis*. Journal of Molecular Neuroscience, 2008. 35(1): p. 91-100.
67. Emery, B., *Regulation of Oligodendrocyte Differentiation and Myelination*. Science, 2010. 330(6005): p. 779-782.
68. Lucchinetti, C., et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. Annals of Neurology, 2000. 47(6): p. 707-17.
69. Linker, R.A., et al., *Fortschritte in Pathogeneseforschung und Therapie der Multiplen Sklerose*. Fortschr Neurol Psychiatr, 2005. 73(12): p. 715,727.
70. Konig, F.B., et al., *Persistence of Immunopathological and Radiological Traits in Multiple Sclerosis*. Arch Neurol, 2008. 65(11): p. 1527-1532.
71. Barnett, M.H. and J.W. Prineas, *Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion*. Annals of Neurology, 2004. 55(4): p. 458-468.
72. Gay, F.W., et al., *The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion*. Brain, 1997. 120(8): p. 1461-1483.
73. Medana, I.M., et al., *MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway*. European Journal of Immunology, 2000. 30(12): p. 3623-3633.
74. Srinivasan, R., et al., *Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T*. Brain, 2005. 128(5): p. 1016-1025.
75. Dong, X.-x., Y. Wang, and Z.-h. Qin, *Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases*. Acta Pharmacologica Sinica, 0000. 30(4): p. 379-387.
76. Disanto, G., et al., *The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis*. Neurology, 2012. 78(11): p. 823-832.
77. Patrikios, P., et al., *Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients*. Brain, 2006. 129(12): p. 3165-3172.

78. Prineas, J.W., et al., *Continual Breakdown and Regeneration of Myelin in Progressive Multiple Sclerosis Plaques*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1984. 436(1): p. 11-32.
79. Franklin, R.J.M., *Why does remyelination fail in multiple sclerosis?* Nat Rev Neurosci, 2002. 3(9): p. 705-714.
80. Chen, Y., et al., *The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination*. Nat Neurosci, 2009. 12(11): p. 1398-1406.
81. Crockett, D.P., et al., *Number of oligodendrocyte progenitors recruited to the lesioned spinal cord is modulated by the levels of the cell cycle regulatory protein p27Kip-1*. Glia, 2005. 49(2): p. 301-308.
82. Fancy, S.P.J., et al., *Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders*. Experimental Neurology, 2010. 225(1): p. 18-23.
83. Genoud, S., et al., *Notch1 control of oligodendrocyte differentiation in the spinal cord*. The Journal of Cell Biology, 2002. 158(4): p. 709-718.
84. Rudick, R.A., S. Mi, and A.W. Sandrock, *LINGO-1 antagonists as therapy for multiple sclerosis: in vitro and in vivo evidence*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2008. 8(10): p. 1561-1570.
85. Klingen, Y., K.-K. Conzelmann, and S. Finke, *Double-Labeled Rabies Virus: Live Tracking of Enveloped Virus Transport*. Journal of Virology, 2008. 82(1): p. 237-245.
86. Amor, S., et al., *Biozzi mice: of mice and human neurological diseases*. J Neuroimmunol, 2005. 165(1-2): p. 1-10.
87. Bishop, D., et al., *Near-infrared branding efficiently correlates light and electron microscopy*. Nat Meth, 2011. 8(7): p. 568-570.
88. Czuczman, M.S., et al., *Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy*. J Clin Oncol, 1999. 17(1): p. 268-76.
89. Castillo-Trivino, T., et al., *Rituximab in Relapsing and Progressive Forms of Multiple Sclerosis: A Systematic Review*. PLoS ONE, 2013. 8(7): p. e66308.
90. Popescu, B.F.G. and C.F. Lucchinetti, *Pathology of Demyelinating Diseases*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2012. 7(1): p. 185-217.
91. Barnett, M.H., et al., *MS: is it one disease?* The International MS Journal, 2009 16(2): p. 57-65.
92. Barnett, M.H. and I. Sutton, *Neuromyelitis optica: not a multiple sclerosis variant*. Curr Opin Neurol, 2012. 25(3): p. 215-20.
93. Jadasz, J., et al., *The remyelination Philosopher's Stone: stem and progenitor cell therapies for multiple sclerosis*. Cell and Tissue Research, 2012. 349(1): p. 331-347.
94. Whitman, L.M., et al., *Olig1 function is required for remyelination potential of transplanted neural progenitor cells in a model of viral-induced demyelination*. Experimental Neurology, 2012. 235(1): p. 380-387.
95. Bai, L., et al., *Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models*. Nat Neurosci, 2012. 15(6): p. 862-870.
96. Chang, A., et al., *Premyelinating Oligodendrocytes in Chronic Lesions of Multiple Sclerosis*. New England Journal of Medicine, 2002. 346(3): p. 165-173.
97. Jepson, S., et al., *LINGO-1, a Transmembrane Signaling Protein, Inhibits Oligodendrocyte Differentiation and Myelination through Intercellular Self-interactions*. Journal of Biological Chemistry, 2012. 287(26): p. 22184-22195.
98. Miron, V.E., et al., *M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination*. Nat Neurosci, 2013. 16(9): p. 1211-1218.

99. Magalon, K., et al., *Olesoxime accelerates myelination and promotes repair in models of demyelination*. Annals of Neurology, 2012. 71(2): p. 213-226.
100. Xiao, L., et al., *Diosgenin promotes oligodendrocyte progenitor cell differentiation through estrogen receptor-mediated ERK1/2 activation to accelerate remyelination*. Glia, 2012. 60(7): p. 1037-1052.
101. Wang, Z., H. Colognato, and C. ffrench-Constant, *Contrasting effects of mitogenic growth factors on myelination in neuron–oligodendrocyte co-cultures*. Glia, 2007. 55(5): p. 537-545.
102. Tynnyakov-Samra E., et al., *Reduced ErbB4 Expression in Immune Cells of Patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis*. Multiple Sclerosis International, 2011. 2011.
103. Denk, W. and H. Horstmann, *Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure*. PLoS Biol, 2004. 2(11): p. e329.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Erste Illustration der MS durch R. Carswell	1
Diagr. 1 Verlauf und Symptome der Multiplen Sklerose	6
Tab. 1 McDonald Kriterien 2010 der rezidivierend-remittierenden Multiplen Sklerose.....	7
Abb. 2 "Danger-Model" zur Aktivierung potentiell autoreaktiver T-Zellen	10
Abb. 3 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	12
Abb. 4 Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose.....	13
Abb. 5 Funktion von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren.....	14
Abb. 6 Regulierung der Oligodendrozyten-Differenzierung und Myelinisierung	16
Abb. 7 Heterogenität der Läsionsformation	18
Abb. 8 Vorstellung zum Ablauf von Demyelinisierung.....	20, 45
Abb. 9 Prozess der Remyelinisierung nach experimentell induzierter Demyelinisierung.....	23
Abb. 10 Durchführung der Mikroskopie.	38
Abb. 11 Dokumentation des Oligodendrozyten	42
Diagr. 2 Beispielhafter Krankheitsverlauf der immunisierten Kohorte.	44
Abb. 12 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen	47
Abb. 13 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit vom Erkrankungszeitpunkt.....	49
Abb. 14 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte.....	51
Abb. 15 Oligodendrozytenschädigung im Zentrum der Läsion.....	52
Abb. 16 Rekonstruktion von Oligodendrozytenzellkörpern inklusive ihrer Fortsätze.....	54
Abb. 17 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt.....	56
Abb. 18 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Lage innerhalb einer Läsion	57
Abb. 19 Oligodendrozytenschädigung in Abhängigkeit von der Infiltrationsdichte.....	60
Abb. 20 Definierte Markierungen durch NIRB	63
Abb. 21 Near-infrared Branding dendritischer Fortsätze	65
Abb. 22 NIRB eines Oligodendrozytenfortsatzes	66
Abb. 23 Vorstellung zum Ablauf von Demyelinisierung.....	70
Abb. 24 Darstellung eines dendritischen Fortsatzes in LM und EM.	79

9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACCN1	<i>engl.</i> amiloride-sensitive cation channel neuronal 1 (neuronaler Amilorid-sensitiver Kationen-Kanal 1)
BiozziABH	Biozzi Antibody High (Mauslinie)
bl6	<i>engl.</i> black 6 (Mauslinie)
C9neo, C3d	<i>engl.</i> complement (Komplementfaktoren 9neo, 3d)
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CFA	<i>engl.</i> complete Freund's Adjuvant (komplettes Freund-Adjuvans)
DMSG	Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DsRed	DiscosomaRed (rot fluoreszierendes Protein)
EAE	<i>engl.</i> experimental autoimmune encephalomyelitis (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EM	Elektronenmikroskopie
ErbB4	<i>engl.</i> Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog-4 (Onkogen)

GA	Glutaraldehyd
Gd	Gadolinum
GFP	<i>engl.</i> green fluorescent protein (Grün fluoreszierendes Protein)
GLAT	Glatirameracetat
HGF	<i>engl.</i> hepatocyte growth factor (Hepatozytärer Wachstumsfaktor)
HLA	humane Leukozyten-Antigen
ICAM-1	<i>engl.</i> intercellular adhesion molecule-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1)
IFA	<i>engl.</i> incomplete Freund's Adjuvant (inkomplettes Freund-Adjuvans)
IFNy	Interferon γ
IL (-2, -7)	Interleukin (-2, -7)
IVIg	intravenöse Immunglobuline
KIF1B	<i>engl.</i> kinesin family member 1B
LFA-1	<i>engl.</i> lymphocyte function-associated antigen 1
Lingo-1	<i>engl.</i> leucine rich repeat and Ig domain containing 1 (Signalprotein)

LM	Lichtmikroskopie
MAG	<i>engl.</i> myelin-associated glycoprotein (Myelin-assoziertes Glykoprotein)
MBP	<i>engl.</i> myelin basic protein (Myelinbasisches Protein)
MHC	<i>engl.</i> major histocompatibility complex
MOG	<i>engl.</i> myelin oligodendrocyte glycoprotein (Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein)
MRF	Myelin-Gen-Regulationsfaktor
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NA	numerische Apertur
NIRB	<i>engl.</i> Near-infrared Branding
Nkx2.2	<i>engl.</i> NK2 Transcription Factor-Related, Locus 2 (Transkriptionsfaktor)
Notch	Transmembranprotein, Rezeptorfunktion im gleichnamigen Signaltransduktionsweg
NT	<i>engl.</i> Neurotrace

Olig1	<i>engl.</i> oligodendrocyte transcription factor 1 (Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 1)
OPC	<i>engl.</i> oligodendrocyte progenitor cell (Oligodendrozyten-Vorläuferzelle)
PB	<i>engl.</i> phosphate buffer (Phosphatpuffer)
PBS	<i>engl.</i> phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung)
PDGF	<i>engl.</i> platelet derived growth factor (Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor)
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	<i>engl.</i> primary progressive multiple sclerosis (Primär progrediente Multiple Sklerose)
RRMS	<i>engl.</i> relapsing-remitting multiple sclerosis (Schubförmig remittierende Multiple Sklerose)
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SAD G mcherry	monomeres rot fluoreszierendes Protein (Tollwut-Virus)
SD	<i>engl.</i> standard deviation (Standardabweichung)
SEM	<i>engl.</i> standard error of the mean (Standardfehler)

SPMS	<i>engl.</i> secondary progressive multiple sclerosis (Sekundär progrediente Multiple Sklerose)
Th	T-Helferzelle
Thy1GFP	<i>engl.</i> Thymozyten Differenzierungs-Antigen 1 (Mauslinie)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	<i>engl.</i> vascular adhesion molecule 1 (vaskuläres Adhäsionsmolekül 1)
VLA-4	<i>engl.</i> very late antigen 4
wnt	<i>engl.</i> wingless type (Signalweg)
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete wissenschaftliche und persönliche Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit und die kritische Durchsicht meiner Dissertation.

Gleichermaßen danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Misgeld für die hervorragende Betreuung insbesondere bei der Durchführung der NIRB-Experimente, seine Einführung in die komplexen technischen Instrumente, sowie für sein kritisches Feedback im Verlauf meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld und Herrn Prof. Dr. med. Arthur Konnerth danke ich für die Bereitstellung optimaler Arbeitsmöglichkeiten und das wissenschaftliche Umfeld am Institut für Klinische Neuroimmunologie der LMU München und am Institut für Neurowissenschaften der TU München.

Des Weiteren danke ich den herausragenden Kollaborationspartnern:

Dr. Derron Bishop am *Department of Physiology*, Muncie, Indiana, USA, für die Etablierung der NIRB Methode, der Prozessierung des NIRB-Gewebes und die korrelierenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen,

Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann am *Gene Center Munich* für die Bereitstellung des Tollwut-Virus zur selektiven Färbung von Oligodendrozyten und

Prof. Dr. Doron Merkler am *Department of Pathology and Immunology*, Genf, Schweiz, für die Bereitstellung der *MOG stock solution* zur Immunisierung der Tiere.

Außerdem danke ich Dr. Ivana Nikić, dass sie mir insbesondere zu Beginn dieser Arbeit als äußerst kompetente Wissenschaftlerin häufig eine erste Anlaufstelle bei Fragen jedweder Art bot und mir stets beratend zur Seite stand.

Ferner möchte ich mich bedanken bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Forschungseinheit Therapieforschung* am Institut für Klinische Neuroimmunologie der LMU München, sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Misgeld Lab* am Institut für Neurowissenschaften der TU München. Vielen Dank für die Unterstützung beim Erlernen der wissenschaftlichen Methoden, für die

inspirativen Ratschläge und die durchweg positive, familiäre Arbeitsatmosphäre in den letzten 4 Jahren.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen Brüdern Christian und Andreas für die stets liebevolle Unterstützung und Begleitung während aller Phasen meines Medizinstudiums und meiner Promotion.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung der Oligodendrozytenpathologie im Tiermodell der Multiplen Sklerose

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin