# Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt, Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Christoph Schmitz



# Morphologische Veränderungen der Astrozyten bei Multipler Sklerose

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Sebastian Max Cordier

aus

Düsseldorf

2022

\_\_\_\_\_

# Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. Markus Kipp

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Jochen Herms

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der

mündlichen Prüfung: 03.02.2022

# Inhaltsverzeichnis

Inl	haltsver	zeichnis	I
Ab	bildung	sverzeichnis	III
Ta	bellenve	erzeichnis	IV
Ab	kürzun	gsverzeichnis	V
		nfassung	
1		tung	
	1.1 N	Aultiple Sklerose	2
	1.2 D	Oas Zentralnervensystem	3
	1.2.1	Oligodendrozyten	5
	1.2.2	Mikroglia	5
	1.2.3	Astrozyten	5
	1.3 P	athologische Veränderungen bei Multipler Sklerose	7
	1.3.1	Protektive Wirkung von Astrozyten bei Multipler Sklerose	7
	1.3.2	Phagozytose von Myelin durch Astrozyten	9
	1.4 T	Ciermodell	9
	1.4.1	Das Cuprizone-Modell	9
	1.5 Z	Zielsetzung dieser Arbeit	10
2	Mater	ial und Methodik	12
,	2.1 T	Tierhaltung	12
	2.1.1	Cuprizone-Intoxikation	12
,	2.2 T	ranskardiale Perfusion	13
,	2.3 P	Paraffineinbettung	14
,	2.4 D	Ooppelte Immunfluoreszenz	15
,	2.5 A	Auswertung	18
	2.5.1	Digitalisierung der Immunfluoreszenz	18
	2.5.2	Die zweidimensionale immunfluoreszierende Darstellung	19
	2.5.3	Die dreidimensionale immunfluoreszierende Darstellung	20

	2.5.4	Statistische Auswertung der Immunfluoreszenz	21
3	Ergeb	onisse	22
	3.1 A	Astrozyten und ihr Einfluss auf Myelin	22
	3.1.1	Myelinanteil innerhalb und außerhalb der Astrozytenfortsätze	
	3.1.2	Immunfluoreszierender Nachweis der Myelinphagozytose im ZNS	25
4	Disku	ssion	28
	4.1 A	Astrozyten und ihre protektive Wirkung auf Myelin	28
	4.1.1	Astrozytäre Protektion des Myelins	
	4.1.2	Myelinphagozytose durch Astrozyten im 3D-Modell	32
	4.1.3	Ausblick	
5	Anha	ng	35
		Sierhaltung	
	5.2 V	Verwendete Chemikalien	36
	5.3	Geräte und Software	37
	5.4 H	Herstellung der Lösungen	38
	5.4.1	PBS (10x Stocklösung, SOP 1)	38
	5.4.2	PBS (1x Fertiglösung, SOP 2)	38
	5.4.3	Tris/EDTA Puffer (SOP 4)	39
	5.4.4	DBS 2% (SOP 6B)	39
	5.4.5	DBS/Triton/PBS für Immunfluoreszenz 5% (SOP 7)	39
	5.4.6	DBS/PBS 5%	39
	5.4.7	Triton/PBS 0,5% (SOP 8)	39
	5.4.8	Ketamin-Xylazin-Lösung	39
Li	teratur-	und Quellenverzeichnis	40
Le	benslau	fFehler! Textmarke nicht det	finiert
Da	nksagu	ng	45
Δf	fidavit		46

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Übersicht einer Gehirnhälfte im Frontalschnitt	4
<b>Abbildung 2:</b> Illustration der Astrozyten nach del Río Hortega (1920)	6
Abbildung 3: Cuprizone-Intoxikation	13
Abbildung 4: ROI A: innerhalb der Fortsätze; B: außerhalb der Fortsätze	19
Abbildung 5: Vergleich der dreiwöchigen Experimente	22
Abbildung 6: Anteil des anti-PLPs bei unterschiedlicher Intoxikationsdauer	24
Abbildung 7: Verhältnis des anti-PLP-Anteils, entsprechend zu Abbildung 6	24
Abbildung 8: Immunfluoreszierende 3D-Darstellung des Corpus Callosum	26
Abbildung 9: Immunfluoreszierende Darstellung in Schnittbildern	26
Abbildung 10: Darstellung aus drei Perspektiven	27

# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht über die Zellen des ZNS und ihre Funktion [5]	4
Tabelle 2: Herstellung der Perfusionslösung (1 Liter)	13
Tabelle 3: Einbettung der Gehirne in Paraffin	14
Tabelle 4: Absteigende Reihe der Alkohole und Kohlenwasserstoffe	15
Tabelle 5: Primärantikörper doppelte Immunfluoreszenz	15
Tabelle 6: Sekundärantikörper doppelte Immunfluoreszenz	16
Tabelle 7: Ergebnisse des Shapiro-Wilk & Kolmogorov-Smirnov Tests	21
Tabelle 8: Relativer optischer Anteil an anti-PLP innerhalb zweier Fortsätze	23
Tabelle 9: Mann-Whitney-U-Test bei drei Wochen Intoxikationszeit	23
Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichungen des anti-PLP-Anteils	23
Tabelle 11: Verhältnis des anti-PLP-Anteils bei drei Wochen Intoxikationszeit	24
Tabelle 12: Mann-Whitney-U-Test bei drei und fünf Wochen Intoxikationszeit	25
Tabelle 13: Übersicht der Phagozytosefähigkeit von Astrozyten [1-4]	32
Tabelle 14: Material Tierhaltung	35
Tabelle 15: Verwendete Chemikalien	36
Tabelle 16: Geräte und Software	37
Tabelle 17: Übersicht über die Herstellung der Lösungen	38

# Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius

Abb. Abbildung

APRIL engl. a proliferation-inducing ligand

bspw. beispielsweise

CNPase engl. 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase

d Tag/Tage

DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBS engl. *Donkey Blocking Serum* 

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

engl. Englisch

Exp. Experiment

g Gramm

GFAP engl. Glial fibrillary acidic protein

HIER engl. Heat Induced Epitope Retrieval

i.e. lateinisch: id est

IBA1 engl. Ionized calcium-binding Adapter molecule 1

Kap. Kapitel

1 Liter

mg Milligramm

MHC engl. Major Histocompatibility Complex

min Minute

ml Milliliter

ms Millisekunde

n Anzahl

NF-KB engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

PBS engl. Phosphate Buffered Saline

PLP Proteolipid-Protein

RPM engl. Rounds per Minute

ROI engl. Region of Interest

s Sekunde

SOP engl. Short Operation Protocol

Tab. Tabelle

u.a. unter anderem

v.a. vor allem

W Woche

z.B. zum Beispiel

ZNS Zentralnervensystem

μl Mikroliter

μm Mikrometer

### Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine Krankheit, die die auf Myelin basierende Nervenisolation im Gehirn zerstört. Astrozyten haben sowohl einige protektive als auch inflammatorische Funktionen, jedoch sind viele Zusammenhänge noch nicht geklärt. Besonders die Wirkungen und die Beziehungen von Astrozyten auf Myelin bei Multipler Sklerose sind nicht abschließend geklärt. Astrozyten können nach einer Demyelinisierung die Remyelinisierung sowohl fördern als auch hemmen [9-13]. Mikroglia fördern die Remyelinisierung durch eine Phagozytose des defekten Myelins und auch bei Astrozyten gibt es erste Hinweise auf ein solches Verhalten (Tab. 13) [14].

Diese Arbeit hat zwei Ziele: Zum einen soll untersucht werden, welchen Einfluss Astrozyten auf Myelin bei Multipler Sklerose haben. Zum anderen soll versucht werden, eine Phagozytose von Myelin durch Astrozyten in einer Immunfluoreszenzfärbung darzustellen und damit Hinweise auf die Ursache und die Wirkung zu gewinnen.

Mithilfe des Cuprizone-Modells erfolgte eine Demyelinisierung mit zwei- und dreidimensionaler Darstellung der Astrozyten und des Myelins. Anschließend erfolgte eine Färbung des Myelins und der Astrozyten, um den Anteil an Myelin innerhalb (Inside) und außerhalb (Outside) der Astrozytenfortsätze zu messen.

Für die zweite Fragestellung wurden das gefärbte Myelin und die gefärbten Astrozyten in einer dreidimensionalen Darstellung in allen Ebenen untersucht.

Es zeigte sich nicht nur der erwartete Verlust von Myelin bei längerer Cuprizone-Intoxikation, sondern auch ein signifikant geringerer Myelinanteil außerhalb der astrozytären Fortsätze (bei drei Wochen: innerhalb:  $100\% \pm 2,3\%$  vs. außerhalb:  $88,1\% \pm 2,2\%$ , Abb. 7 und Tab. 11).

In der dreidimensionalen Darstellung konnte die Phagozytose des Myelins in den Astrozyten nachgewiesen werden.

Die Funktion der Phagozytose von Myelin durch Astrozyten konnte noch nicht geklärt werden.

Aus den Ergebnissen lässt sich allerdings schließen, dass Astrozyten bei einer frühen, akuten Demyelinisierung Myelin schützen. Möglicherweise geschieht dies über die Aufrechterhaltung eines Mikromilieus.

### 1 Einleitung

#### 1.1 Multiple Sklerose

Bei Multipler Sklerose, synonym auch Morbus Charcot oder Encephalitis disseminata, wird das Myelin, ein Teil des Zentralnervensystems (ZNS), chronisch autoimmun zerstört. Jean-Martin Charcot beschrieb 1868 als eines der prägendsten Merkmale - neben chronischer Demyelinisierung - den axonalen Schaden [15]. Er befand, dass Intentionstremor, skandierende Sprache und Nystagmus am häufigsten seien [16]. Da jeder Teil des ZNS von diesen geschädigten Stellen, Läsionen genannt, betroffen sein kann, treten oft auch einseitiger Sehverlust, Doppelbilder, Gliederschwäche, Sensibilitätsverlust, Ataxie oder sexuelle Dysfunktion auf [17, 18]. Diagnostisch werden die McDonald-Kriterien angewandt, die Demyelinisierungen an verschiedenen Orten des ZNS zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfordern [18].

Die Multiple Sklerose tritt zumeist im Alter zwischen 20 und 40 Jahren erstmals auf. Frauen erkranken zwei- bis dreimal häufiger als Männer [19, 20]. Mit circa 700.000 Betroffenen in Europa und 2,5 Mio. weltweit entspricht das einem Neuauftreten von weniger als 0,1% der Bevölkerung [21]. Die Wahrscheinlichkeit steigt für Geschwister auf circa 3% und für eineige Zwillinge auf 25%, was eine genetische Ursache wahrscheinlich macht [22].

Ein weiterer Hinweis für eine genetische Ursache zeigt sich in der regionalen Verteilung der Erkrankung. So zeigen sich in dem kaukasisch geprägten Nordeuropa ein häufigeres Auftreten (bspw. Schottland: durchschnittlich 200 Fälle/100.000 Personen) als im ethnisch gemischteren Australien (125/100.000) und am seltensten bei südafrikanischen Schwarzen (0,22/100.000) [20, 23]. Zum Vergleich: 2018 gab es circa 55/100.000 Herzinfarkttote und circa 54/100.000 Lungenkrebstote in Deutschland [24-26]. Für Multiple Sklerose gibt es keine kurative Therapie, nur Medikamente zur positiven Beeinflussung des Krankheitsverlaufes [21]. Sie hat eine durchschnittliche Lebenszeitreduktion von circa 15% zur Folge, zusätzlich zu den sich entwickelnden Problemen im Alltag und dem fortschreitenden Mangel an Teilhabe an der Gesellschaft [27-29].

Multiple Sklerose ist eine Autoimmunerkrankung, bei welcher die Immunabwehr fälschlicherweise die körpereigenen Zellen angreift [30]. Die Ursache für Multiple Sklerose ist unklar und ist Diskussionsgegenstand der aktuellen Forschung. Neben dem

erwähnten genetisch erhöhten Risiko scheint sich die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Infektionskrankheiten wie beim Epstein-Barr-Virus oder Zytomegalievirus zu erhöhen. Ob es sich dabei um eine kausale Korrelation handelt, ist nicht endgültig geklärt [22, 31]. Eine dritte Auffälligkeit ist der Nachweis von autoimmunen Abwehrzellen. So erklärt die Hygienehypothese die Pathogenese der Multiplen Sklerose durch eine vermehrte Hygiene in entwickelten Zivilisationen, was zu einer mangelnden Stimulation des Immunsystems führt. Daher reagiert das Immunsystem unverhältnismäßig stark und betrachtet körpereigene Zellen bzw. Proteine als Feind. Passend dazu stieg die Zahl der Neuerkrankungen an Multipler Sklerose in den USA zwischen 1991 und 1994 im Vergleich zu den Neuerkrankungen von 1982 bis 1986 um 50% [32]. Aktuelle, wirkungsvolle Therapien versuchen, das Immunsystem zu unterdrücken [33].

#### 1.2 Das Zentralnervensystem

Als ZNS werden die Nerven und Gewebe des Gehirns und des Rückenmarks bezeichnet. Das ZNS hat die Aufgabe mithilfe der Nervenzellen, der Neuronen, die Informationen unseres Körpers und der Umwelt zu verarbeiten. Es kann in zwei Bereiche geteilt werden: die graue Substanz und die weiße Substanz. Die Zellkörper der Neurone liegen dabei überwiegend in der grauen Substanz, die Nervenzellfortsätze, Axone genannt, in der weißen Substanz [5].

Anatomisch lässt sich das Gehirn noch detaillierter unterteilen. Bspw. liegt der Kortex, als Teil der grauen Substanz, im Außenbereich des Gehirns und kann in verschiedene Schichten, Laminae genannt, unterteilt werden (Abb. 1). Das Corpus Callosum, als Teil der weißen Substanz, verbindet die beiden Gehirnhälften miteinander [5, 34, 35].

Der komplexe Aufbau des Gehirns basiert auf zwei Zelltypen.

Neben den schon erwähnten Neuronen mit ihrem Axon, welches Informationen weiterleitet, gibt es die Gliazellen. Gliazellen haben eine regulierende und unterstützende Wirkung auf die Neurone. Sie werden im ZNS in fünf Gruppen unterteilt, die jede für sich eine andere Funktion erfüllen (Tab. 1) [5, 34-36].

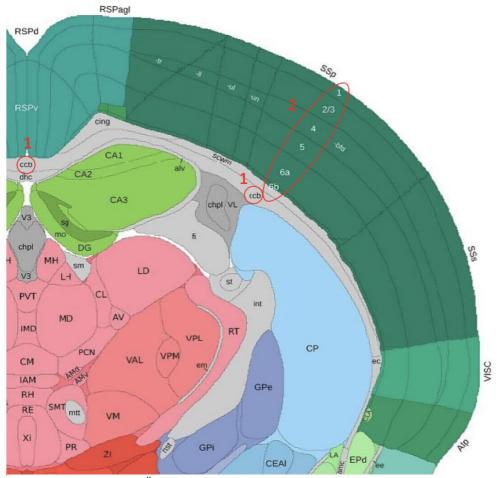


Abbildung 1: schematische Übersicht einer Gehirnhälfte im Frontalschnitt (Maus): 1 = ccb: Corpus Callosum; 2 = Lamina I bis VI des Kortex [6]

Zelltyp	Funktion			
Neurone	Erregungsbildung     Erregungsleitung     Informationsverarbeitung			
Gliazellen				
1. Astrozyten	Regulierung des inneren Milieus im ZNS     Beteiligung am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke     Phagozytose von abgestorbenen Synapsen     Narbenbildung im ZNS, z. B. nach Hirninfarkt, bei multipler Sklerose			
2. Mikrogliazellen	auf Phagozytose und Antigenverarbeitung spezialisierte Zellen (Makrophagen des Gehirns); sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren			
3. Oligodendrozyten	Bildung der Myelinscheide im ZNS			
4. Ependymzellen	kleiden Liquorraum des ZNS aus			
5. Zellen des Plexus choroideus	sezernieren Liquor cerebrospinalis			

Tabelle 1: Übersicht über die Zellen des ZNS und ihre Funktion [5]

#### 1.2.1 Oligodendrozyten

Eine Gruppe der Gliazellen sind Oligodendrozyten. Jeder Oligodendrozyt umhüllt mehrere Axone der Neurone mit seiner Membran aus Myelin [5, 34, 36]. Myelin hat einen isolierenden Effekt auf die elektrische Fortleitung, da es zu circa 70 % aus weißen Lipiden besteht [34]. Die Nerven übertragen Informationen dadurch schneller [5].

#### 1.2.2 Mikroglia

Formal sind auch Mikrogliazellen eine Gruppe der Gliazellen. Tatsächlich sind sie jedoch Teil des mononukleär-phagozytischen Systems des ZNS und wandern in der Embryonalzeit aus dem Dottersack ein [37]. Durch Regulation von Zelltod, -überleben und -entwicklung sowie Signalmodulierung an der Synapse haben sie Einfluss auf die Gehirnentwicklung [37]. Als Teil der Immunabwehr sorgen sie u.a. für die Aufnahme von Zellen oder Substanzen (Phagozytose), für die Präsentation von Antigenen (Bruchstücke dieser Substanzen oder Zellen) und für die Ausschüttung von Botenstoffen, den Zytokinen [5, 34, 36, 38]. Antigene sind Strukturen auf der Oberfläche von Zellen. Werden diese Zellen jedoch durch Mikroglia phagozytiert, präsentieren die Mikroglia diese Antigene auf der eigenen Oberfläche. Dies ermöglicht in Kombination mit den ausgeschütteten Zytokinen u.a. eine Aktivierung der weiteren Immunabwehr, v.a. der Bund T-Zellen [38]. Bei größeren Schäden lagern sich Mikrogliazellen zu Makrophagen zusammen [34, 37]. Zur Darstellung der Mikrogliazellen eignet sich IBA1 (engl. ionized calcium-binding adapter molecule 1).

#### 1.2.3 Astrozyten

Astrozyten sind die häufigsten Zellen im Gehirn eines Säugetieres [34]. Beim Menschen stellen sie circa die Hälfte aller Zellen des ZNS, bei der Maus ein Drittel [39]. Durch ihren verzweigten Aufbau können Sie mit bis zu 1000 anderen Zellen interagieren [40].

Die Funktionen der Astrozyten sind insgesamt sehr vielfältig. Ihre Aufgaben sind u.a. die Regulierung des Metabolismus von Energie, Wasser und des Blutflusses zur Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichtes von Ionen [41-43]. Astrozyten beeinflussen die synaptische Informationsübertragung durch Transmitterfreisetzung sowie -wiederaufnahme und durch Transportproteine [34, 44, 45]. Dies wird auch als Regulierung des inneren Milieus bezeichnet. Um dieser Aufgabe gerecht werden zu

können, nehmen Astrozyten am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke teil [46, 47]. Nach einer Schädigung kommt es *in vivo* und *in vitro* zur Proliferation der Astrozyten und zuletzt zur Narbenbildung, einer Astrogliose [47-49].

Astrozyten lassen sich unterschiedlich unterteilen, bspw. formabhängig, regionsspezifisch oder funktionsabhängig [7, 10, 50].

Die funktionelle Einteilung der Astrozyten in "A1" und "A2" ist an die Einteilung von Mikroglia in "M1" und "M2" adaptiert [2]. Sie basierte auf der Annahme, dass Mikroglia entweder eine proinflammatorische oder antiinflammatorische Wirkung haben, was inzwischen jedoch kritisch gesehen wird [51]. Ebenso ist die Wirkung von Astrozyten noch nicht vollständig geklärt; es gibt – ebenso wie bei den Mikroglia – Überlegungen hinsichtlich einer Einteilung in eine eher proinflammatorische (A1) gegenüber einer eher antiinflammatorischen (A2) Astrozyten-Gruppe; fraglich ist in beiden Fällen, ob nicht beides zugleich möglich ist [2, 11, 52].

Die formabhängige Einteilung trennt Astrozyten in protoplasmatische und fibrilläre Astrozyten (Abb. 2). Protoplasmatische Astrozyten kommen eher in der grauen Substanz vor und reichen mit ihren feinen Fortsätzen an die Synapsen und Blutgefäße heran. Sie interagieren mit der Synapse bei der synaptischen Übertragung von Informationen [53, 54]. Fibrilläre Astrozyten sind häufiger in der weißen Substanz des ZNS zu finden, haben dickere Fortsätze und interagieren ebenfalls mit den Blutgefäßen [48, 55].

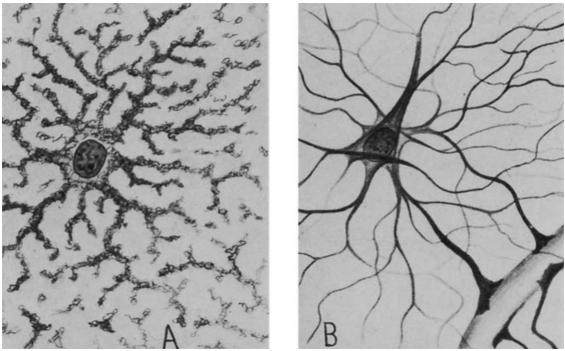


Abbildung 2: Illustration der Astrozyten nach del Río Hortega (1920); zitiert gemäß [7] aus [8] A: protoplasmatischer Astrozyt der grauen Substanz; B: fibrilliärer Astrozyt der weißen Substanz

Zur Darstellung der Astrozyten gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine Option ist die Markierung von GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*). GFAP wird von Astrozyten exprimiert und kann durch Bindung der immunfluoreszierende Antikörper an das GFAP dargestellt werden [56]. GFAP sichert u.a. die Stabilität der Blut-Hirn-Schranke, bildet jedoch lediglich das faserige Grundgerüst und stellt nur circa 15% der Fläche der Astrozyten dar [57-59]. Zudem ist die GFAP-Menge eines Astrozyten u.a. von der Lokalisation im Gehirn und der Aktivierung der Astrozyten abhängig [40, 48, 60]. Die Elektronenmikroskopie ist eine andere Möglichkeit; sie zeigt Astrozyten sehr detailreich, ist aufgrund ihrer Kosten und der dargestellten Fülle an Details jedoch nicht für große Flächen geeignet.

#### 1.3 Pathologische Veränderungen bei Multipler Sklerose

Läsionen der Multiplen Sklerose sind sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz nachweisbar [17, 61-64]. In Läsionen treten am häufigsten Mikroglia und Makrophagen auf [65-67]. Je mehr eingewanderte Mikrogliazellen in einer aktiven Läsion sind, desto größer wird der Schaden an den Neuronen und den Oligodendrozyten [68, 69]. Einzelne kleine Mikroglia initiieren die Schäden, während die Makrophagen das defekte Myelin phagozytieren [70-72]. Die Phagozytose ist wichtig für die Remyelinisierung der Axone und senkt die Entzündung um die Läsionen [14]. Entscheidend für die Stärke der Mikrogliareaktion scheint das Alter des Myelins ebenso wie der Stress der Oligodendrozyten zu sein, was in der aktuellen Forschung diskutiert wird [14, 73].

#### 1.3.1 Protektive Wirkung von Astrozyten bei Multipler Sklerose

Astrozyten und ihre protektiven wie auch inflammatorischen Effekte bei Multipler Sklerose sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Dabei bietet sich – unabhängig von der adaptierten funktionellen Einteilung – der Bezug zu Mikrogliazellen an. Beide Gruppen proliferieren bei Multipler Sklerose [52]. In Teilen der weißen Substanz proliferieren sie unabhängig voneinander, in anderen Bereichen des ZNS sind die Aktivierung und Proliferation der Mikroglia und Astrozyten jedoch wechselseitig beeinflusst [12, 59, 60, 74-76]. Die Interaktion kann sowohl eine verstärkte Migration der Mikroglia als auch eine Hemmung der Migration in die Region zur Folge haben [12].

Hinsichtlich der protektiven Wirkung gibt es unterschiedliche Aspekte, die im Folgenden näher beleuchtet werden.

Astrozyten regulieren die autoimmune Antwort über die Sekretion von Zytokinen, bspw. über verschiedene Interleukine, Chemokine oder den Tumornekrosefaktor APRIL, (engl.) a proliferation-inducing ligand [11, 77, 78]. APRIL wurde ursprünglich als Marker für das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom genutzt, wird jedoch in Läsionen von Multipler Sklerose auch durch Astrozyten sezerniert und bewirkt eine Hemmung der Entzündung [78, 79].

Die Aktivierung der Zytokine kann über verschiedene Wege wie bspw. Zellen (z.B. Oligodendrozyten) oder Proteine (z.B. engl. *Fatty acid binding protein 7*) eine Wirkung entfalten [80].

Bei Oligodendrozyten, als Beispiel für die Zellen als Zielort der Zytokineffekte, lässt sich unterscheiden, ob die Faktoren an der Proliferation, der Differenzierung oder dem Überleben der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, den unreifen Oligodendrozyten, wirken [13]. Astrozyten können durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren Oligodendrozytendifferenzierung auch nach einer Demyelinisierung fördern, zugleich aber auch die Remyelinisierung hemmen [9, 12, 13].

Ebenso konnte bereits nachgewiesen werden, dass die vermehrte astrozytäre Expression des (engl.) *Fatty acid binding protein* 7 die Demyelinisierung hemmt [80]. Dabei steht auch dieses Protein in Wechselwirkung mit Zytokinen.

Durch die Funktion der Astrozyten im gesunden Gehirn das Mikromilieu zu regulieren, bspw. durch die Aufrechterhaltung der Ionenbalance oder die Aufnahme von Glutamat, ermöglichen Astrozyten erst eine weitere neuronale Übertragung auch – und besonders – im pathologischen Zustand des Gehirns [48, 81, 82]. Die Aufnahme des Glutamats senkt zudem den Schaden an den Neuronen und Oligodendrozyten [83]. Um diese Regulation zu ermöglichen, senken Astrozyten den oxidativen Stress durch Inaktivierung von freien Radikalen. Dies kann durch die Bildung und Aktivierung von Glutathion oder Peroxiredoxin geschehen [81]. Durch die Senkung des oxidativen Stresses entstehen weniger Schäden an (extra-)zellulären Molekülen und die physiologischen Gleichgewichte bleiben bestehen.

Außerdem regulieren Astrozyten das (ambivalente) (Nicht-) Auftreten von Ödemen je nach zerebraler Schädigung, da sie für den Einbau verschiedener Transportproteine wie Aquaporin 4 in ihre Fortsätze verantwortlich sind, weshalb auch ihre Abwesenheit zu Ödemen führt [84, 85]. Diese Proteine transportieren Wasser entsprechend des osmotischen Gradienten. Dies ist möglich, da Astrozyten am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. [39, 43, 85]. Sie können mit den Zellen außerhalb des Gehirns interagieren und somit die Zahl an Transportmolekülen ebenso regulieren wie die Anzahl an infiltrierenden Zellen, bspw. durch Induktion einer Apoptose der Zellen [39]. In diesem Sinne wäre auch die Bildung der Astrogliose als Protektion der Neurone bei einer Schädigung denkbar.

#### 1.3.2 Phagozytose von Myelin durch Astrozyten

Neben diesen sehr unterschiedlichen Fähigkeiten soll noch einmal auf den anfänglichen Vergleich von Astrozyten zu Mikroglia eingegangen werden. Zwar sind noch nicht alle Aufgaben und Zusammenhänge erforscht, so ist aber die Phagozytose des defekten Myelins doch als die wichtigste Aufgabe erkennbar [37, 70, 86]. Durch die Phagozytose ist es Mikroglia möglich, Antigene zu präsentieren und die Regeneration einzuleiten [69, 73, 87].

Eine aktuelle Frage der Forschung ist, wie sehr sich die Aufgaben und Fähigkeiten von Astrozyten und Mikroglia gleichen. Sowohl in Tiermodellen als auch im menschlichen Gewebe konnte nachgewiesen werden, dass Astrozyten ebenfalls die Fähigkeit haben Antigene zu präsentieren [11, 39, 88]. Für die Präsentation ist es jedoch notwendig phagozytieren zu können. In der genetischen Analyse konnte für Astrozyten nachgewiesen werden, dass sie diese Gene zu besitzen [39]. Entsprechend konnte sowohl immunhistochemisch als auch im Elektronenmikroskop der Nachweis erbracht werden, dass eine Phagozytose von Myelin durch Astrozyten prinzipiell möglich ist [1, 4]. Strukturell zeigte sie im Falle einer Phagozytose eine Ähnlichkeit zwischen Makrophagen und Astrozyten [1]. Aktuell wird noch kontrovers diskutiert, wie die Aktivierung erfolgt, welche Unterschiede zwischen Astrozyten und Mikroglia bestehen und welche Aufgabe die Phagozytose bei Astrozyten erfüllt [2-4].

#### 1.4 Tiermodell

#### 1.4.1 Das Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Tiermodell basiert auf der Intoxikation mit dem Kupferchelator Bis-Cyclohexanon-Oxaldihydrazon [89]. Abhängig von der Intoxikationsdauer entsteht eine akute Demyelinisierung (bis circa sechs Wochen Intoxikationsdauer), die beginnend nach drei Wochen nachweisbar ist [90]. Das Modell zeigt eine gute Reproduzierbarkeit [89]. Die Demyelinisierung ist in der grauen und in Teilen der weißen Substanz verbreitet [89, 91-94]. Autoimmune Zellen haben keinen Einfluss auf die Läsionen [64, 89, 95]. Die Wirkweise von Cuprizone ist ungeklärt. Eine Theorie sieht die Ursache in der Hemmung der mitochondrialen Atmungskette, welche den Untergang der Oligodendrozyten bewirkt [89, 96].

#### 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Multiple Sklerose ist eine Erkrankung des ZNS, welche das Myelin zerstört. Bisher ist die Ursache für die Krankheit unklar ebenso wie die Wirkung aller Gehirnzellen und deren gegenseitige Beeinflussung im Rahmen der Multiplen Sklerose.

Die häufigsten Zellen im ZNS sind Astrozyten [34]. Zu ihren Aufgaben gehört im Gesunden die Regulierung des Metabolismus, der Aufbau der Blut-Hirn-Schranke und die Informationsübertragung im Zusammenspiel mit Synapsen und anderen Zellen wie Mikroglia [39, 41, 42, 44-47, 52]. Bei Multipler Sklerose zeigt sich, dass Astrozyten neuroprotektive und regenerative Fähigkeiten haben können. Neuroprotektive Astrozyten bilden Proteine, die die inflammatorischen Zytokine hemmen oder den oxidativen Stress verringern. Regenerativ fördern sie die Remyelinisierung durch die Oligodendrozyten mithilfe von Zytokinen oder proliferieren selbst, um durch eine Astrogliose die Regulation der Immunzellen wieder zu ermöglichen [13, 80]. Zudem können Astrozyten Antigene präsentieren, was auf die Fähigkeit von Astrozyten hinweist, auch phagozytieren zu können. Dabei scheinen sie Myelin zu phagozytieren, wobei die Funktion noch unklar ist [11, 39, 88].

Daher lassen sich für diese Arbeit zwei Ziele definieren.

Die bisherigen Erkenntnisse der Neuroprotektion zeigen Einflüsse auf die Entzündung um die Läsionen und damit auf die möglichen Schäden der Multiplen Sklerose. Daher stellt sich die Frage, ob Astrozyten in der Lage sind gegen eine – zumindest experimentelle – Demyelinisierung zu schützen.

Als zweites Ziel wird der Frage nachgegangen, ob der bisher immunhistochemische und elektronenmikroskopische Nachweis einer Phagozytose von Myelin durch Astrozyten auch immunfluoreszierend im frühen akuten Stadium im experimentellen Cuprizone-Modell nachweisbar ist.

Um beide Fragen zu untersuchen, wurde mithilfe des Cuprizone-Modells eine Demyelinisierung ohne Einflussnahme von Immunzellen initiiert. Nach einer immunfluoreszierenden Doppelfärbung von GFAP – für Astrozyten – und des Proteolipid-Proteins (PLP) – für Myelin – wurde der Anteil des Myelins innerhalb der Fortsätze verschiedener Astrozyten gemessen. Bei einer Protektion vor einer akuten Demyelinisierung müsste der Anteil an Myelin innerhalb der Fortsätze größer sein als der Anteil an Myelin außerhalb der Fortsätze, da Astrozyten in ihrer nächsten Umgebung die stärkste Protektion ermöglichen sollten. Mithilfe der immunfluoreszierenden Darstellung sollte es zudem möglich sein, Astrozyten mit phagozytiertem Myelin in ihrem Inneren dreidimensional abzubilden.

Da die Häufigkeit von Multipler Sklerose bei Frauen erhöht ist, wurden weibliche Tiere des Stamms C57BL6 genutzt. Die Ergebnisse jedes Modells sind vom Tierstamm abhängig [90].

#### 2 Material und Methodik

#### 2.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden gemäß des Tierversuchsantrages ROB-55.2Vet-2532.Vet-02-15-73 vom 26.07.2013 (§ 8 Tierschutzgesetz) unter Einhaltung der aktuell geltenden Tierschutzbestimmungen gehalten. Die Laborbedingungen der (engl.) *Federation of European Laboratory Animal Science Association* wurden eingehalten.

Die Mäuse, Stamm C57BL/6, wurden in Käfigen mit je zwei bis vier Artgenossen gehalten und die Käfige (Fläche: 435 cm²) entsprechend ausgestattet (Tab. 14). Die Käfige wurden montags, mittwochs und freitags gereinigt. Das Futter wurde während der Cuprizone-Intoxikationsphase täglich gewechselt, außerhalb der Intoxikationsphase jeden zweiten Tag. Futter und Wasser waren *ad libitum* vorhanden.

Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug jeweils 12 h. Die Raumtemperatur betrug  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Die Luftfeuchtigkeit lag bei  $55\% \pm 10\%$ . Für die Versuche wurden Mäuse mit einem Körpergewicht von circa 21 g ausgewählt. Zuvor lebten diese mindestens 14 Tage in konstanter Umgebung, um die Gefahr einer Stressreaktion auszuschließen.

#### 2.1.1 Cuprizone-Intoxikation

Da das Toxin Cuprizone eine reproduzierbare Myelinschädigung verursacht, wurde eine Intoxikation der Tiere durchgeführt. Das Toxin wurde alle zwei Tage frisch aus 200 g Futter und 0,5 g Cuprizone zubereitet (entspricht Cuprizone-Futter 0,25%) und in den Käfig gegeben. Die zweite Hälfte des vorgemischten Futters wurde jeweils bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Dieser Versuch wurde in drei Experimente untergliedert. Im ersten und zweiten Experiment wurden fünf Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils für drei Wochen mit Cuprizone intoxikiert; im dritten Experiment dauerte die Intoxikation mit Cuprizone der fünf Tiere fünf Wochen. Die Experimente zwei und drei begannen zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 3).

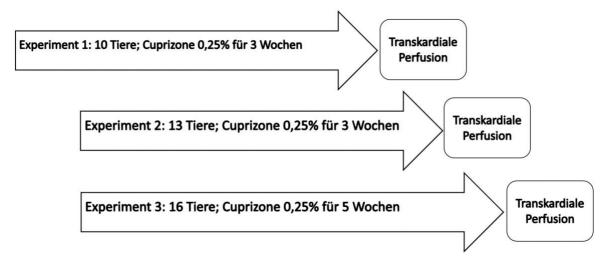


Abbildung 3: Cuprizone-Intoxikation

#### 2.2 Transkardiale Perfusion

Die Materialien sind in Kapitel 5 aufgelistet. Die Transkardiale Perfusion erfolgte in allen Experimenten protokollkonform.

- Schritt 1: Sedierung durch 0,7 ml/Tier mit einer Ketamin-Xylazin-Lösung intraperitoneal. Konzentration von 0,42% Ketamin und 0,021% Xylazin intraperitoneal (Kap. 5.4.8).
- Schritt 2: Eröffnung des Peritoneums mit dem OP-Besteck nach Erlöschen der Augenund Schwanzreflexe.
- Schritt 3: Anlage einer Safety-Multifly-Kanüle in den linken Ventrikel des Herzens.
- Schritt 4: Eröffnung des rechten Atriums zum Austritt von Blut und den Lösungen der Perfusion.
- Schritt 5: Injektion von 20 ml PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*) in den linken Ventrikel zur Entfernung von Blut aus dem Kreislaufsystem.
- Schritt 6: Zweifache Injektion in den linken Ventrikel von je 50 ml Formaldehyd-Perfusionslösung (Tab. 2). Aufgrund der hohen Natriumkonzentration der Perfusionslösung erfolgt bei jedem Tier eine Aktivierung der Muskulatur, was

als Zeichen einer ausreichenden Perfusion gilt.

Zu Schritt 6: Tabelle 2: Mithilfe eines Filterpapiers wurde die Lösung in 1 l bzw. 2 l große Schottflaschen abgefüllt und mit Eis gekühlt. Die Lösungen wurden 1 h vor Versuchsbeginn angesetzt.

100 ml Formaldehyd 37%			
900 ml destilliertes Wasser			
4,6 g NaH₂PO₄			
8 g Na₂HPO₄			

**Tabelle 2**: Herstellung der Perfusionslösung (1 Liter)

#### 2.3 Paraffineinbettung

Schritt 1: Abtrennung des Schädels vom restlichen Körper.

Schritt 2: Eröffnung des Gewebes über der Kalotte mit einer Schere.

Schritt 3: Mittige Eröffnung der Kalotte.

Schritt 4: Postfixation in einem mit 50 ml Perfusionslösung gefüllten Falcon bei 4°C für

mindestens 24 h.

Schritt 5: Nach der Postfixation vorsichtige
Präparation aus der Schädelkalotte.

Schritt 6: Waschung entsprechend Tabelle 3 im beschrifteten Einbettkästchen.

Schritt 7: Zur Färbung des fixierten Gewebes werden die in Paraffin eingebetteten Gehirne mittels Schlittenmikrotom in 5 µm dünne Schnitte geschnitten.

Schritt 8: Übertragung der Schnitte der Zielregion (Beginn der Hippocampusformation), eingeteilt nach Sidman Mouse Brain

Leitungswasser	6 h
50% Ethanol	über Nacht (ca. 12 h)
70% Ethanol	40 min
70% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
100% Ethanol	40 min
100% Ethanol	60 min
100% Ethanol	60 min
Xylol 1	40 min
Xylol 2	40 min
Xylol 3	40 min
Paraffin	60 min
Paraffin	60 min
Paraffin	2 Tage

Tabelle 3: Einbettung der Gehirne in Paraffin

Atlas [97]. Mithilfe von Seidenpapier erfolgt die Übertragung in ein 48°C heißes Wasserbad zur Entfaltung des Schnittes und dann Überführung auf die Objektträger. Sofern hierbei eine Beschädigung sichtbar war, wurde der Schnitt entfernt und wie zuvor weiterverfahren.

Schritt 9: 3 - 4 h Lufttrocknung bei Raumtemperatur.

Schritt 10: Trocknung im Wärmeschrank bei 48°C über Nacht (circa 16 h). Lagerung bei Raumtemperatur.

Die Schritte des ersten Experiments erfolgten bis zur Waschung mit Ethanol 50% entsprechend Tabelle 3 in München; die weiteren Schritte bis zur vollständigen Einbettung im Institut der Neuroanatomie der medizinischen Fakultät der RTWH Aachen. Alle weiteren Schritte erfolgten protokollgemäß. Die Postfixation des zweiten und dritten Experiments erfolgte in München protokollgemäß.

Im ersten Experiment wurden alternierend zehn Schnitte verwendet und die nachfolgenden zehn Schnitte verworfen. Im zweiten und dritten Experiment wurden alle nutzbaren Schnitte der relevanten Regionen auf Objektträger überführt.

#### 2.4 Doppelte Immunfluoreszenz

Für die Färbung der fixierten Schnitte in Paraffin mithilfe einer doppelten Immunfluoreszenz wurden die Schnitte entsprechend Tabelle 4 entparaffiniert und rehydriert.

Die Schnitte wurden doppelt immunfluoreszierend gefärbt. (Kap. 5). Im Anschluss an die Aufzählung der einzelnen Schritte werden diese näher erläutert.

Xylol 1	10 min
Xylol 2	10 min
Xylol 3	10 min
50% Xylol / 50% Ethanol	5 min
100% Ethanol	3 min
100% Ethanol	3 min
96% Ethanol	3 min
96% Ethanol	3 min
70% Ethanol	3 min
50% Ethanol	3 min
Destilliertes Wasser	3 min

**Tabelle 4:** Absteigende Reihe der Alkohole und Kohlenwasserstoffe

Schritt 1: HIER (engl. Heat Induced Epitope Kohlenwasserstoffe

Retrieval): Erwärmung der Pufferlösung Tris/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) bis zum Kochen mit anschließender 10-minütiger Warmhaltung.

Schritt 2: Abkühlung auf Raumtemperatur durch von außen fließendem Leitungswasser.

Schritt 3: Dreifacher Waschvorgang mit PBS je 5 min.

Schritt 4: Ziehen einer hydrophoben Grenze um den Schnitt mit einem "ImmEdge"-Stift.

Schritt 5: Blocken mit DBS 2% (engl. *Donkey Blocking Serum*) und Inkubation für 1 h in einer Feuchtkammer bei 26°C.

Schritt 6: Inkubation über Nacht in der Feuchtkammer bei 4°C mit Primärantikörpern (Tab. 5). Zeitgleiche Durchführung von Negativkontrollen.

Antikörper	Färbung von	Klone	Hersteller	Katalog- nummer
Huhn anti-GFAP	Astrozyten	polyklonal	Abcam, UK	AB4674
Hase anti-IBA1	Makrophagen, Mikroglia	polyklonal	Fujifilm Wako Pure Chem. Corp., Japan	019-19741
Maus anti-PLP	Myelin	monoklonal	Serotec, Bio- Rad, UK	MCA839G

Tabelle 5: Primärantikörper doppelte Immunfluoreszenz

Schritt 7: Dreifacher Waschvorgang mit PBS je 5 min.

Schritt 8: Zentrifugation beider sekundärer Antikörper für 1 min bei 4000 RPM (engl. *Rounds per Minute*) (Tab. 6). Inkubation mit den sekundären

Antikörpern (1:200 mit DBS 5%) für 1,5 h bei 26°C in einer abgedunkelten Feuchtkammer.

primäre Antikörper	Sekundärer fluoreszierender Antikörper	Hersteller	Katalog- nummer	Verdünnung
GFAP- Fluoreszenz	Alexa Fluor Ziege anti-Huhn 594	Life Technologies, Waltham, USA	A11008	1:200
IBA1- Fluoreszenz	Alexa Fluor Esel anti-Hase 594	Life Technologies, Waltham, USA	A21207	1:200
PLP- Fluoreszenz	Alexa Fluor Esel anti-Maus 488	Life Technologies, Waltham, USA	A21202	1:200

Tabelle 6: Sekundärantikörper doppelte Immunfluoreszenz

Schritt 9: Zeitgleiche Durchführung von Negativkontrollen.

Schritt 10: Dreifacher Waschvorgang mit PBS je 5 min.

Schritt 11: Inkubation mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Stock B und destilliertem Wasser (1:10) für 5 min bei 26°C.

Schritt 12: Dreifacher Waschvorgang mit PBS je 5 min.

Schritt 13: Konservierung mittels eines Tropfens FluorPreserve auf einem Deckgläschen.

Beschwerung mit Gewichten für 20 min.

Schritt 14: Abdichtung der Ränder zwischen Deckgläschen und Objektträger mit klarem Nagellack.

Schritt 15: Lagerung in einer verschlossenen Objektträgerkassette bei 4°C.

Zur weiteren Erläuterung der Schritte:

Zu Schritt 5: Das unspezifische Blocken verringert eine Färbung des Hintergrundgewebes. Färbungen entstehen v.a. aufgrund von hydrophoben und elektrostatischen Kräften.

Zu Schritt 6: Die Fragestellung erforderte die doppelte Immunfluoreszenz von a) Astrozyten und Myelin sowie von b) Mikroglia und Myelin.

- a) Astrozyten und Myelin: 15 Schnitte wurden mit einer grün fluoreszierenden (488 nm) immunhistologischen Färbung von PLP zur Darstellung des Myelins und mit einer rot fluoreszierenden (594 nm) immunhistologischen Färbung von GFAP zur Darstellung der Astrozyten gefärbt. Die Mischung der primären Antikörper bestand aus 3 μl des PLP-Antikörpers (1:1000 Verdünnung) mit 1,5 μl des GFAP-Antikörpers (1:2000 Verdünnung) und 2995,5 μl des DBS 2%.
- b) Mikroglia und Myelin: Es wurden drei Schnitte mit einer grün fluoreszierenden (488 nm) immunhistologischen Färbung von PLP – zur Darstellung des Myelins – und mit einer rot fluoreszierenden (594nm) immunhistologischen Färbung von IBA1 – zur Darstellung der Makrophagen und Mikroglia – gefärbt. Die Mischung primären Antikörper bestand aus 2 μl des PLP-Antikörpers (1:1000 Verdünnung) mit 1 µl des IBA1-Antikörpers (1:2000 Verdünnung) und 1997 µl des DBS 5%. Das DBS 5% wurde für diesen Versuch ohne Triton hergestellt, weil die Lösung in den vorherigen Versuchen dieser Doppelfärbung eine zu geringe Viskosität hatte. Dadurch waren die Gewebsschnitte durch mangelnde Feuchtigkeit nicht gut erkennbar. Diese Änderung des Protokolls wurde zuvor in anderen Versuchen verifiziert (Kap. 5.4.6).

#### Negativkontrollen:

Um auszuschließen, dass sekundäre Antikörper an andere Epitope oder an die Bindungsstelle des anderen primären Antikörpers binden, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Verschiedene zusätzliche Schnitte wurden in Schritt 6 nur mit dem ersten oder nur mit dem zweiten oder mit keinem der beiden Primärantikörper inkubiert. Die Inkubation mit beiden Sekundärantikörpern erfolgte jedoch protokollkonform. In Schritt 8 wurden ebenso Negativkontrollen durchgeführt. Protokollkonforme, mit beiden Primärantikörpern inkubierte Schnitte wurden nur mit dem ersten oder nur mit dem zweiten oder mit keinem der beiden Sekundärantikörper inkubiert.

Alle Negativkontrollen der Schritte 6 und 8 zeigten die jeweils erwarteten Ergebnisse, sodass eine Interaktion der Antikörper untereinander ausgeschlossen werden konnte.

#### 2.5 Auswertung

#### 2.5.1 Digitalisierung der Immunfluoreszenz

Die Schnitte wurden in zweidimensionaler und dreidimensionaler Darstellung digitalisiert. Zur präziseren Unterteilung und detaillierten Digitalisierung wurden beide Gehirnhälften nacheinander untersucht.

Die Digitalisierung erfolgte durch eine konfokale Mikroskopie mit dem Olympus BX51WI (Tab. 16). Dieses enthält eine Olympus BX-DSU Kamera und eine SOLA LED-Lampe. Diese Einheit ist in der Lage, Wellenlängen zwischen 350-700 nm zu erkennen. Zunächst erfolgte die zweidimensionale Darstellung der GFAP- und PLP-Färbung in 20-facher Objektiv-Vergrößerung. Nach Markierung des Corpus Callosum (weiße Substanz) sowie der Laminae V und VI (graue Substanz) wurde der Schnitt gescannt. In Lamina VI ist die Abgrenzung der einzelnen Astrozyten voneinander gut möglich. Für die Scans sind die Belichtungszeit und die Sensitivität abhängig von der jeweiligen Wellenlänge gewählt worden. Bei einer Wellenlänge von 350 nm erfolgte eine Belichtungszeit von 16,160 ms, es wurde eine Sensitivität von 0 eingestellt; bei 488 nm lag die Belichtungszeit bei 40,340 ms mit einer Sensitivität von 9; bei 594 nm dauerte die Belichtung 10,460 ms bei einer Sensitivität von 13.

Für den dreidimensionalen Vergleich wurde ein Schnitt in einer 4-fachen Vergrößerung zuerst zweidimensional digitalisiert. In dieser Vergrößerung wurde der Bereich um das Corpus Callosum markiert. Dieser markierte Bereich wurde dreidimensional in einer 20fachen Vergrößerung dargestellt (Abb. 8), da eine vollständige Digitalisierung aufgrund der Datengröße eine zu hohe Rechenkapazität bedeutet hätte. In der dreidimensionalen Darstellung wurden dann jene Astrozyten (594 nm Wellenlänge, rot) erneut markiert, deren Zellkern (350 nm Wellenlänge, blau) vollständig in allen Ebenen darstellbar war. Diese markierten Astrozyten wurden bei einer 60-fachen Vergrößerung mit einem Schichtabstand 0,1µm in mehreren z-Ebenen digitalisiert. Für eine ausreichende Klardarstellung wurde dies als konfokaler dreidimensionaler Scan durchgeführt. Für die 60-fache Vergrößerung wurden abweichende Belichtungszeiten und Sensitivitäten genutzt; bei den übrigen Scans wurden die oben genannte Belichtungszeiten und Sensitivitäten übernommen. Bei der 60-fachen Vergrößerung dauerte die Belichtungszeit 253,46 ms bei einer Wellenlänge 350 nm und einer Sensitivität von 0; bei 488 nm lag die Belichtungszeit bei 181,42 ms mit einer Sensitivität von 33; bei 594 nm dauerte die Belichtung 293,77 ms bei einer Sensitivität von 13.

Die mit anti-IBA1 und anti-PLP gefärbten Schnitte wurde nach der gleichen Methodik digitalisiert.

#### 2.5.2 Die zweidimensionale immunfluoreszierende Darstellung

Falls Astrozyten einen protektiven Effekt auf die Demyelinisierung haben, so sollte es innerhalb der Astrozytenfortsätze (Inside) einen höheren Anteil an Myelin geben als an einer astrozytenfreien Stelle (Outside).

Untersucht wurde die Hypothese im Bereich der Lamina multiformis (Lamina VI) des Isokortex. Lamina VI lässt sich zur Lamina V und dem Corpus Callosum durch geringere Mengen an Myelin abgrenzen. Dadurch sind dort Effekte aufgrund einer akuten Demyelinisierung gut erkennbar und werden nicht durch einen hohen Myelinanteil überdeckt. Zudem sind die Astrozyten ohne Überlagerung durch Myelin gut voneinander abgrenzbar.

Im Bereich der Lamina VI wurden alle Fortsätze der Astrozyten im Folgenden dahingehend untersucht, ob ihre Fortsätze parallel zur zweidimensionalen Ebene verliefen. Sofern dies der Fall war, erfolgte innerhalb der Fortsätze die Markierung als ROI (engl. *Region of Interest*) mit dem Programm ImageJ (engl. *polygon selection*, Speicherung als ROI mittel der Taste "T"). Somit sind nicht alle Fortsätze Teil der Auswertung. Nach Markierung aller ROIs im gesamten Schnitt als Inside-Flächen, wurde jede ROI für den Vergleich zwischen innerhalb der Fortsätze und außerhalb der Fortsätze parallel zum Corpus Callosum verschoben. Dabei liegt innerhalb der neuen Platzierung kein Teil eines Astrozyten oder Zellkerns (Abb. 4). Die parallele Verschiebung zum Corpus Callosum ist wichtig, da es auch innerhalb von Lamina VI verschiedene Anteile an Myelin gibt und so ein vergleichbarer Myelinanteil vorlag.

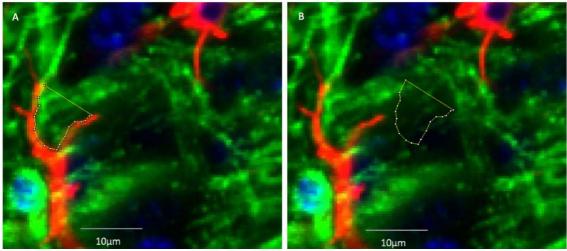


Abbildung 4: ROI A: innerhalb der Fortsätze; B: außerhalb der Fortsätze

Danach folgte mit der Software ImageJ eine Darstellung zur Unterscheidung, ob Myelin vorhanden oder nicht vorhanden war. Dazu wurde der Schnitt in eine 8-Bit Darstellung in Grautönen umgewandelt [98]. Über das (engl.) *Threshold* "Isodata" erfolgte im nächsten Schritt die Umwandlung in eine schwarz-weiß Darstellung (i.e., binär) [98]. Eine Verzerrung durch fehlerhaft belichtete Pixel wurde durch die Option "Ignore Black" korrigiert.

Mithilfe der Funktion (engl.) *measure* wurde für jede ROI die relative Fläche und der Anteil an anti-PLP Signal gemessen, also übersetzt der Anteil an Myelin in der jeweiligen ROI.

Insgesamt wurden 1417 Stellen innerhalb von Astrozytenfortsätzen verglichen. Dabei handelt es sich um 243 Stellen aus dem ersten Experiment, 547 Stellen aus dem zweiten Experiment und 627 Stellen aus dem dritten Experiment.

#### 2.5.3 Die dreidimensionale immunfluoreszierende Darstellung

Das Programm Neurolucida 360 stellte die GFAP-positiven Zellen dar (Abb. 8-10). Die unterschiedlichen Flächen wurden auf eine grüne anti-PLP-Färbung untersucht, die in den roten GFAP-positiven Zellen eingeschlossen sind. Die Untersuchung wurde in allen drei Achsen vorgenommen, um einen Einschluss des anti-PLP-Signals aus allen Richtungen sicherzustellen.

Die Darstellung einer Myelinphagozytose in Mikrogliazellen erfolgte mit der gleichen Methodik.

#### 2.5.4 Statistische Auswertung der Immunfluoreszenz

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Tab. 16). Die Messwerte wurden mithilfe des Shapiro-Wilk- und des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Parametrie überprüft. (Tab. 7).

	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
	Inside	Outside	Inside	Outside	Inside	Outside
Shapiro-Wilk Test						
P-Wert	0,9674	0,9435	0,9616	0,9581	0,9103	0,9037
Normalverteilung (alpha = 0,05)?	nein	nein	nein	nein	nein	nein
P-Wert Zusammenfassung	***	****	****	****	****	****
Kolmogorov-Smirnov Test						
P-Wert	0,06141	0,09204	0,06391	0,07721	0,1244	0,1321
Normalverteilung (alpha = 0,05)?	nein	nein	nein	nein	nein	nein
P-Wert Zusammenfassung	*	****	****	***	****	****
Anzahl an Testwerten	243	243	547	547	627	627

Tabelle 7: Ergebnisse des Shapiro-Wilk & Kolmogorov-Smirnov Tests je im Vergleich innerhalb der Fortsätze (Inside) und außerhalb der Fortsätze (Outside)

Es handelt sich somit um nicht-parametrische Daten bei gleichzeitig unabhängigen Variablen. Daher wurde die Unterschiede aller Mediane mit einem Kruskal-Wallis-Test und die Signifikanz mit einem Mann-Whitney-U-Test untersucht (Tab. 9 & 12) [99]. Die Mittelwerte werden im Folgenden ± Standardfehler angeben.

## 3 Ergebnisse

#### 3.1 Astrozyten und ihr Einfluss auf Myelin

#### 3.1.1 Myelinanteil innerhalb und außerhalb der Astrozytenfortsätze

Mithilfe der Immunfluoreszenz wurde der Anteil an Myelin innerhalb sowie außerhalb der Fortsätze von Astrozyten im Cuprizone-Modell untersucht. Astrozyten sind mittels roter anti-GFAP-Färbung dargestellt. Das Myelin wird mit der grünen anti-PLP-Färbung dargestellt (Abb. 4). Dabei werden die Vorteile des Cuprizone-Modells hinsichtlich der Reproduzierbarkeit sowie die vermehrte Cuprizone-Auswirkung bei längerer Einnahme ausgenutzt. Den Tieren der Experimente 1 und 2 wurden über einen Zeitraum von drei Wochen das Toxin Cuprizone dem Futter beigefügt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Anteilen an Myelin bei Inside und Outside des gleichen Experiments, ebenso zwischen den Experimenten 1 Outside und den Werten des Experiments 2 Inside (Abb. 5 und Tab. 8 & 9). Die fehlende bzw. nur geringe Signifikanz zwischen den Inside-Werten der Experimente 1 und 2 sowie den Outside-Werten der Experimente 1 und 2 entspricht der bekannten guten Reproduktion des Cuprizone-Modells. Warum zwischen Inside-Werten des Experiments 1 und den Outside-Werten des Experiments 2 keine Signifikanz erkennbar ist, könnte an der geringen Zahl an Proben (n= 243) liegen.

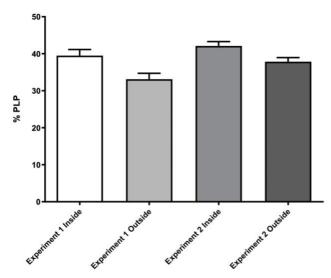


Abbildung 5: Vergleich der dreiwöchigen Experimente. Da sich die Ergebnisse und Intoxikation der Experimente 1 & 2 (je drei Wochen) nicht unterscheiden, können diese zusammengefasst werden (% PLP = gemessener Anteil an anti-PLP)

	Exp. 1 Inside	Exp. 1 Outside	Exp. 2 Inside	Exp. 2 Outside
Anzahl an Testwert	243	243	547	547
Mittelwert	39,50	33,12	42,10	37,85
Standardabweichung	25,60	24,94	27,65	25,81
Mittelwertabweichung	1,642	1,600	1,182	1,104

**Tabelle 8:** Relativer optischer Anteil an anti-PLP innerhalb zweier Astrozyten-Fortsätze (Inside)  $39.5 \pm 1.6\%$  bzw.  $42.1 \pm 1.2\%$ , außerhalb von Astrozyten Fortsätzen (Outside)  $33.1 \pm 1.6\%$  bzw.  $37.9 \pm 1.1\%$ , nach drei Wochen mit Cuprizone der Experimente (Exp.) 1 & 2

Mann-Whitney-U-Test	Signifikant?	Signifikanzniveau	Angepasster P-Wert
Exp. 1 Inside vs. Exp. 1 Outside	Ja	**	0,0046
Exp. 1 Inside vs. Exp. 2 Inside	nein	nicht signifikant	0,3223
Exp. 1 Inside vs. Exp. 2 Outside	nein	nicht signifikant	0,3482
Exp. 1 Outside vs. Exp. 2 Inside	Ja	***	<0,0001
Exp. 1 Outside vs. Exp. 2 Outside	Ja	*	0,0167
Exp. 2 Inside vs. Exp. 2 Outside	Ja	*	0,0135

Tabelle 9: Mann-Whitney-U-Test bei drei Wochen Intoxikationszeit zur signifikanten Unterscheidung der Experimente (Exp.) 1 & 2 untereinander, je im Vergleich innerhalb der Fortsätze (Inside) und außerhalb der Fortsätze (Outside)

Fasst man die Experimente 1 und 2 aufgrund der gleichen Intoxikationsdauer von drei Wochen zusammen, zeigt sich ein geringerer Anteil an anti-PLP-Färbung außerhalb der Astrozytenfortsätze (Outside) als innerhalb dieser (Inside). Bei längerer Exposition mit Cuprizone – wie in Experiment 3 mit fünf Wochen Exposition – zeigt sich die geringere anti-PLP-Färbung ebenfalls (Abb. 6 und Tab. 10). Setzt man die Experimente entsprechend ihres anti-PLP-Anteils zueinander ins Verhältnis, ist der Unterschied deutlicher erkennbar (Abb. 7). Der anti-PLP-Anteil der Experimente 1 und 2 ist signifikant stärker ( $p \le 0,05$ ) innerhalb der Astrozytenfortsätze (Inside) als außerhalb (Outside) ( $100\% \pm 2,3\%$  vs.  $88,1\% \pm 2,2\%$ ). Im Mann-Whitney-U-Test zeigt sich jedoch auch, dass der Unterschied beim dritten Experiment nicht mehr signifikant ist, tendenziell jedoch weiterhin besteht (Tab. 11 & 12).

Die Ergebnisse zeigen somit, dass innerhalb der Astrozytenfortsätze mehr anti-PLP-Signal zu finden ist.

	Exp. 1 & 2 Inside	Exp. 1 & 2 Outside	Exp. 3 Inside	Exp. 3 Outside
Anzahl an Testwert	790	790	627	627
Mittelwert	41,30	36,39	29,16	27,57
Standardabweichung	27,05	25,62	25,28	24,69
Mittelwertabweichung	0,962	0,912	1,010	0,986

**Tabelle 10:** Mittelwert und Standardabweichungen des anti-PLP-Anteils der Experimente (Exp.), entsprechend zu Abbildung 6

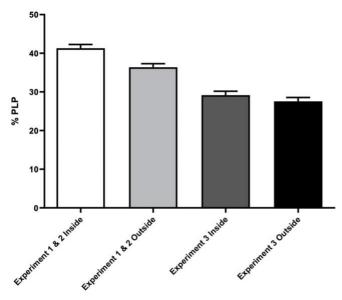


Abbildung 6: Anteil des anti-PLPs bei unterschiedlicher Intoxikationsdauer von Cuprizone (Experimente 1 & 2 für je drei Wochen, Experiment 3 für fünf Wochen) sowie des Messortes innerhalb (Inside) oder außerhalb (Outside) der Astrozytenfortsätze (% PLP = gemessener Anteil an anti-PLP)

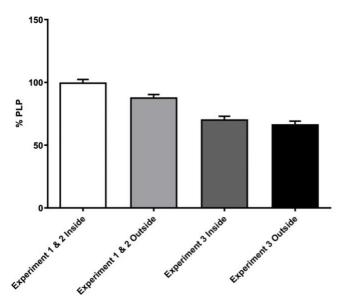


Abbildung 7: Verhältnis des anti-PLP-Anteils zwischen den in Abbildung 6 beschriebenen Experimenten (% PLP = gemessener Anteil an anti-PLP)

	Exp. 1 & 2 Inside	Exp. 1 & 2 Outside	Exp. 3 Inside	Exp. 3 Outside
Anzahl an Testwert	790	790	627	627
Mittelwert	100	88,12	70,6	66,76
Standardfehler des Mittelwerts	2,33	2,207	2,445	2,387

**Tabelle 11:** Verhältnis des anti-PLP-Anteils bezogen auf den maximalen Anteil bei Experiment (Exp.) 1 & 2 innerhalb der Fortsätze (Inside) = 100% (zu Abb. 7)

Mann-Whitney-U-Test	Signifikant?	Signifikanzniveau	Angepasster P-Wert
Exp. 1 & 2 Inside vs. Exp. 1 & 2 Outside	Ja	***	0,0003
Exp. 1 & 2 Inside vs. Exp. 3 Inside	Ja	***	<0,0001
Exp. 1 & 2 Inside vs. Exp. 3 Outside	Ja	***	<0,0001
Exp. 1 & 2 Outside vs. Exp. 3 Inside	Ja	***	<0,0001
Exp. 1 & 2 Inside vs. Exp. 3 Outside	Ja	***	<0,0001
Exp. 3 Inside vs. Exp. 3 Outside	Nein	nicht signifikant	0,2656

Tabelle 12: Mann-Whitney-U-Test bei drei und fünf Wochen Intoxikationszeit zur signifikanten Unterscheidung der Experimente (Exp.) 1 & 2 gegenüber 3. Es zeigt sich, dass sich innerhalb der Astrozytenfortsätze (Inside) mehr anti-PLP-Antikörper an PLP binden können als außerhalb (Outside). Der Vergleich der Experimente untereinander zeigt die bekannte Cuprizone-Wirkung (Abb. 6 & 7)

### 3.1.2 Immunfluoreszierender Nachweis der Myelinphagozytose im ZNS

Die Phagozytose von beschädigtem Myelin konnte bereits in IBA1-positiven Zellen nachgewiesen werden [69]. IBA1 ist der Marker für Mikroglia und Monozyten. Um den grundsätzlichen Nachweis zu erbringen, dass eine Kolokalisation mithilfe einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung darstellbar ist, wurde daher eine PLP-IBA1-Doppelfärbung durchgeführt.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen entsteht der Eindruck, dass eine solche Phagozytose von geschädigtem Myelin ebenfalls im Astrozyten möglich ist. Fraglich ist, ob dies mit der Immunfluoreszenz darstellbar ist [1, 4, 100].

Die dreidimensionale Übersicht des Corpus Callosum zeigt die immunfluoreszierende Doppelfärbung von anti-PLP (grün) und anti-GFAP (rot) (Abb. 8). Die klare rote Grenze in der linken Bildhälfte stellt die Grenze zum Ventrikel dar, wo viele Astrozyten GFAP exprimieren. In der detaillierteren Darstellung eines Astrozyten sind die Ebenen von oben nach unten dargestellt (Abb. 9). Es zeigt sich die rot GFAP-gefärbte Zelle mit angrenzendem blau DAPI-gefärbten Zellkern. Diese beinhaltet ein grünes anti-PLP-Signal und wird von allen Seiten umschlossen.

Abbildung 10 zeigt in der gleichen farblichen Darstellung das gleiche Ergebnis aus drei Perspektiven. Im Gegensatz zu Abbildung 9 wird in Abbildung 10 jedoch der Fortsatz eines Astrozyten dargestellt und nicht der Zellkörper. Eine Überlagerung des grünen PLP-Signals durch das rote GFAP-Signal zeigt sich in allen drei Perspektiven. In verschiedenen Ebenen zeigt sich jedoch auch hier ein Einschluss des PLP-Signals. Die Ergebnisse beweisen somit, dass Astrozyten Myelin aufnehmen können.

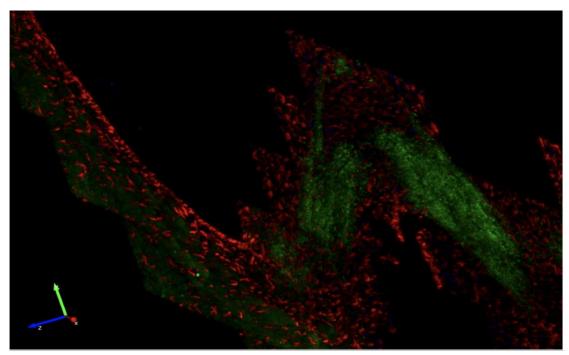


Abbildung 8: Immunfluoreszierende 3D-Darstellung des Corpus Callosum, Experiment 2; Übersichtsaufnahme; Blau: DAPI (Zellkern), Grün: PLP (Myelin), Rot: GFAP (Astrozyt)

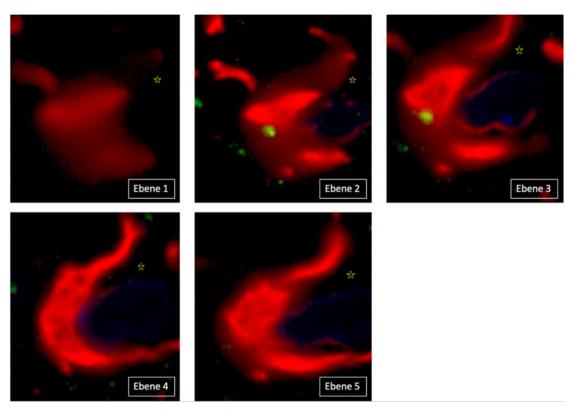


Abbildung 9: Immunfluoreszierende Darstellung in Schnittbildern Experiment 2; Corpus Callosum; Blau: DAPI (Zellkern), Grün: PLP (Myelin), Rot: GFAP (Astrozyt). Die Darstellung zeigt verschiedene Ebenen eines Astrozytenzellkörpers (rot) mit angrenzendem Zellkern (blau). Das Myelin (grün) ist von allen Ebenen eingeschlossen. Der Stern dient als unveränderlicher Fixpunkt in der Abbildungsreihe (Ebene 1 oben, Ebene 5 unten)

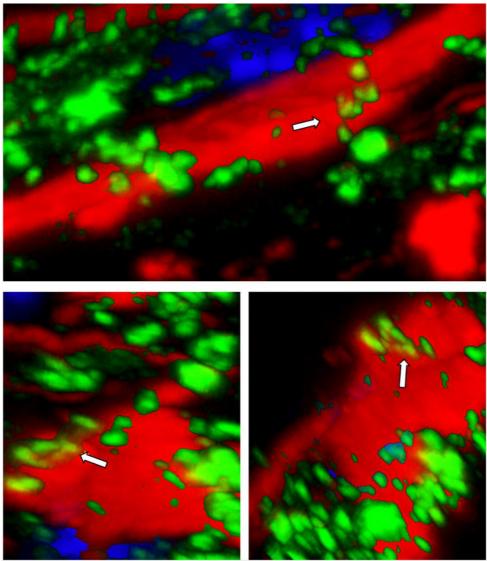


Abbildung 10: Darstellung aus drei Perspektiven; Experiment 2; Pfeil: Phagozytose von Myelin in einem Astrozytenfortsatz; Blau DAPI, Grün: PLP, Rot: GFAP

#### 4 Diskussion

#### 4.1 Astrozyten und ihre protektive Wirkung auf Myelin

Eine Fragestellung dieser Arbeit war es, den Einfluss von Astrozyten auf Myelin bei Multipler Sklerose genauer zu untersuchen. Dafür wurde eine akute Demyelinisierung mithilfe des Cuprizone-Tiermodells induziert, Astrozyten und Myelin gefärbt und der Anteil an Myelin innerhalb (Inside) und außerhalb (Outside) der Astrozytenfortsätze gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass nach einer dreiwöchigen Intoxikation innerhalb der astrozytären Fortsätze eine signifikant höhere Menge an Myelin vorliegt als außerhalb der Fortsätze. Bei einer fünfwöchigen Intoxikation sinkt die Menge an Myelin insgesamt. Dadurch ist der Unterschied innerhalb und außerhalb der Fortsätze nicht mehr signifikant, zeigt jedoch die gleiche Tendenz einer Protektion des Myelins innerhalb der Fortsätze. Als weiteres Ergebnis wurde in einer dreidimensionalen immunfluoreszierenden Darstellung eine Phagozytose von Myelin in Astrozyten nachgewiesen. Diese wurde schon zuvor aufgrund von Bildern im Elektronenmikroskop beschrieben und sollte nun mithilfe einer einfacheren Darstellung verifiziert werden [1, 4].

#### 4.1.1 Astrozytäre Protektion des Myelins

Eine Limitation der Auswertung stellt die Färbung des GFAPs dar, da nur circa 15% der Oberfläche eines Astrozyts gefärbt werden [57-59]. Dennoch ist GFAP ein sehr valider Marker für Astrozyten. Durch die intensive Forschung konnte nachgewiesen werden, dass GFAP bei Astrozyten das wichtigste Filament ist [55]. Negative Einflüsse, bspw. durch einen unkontrollierten Tag-Nacht-Rhythmus, der Einfluss auf die GFAP-Konzentration hat, können ausgeschlossen werden [101]. Positiv ist die sensitive Reaktion von GFAP auf Schädigungen [55]. Dabei erhöht sich die Dicke der Fortsätze durch die Schädigung, zugleich entwickelt sich kein größeres Volumen der Astrozyten [59]. Durch die Hypertrophie nach einer Schädigung ist die Sichtbarkeit der Astrozyten sogar erhöht. Da die Grenzen der Fortsätze jedoch entlang der GFAP-Markierung gezogen wurden, ist es möglich, dass nicht gefärbte Anteile in die markierten Bereiche eingeschlossen wurden. Somit wäre der Myelinanteil innerhalb der Fortsätze geringer als er es bei einer vollständigen GFAP-Markierung wäre. Der Anteil an Myelin außerhalb der Fortsätze jedoch sollte von dieser Limitierung nicht betroffen sein, da dort auf einen

Abstand zu Astrozyten oder Zellkernen geachtet wurde. Daraus folgt, dass die protektive Wirkung der Astrozyten durch die Ergebnisse sogar unterschätzt werden könnte.

Der zuvor erwähnte Abstand zu anderen Astrozyten stellt eine weitere Limitation dar, da die Verschiebung der Fläche vollständig parallel zum Corpus Callosum erfolgen musste. Lagen in dem gewählten Bereichen Teile eines Astrozyten oder Zellkerns, sodass eine parallele Verschiebung nicht möglich war, so wurde der Fortsatz grundsätzlich nicht Teil der Auswertung. Somit sind nicht alle Fortsätze Teil der Auswertung.

Um die Ergebnisse dennoch zu validieren, sollten anderen Marker für Myelin und Astrozyten in Betracht gezogen werden.

Anstelle von PLP lässt sich u.a. auch CNPase (engl. 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) zur Darstellung von Myelin nutzen [102]. Als ein häufiges Protein im ZNS ist es essenziell für die funktionierende Interaktion von Myelin und Axon, jedoch ist seine genaue Funktionsweise noch ungeklärt [103].

Ein anderer Marker wäre das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG). Bei MAG handelt es sich um einen transmembranen Rezeptor und zugleich Ligand [104]. Dadurch ergibt sich ein funktionell sehr breites Spektrum, u.a. stellt er die Verbindung zwischen Myelin und dem Axon sicher [104]. Zudem beeinflusst MAG die Myelinisierung während der Entwicklung [105].

Wie schon zuvor bei Myelin sollte auch Astrozyten nicht nur mithilfe eines Markers dargestellt werden.

So wären andere Intermediärfilamente als GFAP wie bspw. Vimentin zu verwenden, da Vimentin auch ein wichtiger Baustein der Astrozyten ist [59, 106]. Jedoch verlagert sich bei der Reifung der Astrozyten der Anteil an Vimentin zu GFAP, sodass Vimentin teilweise nicht mehr nachweisbar ist [107].

Eine bessere Wahl wäre das bereits erwähnte, osmotisch wirksame Aquaporin 4 [108]. Aquaporin 4 ist ebenfalls spezifisch für Astrozyten – nach einer Schädigung und damit einhergehender Astrogliose [109, 110]. Jedoch ist – zumindest bei humanen Proben – zu beachten, dass es keine hohe Spezifität für eine Multiple Sklerose gibt, sondern auch bei anderen Krankheiten, v.a. eine Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung, vermehrt auftritt [109, 110].

Ebenso wäre das Protein S100ß eine Möglichkeit zur Darstellung der Astrozyten. Dieses calciumbindende Protein ist zwar auch in anderen Regionen des Körpers als nur im Gehirn anzutreffen, jedoch ist es im Gehirn spezifisch für Astrozyten [48, 111]. Bei

Multipler Sklerose lässt sich ein erhöhter S100ß-Wert im Blut und im Liquor nachweisen [112]. Besonders im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis könnten Färbungen mit S100ß ein guter Marker für die protektive Wirkung der Astrozyten sein [111].

Problematisch ist aber nicht nur die unvollständige Darstellung von Astrozyten durch das GFAP. GFAP und seine Unterformen wie GFAP Kappa oder Delta sind abhängig vom Astrozytentyp wie "A1" und "A2" [55]. Entsprechend zeigen sich hier unterschiedliche Verteilungsmuster von GFAP.

Eine weitere Schwierigkeit stellt die Verteilung der Astrozyten abhängig von ihrer Lokalisation im Gehirn dar [40, 48, 58, 60]. Zur Vergleichbarkeit wurden bisher nur Astrozyten auf der Ebene 265 nach Sidman ausgewählt, also dem rostral gelegenen Beginn der Hippocampusformation [97]. Ebenso wurde nur die Lamina VI des Kortex untersucht, da sich diese gut von den angrenzenden Schichten des Corpus Callosum und der Lamina V abgrenzen lässt. Der Anteil an Astrozyten in Lamina VI ist vergleichsweise gering, was eine klare Abgrenzung von Astrozyten untereinander ermöglicht. Diese Standardisierung erlaubt zwar eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei einer hohen Validität; jedoch senkt die zuvor erwähnte Abhängigkeit der Lokalisation die Generalisierbarkeit der Ergebnisse auf alle Astrozyten. Folglich müsste trotz der schwierigeren Abgrenzung in den anderen Laminae des Kortex ebenso der Versuch erfolgen, in anderen Laminae Astrozyten und die Menge an Myelin innerhalb der Fortsätze zu untersuchen.

Andere Regionen wie Abschnitte der Sehbahn oder das Kleinhirn wären ebenfalls interessant zu untersuchen, da einseitiger Sehverlust oder Doppelbilder sowie Ataxie häufige Symptome einer Multiplen Sklerose sind. Dafür wäre es jedoch notwendig auch andere Modelle aufzugreifen, da das Cuprizone-Modell bspw. keine Auswirkungen im Kleinhirn zeigt. Beim Kleinhirn wäre das Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis eine Option, da es besonders dort seine Wirkung zeigt [96]. Ein Nachweis einer protektiven Wirkung der Astrozyten bei einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis hätte zudem den Vorteil, dass dies ein Modell ist, welches auf einer autoimmunen Reaktion basiert. Die protektive Wirkung wäre dann nicht nur im Cuprizone-Modell anzutreffen und somit einer Abwehr durch Mikroglia, sondern würde die Reaktion der Astrozyten darstellen. Besonders ist dabei zu beachten, dass bereits der Nachweis einer Leukozytenrekrutierung durch Astrozyten erbracht

werden konnte [4]. Der Überlegung folgend müsste sich ebenfalls bei humanen Gewebeproben von Patienten mit Multipler Sklerose eine geringere Demyelinisierung innerhalb der Fortsätze zeigen. Aus der Perspektive des gesunden Menschen betrachtet, sollte das Experiment an einer humanen Kontrollgruppe durchgeführt werden. Dadurch würde sich zeigen, ob die implizierte Annahme der gleichmäßigen Verteilung von Myelin zutrifft oder ob eine erhöhte oder verminderte Menge an Myelin innerhalb der Fortsätze vorliegt. Damit ließe sich die protektive Wirkung der Astrozyten quantifizieren.

Die Vorteile des Cuprizone-Modells werden jedoch ebenso deutlich. Anhand des Anteils an Myelin innerhalb und außerhalb der Fortsätze fällt auf, dass die gute Reproduzierbarkeit des Cuprizone-Modells sich auch in der Verteilung des Myelins innerhalb und außerhalb der Fortsätze darstellt (Abb. 5 und Tab. 8 & 9) [89]. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb und außerhalb der Fortsätze zwischen den Experimenten 1 und 2, was als ähnliches und reproduzierbares Ergebnis zu interpretieren ist. Der Unterschied zwischen innerhalb und außerhalb der Fortsätze ist hingegen signifikant und beweist damit, dass Astrozyten das Myelin schützen bzw. die Demyelinisierung verlangsamen.

Im Vergleich der Intoxikationszeit von drei Wochen mit der Intoxikationszeit von fünf Wochen in Experiment 3 zeigt sich diese Signifikanz zwischen innerhalb und außerhalb der Fortsätze nicht mehr (Tab. 12). Allerdings ist zu erkennen, dass die Abnahme außerhalb der Fortsätze nach wie vor erhöht ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Wirkung des Cuprizone bereits in der akuten Phase der Demyelinisierung so stark ist, dass die Protektion durch die Astrozyten nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass die maximale Demyelinisierung im Cuprizone-Modell nach fünf Wochen vorliegt [113]. Um den zeitlichen Verlauf der Protektion zu untersuchen, würde sich daher ein Experiment mit je einer Gruppe mit je einer ein- bis fünfwöchigen Intoxikationsdauer anbieten.

Da es sich bei einer Intoxikationszeit von fünf Wochen um eine akute Demyelinisierung handelt, stellt sich jedoch die Frage, wie die Protektion des Myelins erfolgt. Bisher sind im Cuprizone-Modell regenerative Ansätze wie eine Remyelinisierung nur nach dem Absetzen des Toxins bekannt [114]. Da es sich zusätzlich um eine akute Demyelinisierung handelt, müsste die Reaktion der Astrozyten sehr schnell und frühzeitig erfolgen. Daher erscheint eine regenerative Form einer Protektion eher unwahrscheinlich.

Wahrscheinlicher scheint eher eine aktive Intervention der Astrozyten vorzuliegen. Dies passt zu der Überlegung der Bildung eines Mikromilieus in der Einleitung (Kap. 1.3.1). Über welchen Mechanismus lässt sich hier jedoch nicht klären. Als ergänzende Experimente wären an dieser Stelle die Konzentrationsmessung verschiedener Zytokine oder Knock-out Mäuse denkbar [2, 11, 39, 75].

In einem durch die astrozytären Fortsätze abgeschlossenen Raum sollte eine solche Wirkung sogar verstärkt wirken. Zur Bestätigung sollte daher die Konzentrationsmessung nach einer – bspw. 40µm dicken – Kryostat-Konservierung erfolgen, sodass eine dreidimensionale Auswertung die Ergebnisse verifiziert.

Zusammenfassend lässt sich jedoch aus dem Experiment ableiten, dass Astrozyten in der Lage sind zumindest vor einer experimentellen Demyelinisierung zu schützen.

### 4.1.2 Myelinphagozytose durch Astrozyten im 3D-Modell

Die Phagozytose von Myelin war bisher in den Astrozyten menschlicher Gehirne bekannt (Tab. 13) [1-4]. Astrozyten sind zudem fähig auch MHC II auszubilden (engl. Major Histocompatibility Complex) [88, 115]. MHC II liegt nur bei antigenpräsentierenden Zellen vor, um die Lymphozyten zu aktivieren [88]. Damit über MHC II jedoch Antigene präsentiert werden können, ist es notwendig, Zellen zuvor zu phagozytieren. Der **Nachweis** Modell erfolgte schon im der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis sowie bei Patienten, die an Multipler Sklerose litten, während dies bei gesunden menschlichen Kontrollproben nicht der Fall war [116, 117]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Antigene durch Astrozyten präsentiert werden [118]. Da im Genom von Astrozyten alle Gene, die für eine Phagozytose erforderlich sind, vorhanden sind, liegt auch hierin kein Widerspruch vor [119].

Referenz	Gewebe	Diagnose / Modell	Nachweis mittels	Hauptbefund
Lee et al.	Human	Multiple Sklerose	Elektronenmikroskop	Myelinnachweis in Astrozyten
Liddelow et al.	Maus	Transgene Maus & Zellkultur	Immunfluoreszenz	Phagozytosefähigkeit von A1 Astrozyten ist vermindert
Magnus et al.	Ratte	Lewis Ratte & Zellkultur	Immunfluoreszenz	Astrozyten phagozytieren weniger als Mikroglia
Ponath et al.	Human	Multiple Sklerose	Immunhistochemie	Phagozytose von Myelin durch Astrozyten ist eine initiale Reaktion

**Tabelle 13:** Übersicht der Phagozytosefähigkeit von Astrozyten [1-4]

Damit übereinstimmend zeigen die Ergebnisse, dass Astrozyten in der Lage sind im Cuprizone-Modell Myelin zu phagozytieren und dass sich dies mit einer dreidimensionalen immunfluoreszierenden Färbung darstellen lässt. Der Nachweis der Phagozytose durch Astrozyten im Cuprizone-Modell ermöglicht nun weitere Möglichkeiten die Ursachen und die Wirkungen zu erforschen. Da der Nachweis der Phagozytose bei Mikrogliazellen in der Literatur bereits beschrieben wurde und in elektronenmikroskopischen Bildern sichtbar ist, stellten wir dieses Ergebnis mit unserer Methodik nach [69]. Da die Methodik bei Mikroglia nur zur Verifizierung genutzt wurde, verfolgten wir die Technik bei Mikroglia nicht weiter.

Die seltene Darstellung der Phagozytose in Astrozyten ist für weitere Untersuchungen problematisch [1]. In Anbetracht der Tatsache, dass dies nicht die primäre Aufgabe der Astrozyten ist, ist die Seltenheit jedoch nachvollziehbar. Zur besseren Darstellung wäre bspw. eine Kryostat-Histologie eine Möglichkeit, die dickere Schnitte erlaubt, was die Wahrscheinlichkeit für vollständige Astrozyten mit Myelin erhöhen würde [120].

Zudem sollte der zeitliche Verlauf der Phagozytose von Myelin bei Astrozyten genauer untersucht werden. Es stellt sich die Frage, ob bei einer höheren Dosis an Toxin eine erhöhte oder niedrigere Häufigkeit an Phagozytose auftritt. Ebenso könnte dieser Effekt bei längerer Intoxikation als drei Wochen häufiger auftreten. So könnte dieser Effekt bei einer Dauer von sechs Wochen, also der maximalen akuten Phasen einer Cuprizone-Intoxikation, sich zu dem Effekt von einer Dauer von drei Wochen unterscheiden. Ebenso könnte der Effekt bei einer chronischen Demyelinisierung, also länger als sechs Wochen Intoxikation, oder bei der Remyelinisierung untersucht werden [90].

Ob der Nutzen protektiv oder destruktiv ist, würde sich dann bspw. anhand der Anzahl an Mikroglia oder der Menge an Myelin, wie im oben beschriebenen ersten Versuch, definieren lassen. Bekannt ist, dass die Phagozytose im menschlichen Gehirn zu einer astroglialen NF-kB Aktivierung (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) führt, was die Immunzellaktivierung zu initiieren scheint [4]. Mithilfe des Cuprizone-Modells lässt sich diese Theorie nicht weitergehend untersuchen, da Immunzellen im Cuprizone-Modell keine Auswirkungen zeigen. Jedoch eröffnet das Cuprizone-Modell die Möglichkeit mit der dargestellten Methodik der Fragestellung in einem anderen Tiermodell, bspw. dem Modell der experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, nachzugehen.

Final könnte dann eine Therapie angestrebt werden, die diese Phagozytose bei protektiver Wirkung unterstützt oder bei inflammatorischer Wirkung unterbindet.

#### 4.1.3 Ausblick

Um die Protektion der Fortsätze genauer zu untersuchen, sind verschiedene weitere Experimente denkbar.

Für eine bessere Generalisierbarkeit der astrozytären Protektion von Myelin wäre eine erneute Überprüfung des Anteils an Myelin innerhalb und außerhalb der Fortsätze in anderen Regionen des Gehirns wie der Sehbahn oder des Kleinhirns sowie außerhalb der Lamina VI des Kortex sinnvoll.

Neben einer besseren räumlichen sollte auch eine bessere zeitliche Untersuchung erfolgen. Dafür sollte die Konzentration von Myelin innerhalb und außerhalb der Fortsätze bei je einer Gruppe mit je einer ein- bis fünfwöchigen Intoxikationsdauer gemessen werden.

Mit PLP wurde bisher nur ein Marker von Myelin untersucht. Daher könnte in einem nächsten Schritt geprüft werden, ob die Korrelation von PLP-Erhaltung mit einer Myelinerhaltung gleichzusetzen ist. Dafür wären weitere Myelinmarker wie CNPase oder MAG geeignet [102, 104]. Gleiches wäre auch mit Markern für Astrozyten möglich, da – wie bereits erwähnt – GFAP nur 15% des Zytoskeletts abdeckt. Dafür kämen bei Astrozyten neben GFAP noch Aquaporin 4 oder S100ß in Frage [48, 108-111].

Eine weitere Fragestellung wäre, ob die Ergebnisse nur spezifisch für das Cuprizone-Modell sind. Um die Ergebnisse zu verifizieren, könnte man die Versuche auch mit anderen Modellen reproduzieren, bspw. mit der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis. Ebenso sollten die Ergebnisse mit gesunden Proben sowie mit humanen Läsionen einer Multiplen Sklerose verglichen werden. Beim Cuprizone-Modell wären noch weitere Experimente interessant, die die Wirkung der Protektion bei chronischer Demyelinisierung sowie bei einer Remyelinisierung nach Absetzung des Toxins untersuchen. In diesem Rahmen könnten die Proben mithilfe eines Kryostats hergestellt werden, um eine bessere Darstellung der Protektion zu erhalten.

Würde die Wirkweise der Protektion bspw. durch das angesprochene Mikromilieu verifiziert werden sowie ein möglicher Zusammenhang mit der protektiven Phagozytose von Myelin erforscht, ließen sich aus diesen Ergebnissen ableitend möglicherweise neue Medikamente entwickeln, die die Protektion des Myelins durch die Astrozyten, bspw. durch eine dauerhafte Proliferation oder Hypertrophie der Astrozyten unterstützen könnten.

# 5 Anhang

# 5.1 Tierhaltung

Material Details		Hersteller	Katalog- nummer
Cuprizone	Bis-Cyclohexanone- Oxaldihydrazone	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	C9012
Einstreu	bedding PS 14 select	Ssniff, Soest, Deutschland	H1505-30
Haltungsfutter	Ratte/Maus-Haltung, 10 mm, autoklavierbar	Ssniff, Soest, Deutschland	V1534-300
Maus	Stamm C57BL/6	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France	
Maushäuschen	Mäuse Iglu Rot	Plexx BV, Elst, Niederlande	13100
Nest	Nestlets	Plexx BV, Elst, Niederlande	14010
Petrischalen	Petrischalen, Standardausführung, Gamma-sterilisiert ohne Belüftungsnocken, ø 94 mm, H16 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland	EN16.1
Pulverfutter (Mehl, SM R/M)  Kontrolle ohne Substanz, SM Ratte/Maus, Control/Placebo		Ssniff, Soest, Deutschland	V1530-00
Ringer-Lösung DAB 7 (Infusionslösung)		Serag Wiessner, Naila, Deutschland	
Versuchskäfig BlueLine, Typ II long, Material Polysulfon		Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland	1284L00SU V

Tabelle 14: Material Tierhaltung

# 5.2 Verwendete Chemikalien

Material	Details	Hersteller	Katalognummer	Material	Details	Hersteller	Katalognummer
Bovines Serumalbumin		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A-2153	Ketamin 10%		Medistar, Ascheberg, Deutschland	Zulassungsnummer 13690.00.00
Cold Fish Skin/Gelatine		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	G-7041	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogen- phosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1063461000
DAPI	Bisbenzimid H33258	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	14530	Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogen- phosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1065801000
DBS	Donkey Blocking Serum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	D9663	Natronlauge	1 mol/l	Roth, Karlsruhe, Deutschland	K021.1
EDTA	Ethylendiamin- Tetraessigsäure Dinatriumsalz	Fluka, Sigma- Aldrich, Steinheim,	3685	Paraffin		Merck, Darmstadt, Deutschland	K46815058603
Ethanol	Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.00983.	PBS	Phosphate Buffered Saline, PBS-Pulver ohne Ca2+/Mg2+	Merck, Darmstadt, Deutschland	L-182-50
	FluorPreserve	Sigma-Aldrich,		Tris (Pufferan®)		Roth, Karlsruhe, Deutschland	4855.2
FluorPreserve	Reagent	Steinheim, Deutschland	345787	Tween 20		Sigma-Aldrich, Steinheim.	P-1379
Formaldehyd	37%	Roth, Karlsruhe, Deutschland	CP10.2			Deutschland	. 2010
		Linaris Vector,		Xylazin	2%	Ceva, Libourne, Frankreich	
ImmeEdge	ImmEdge-Pen	Dossenheim Deutschland	H-4000	Xylol	isomerisch. Analar normapur ACS, ISO	VWR, Darmstadt Deutschland	28.975.462

Tabelle 15: Verwendete Chemikalien

# 5.3 Geräte und Software

Material	Details	Hersteller	Katalognummer	Material	Details	Hersteller	Katalognummer	Material	Details	Hersteller	Katalognummer
B.Braun Omnifix® Luer B.Braun	Spritze 20 ml	Braun, Mainz, Deutschland Braun, Mainz,	4616200F	Falcon-Röhrchen	Rotilabo- Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit	Roth, Karlsruhe,	N463.1	Prism	Macintosh Version by Software MacKiev © 1994-2021	GraphPad Software, LLC	Version 9.0
Omnifix® Luer	Spritze 50 ml	Deutschland VWR,	22050		Beschriftungsfeld	Deutschland Schleicher &		Rührfische	Rotilab- Magnetstäbchen	Roth, Karlsruhe,	1292-2
Bechergläser	1000 ml	Darmstadt, Deutschland Roth,	213-1111	Filterpapier	Ø240 mm	Schuell, Düren Deutschland	594 1/2	Safety-Multifly-	20G, 200 mm lang	Sarstedt, Nümbrecht,	851.637.235
Bienenwachs	gelb: rein natürlich	Karlsruhe,	5830.1	ImageJ	ImageJ 1.51j; Wayne	Rasband, Natio	onal Institutes of	Kanüle	5-7-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-	Deutschland	
Einbettkästchen mit Deckel	Megakassetten, weiß	Deutschland  Medite, Burgdorf,	47-1150-00	Immersionsöl	Immersionsöl für Mikroskopie, nicht fluoreszierend,	Olympus, Hamburg,		Schnittmikrotom		Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	SM200R
\$25.00 \$3.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10.00 \$10		Deutschland VWR,			Brechungsindex bei 23°C = 1,518	Deutschland		Schottflaschen	1000 ml, Enghalsflasche mit	VWR, Darmstadt,	215-1557
Einbettkästchen ohne Deckel		Darmstadt, Deutschland	1387-4901	Konfokales	Olympus BX51WI mit Olympus BX-DSU und	Olympus,	http://cn.olympu s.com/upload/ac	Schotthaschen	Schraubverschluss	Deutschland	215-1557
Eppendorf Spitzen	0,1-20 μΙ	VWR, Darmstadt,	22492012	Mikroskop (DSU)	SOLA LED Lampe; Olympus, Hamburg, Deutschland,	Hamburg, Deutschland	cessory/20114/2 01147150347820 72.pdf	Schottflaschen	2000 ml, Enghalsflasche mit Schraubverschluss	VWR, Darmstadt Deutschland	215-1558
Eppendorf		Deutschland VWR,		Magnetrührer	IKA-Combimag RET	Ika, Staufen, Deutschland		Spritze	1 ml	Henke- Sass Wolf GmbH, Tuttlingen	
Spitzen	2-200 μΙ	Darmstadt,	30000870	Mixer	Kult X	WFM				Deutschland	
Eppendorf	50-1000 µl	VWR, Darmstadt,	30000919	Neurolucida 360	Version 2017.01.2 (64- bit) MBF Bioscience			Trichter	Ø250 mm	VWR, Darmstadt	221-1730
Spitzen	30-1000 μι	Deutschland	30000313	Objektträger	SuperFrost® Plus	VWR, Darmstadt,	631-0108			Deutschland	
Eppendorf Tubes	1,5 ml Eppendorf	VWR, Darmstadt,	30.120.086	- Objektinger	Schere, Pinzetten,	Deutschland	031 0100	Wäge Schälchen	46x46x8	VWR, Darmstadt	611-9178
-pperiaerr rabes	_,5 Eppendor1	Deutschland	30.120.000	OP-Besteck	Stecknadeln			<u> </u>		Deutschland Leica	
Eppendorf Tubes	2,0 ml Eppendorf	VWR, Darmstadt, Deutschland	30.120.094	Paraplast		Leica, Richmond, USA	39602012	Wasserbad		Biosystems, Wetzlar, Deutschland	HI1210

Tabelle 16: Geräte und Software

## 5.4 Herstellung der Lösungen

(engl. Short Operation Protocol (SOP))

Substanz	SOP	Datum	Hergestellt von	Anmerkung	
	1/3	29.08.16	C. Ertl		
PBS (10x)	1/4	26.09.16	A.Nack		
,	1/7	15.12.16	S. Schmutz		
	2/30	09.09.16	C. Ertl	pH = 7,41	
	2/35	13.10.16	S. Cordier	pH = 7,41	
	2/36	19.10.16	S. Cordier	pH = 7,40	
DDC /1v/	2/37	19.10.16	S. Cordier	pH = 7,40	
PBS (1x)	2/41	30.10.16	C. Ertl	pH = 7,40	
	2/42	02.11.16	S. Cordier	pH = 7,40	
	2/66	27.01.16	C. Ertl	pH = 7,43	
	2/67	01.02.16	U. Chrzanowski	pH = 7,45	
	4/2	08.08.16	A. Nack, S.	nU = 0 04	
Tris/EDTA			Cordier	pH = 9,04	
Puffer	4/3	12.10.16	S. Cordier	pH = 9,01	
	4/4	24.11.16	C. Ertl	pH = 9,00	
2% DBS	6B/3	10.08.16	M. Gottschling,	PBS 2/17	
2/0 003	05/3	10.08.10	C. Ertl	7632/17	
F0/ DDC it				0,5%	
5% DBS mit	7/2	27.06.16	S. O. Rohr	Triton/PBS	
Triton				(SOP 8/1)	
5% DBS	Siehe Kapitel			(00000/06)	
ohne Triton	5.4.6	01.02.17	S. Cordier	(SOP 2/66).	
0,5% Triton/PBS	8/1	27.06.16	S. O. Rohr	PBS SOP 2/1	

Tabelle 17: Übersicht über die Herstellung der Lösungen

#### 5.4.1 PBS (10x Stocklösung, SOP 1)

4000 ml destilliertes Wasser werden in einen Plastik-Messbecher gefüllt und mit einer Dose PBS-Pulver ohne  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  (ungeöffnete Dose = 477.5 g) vermischt. Die Mischung wird durch einen Magnetrührer komplett aufgelöst. Danach wird die Mischung bis zur 5000 ml Markierung mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

#### 5.4.2 PBS (1x Fertiglösung, SOP 2)

500 ml der PBS 10x Stocklösung werden mit 4500 ml destilliertem Wasser mithilfe des Magnetrührers vermischt. Danach wird der pH-Wert mit 1 mol/l Salzsäure auf 7,4 eingestellt. In den folgenden 20 min muss gewartet werden, ob sich der pH-Wert ändert. Dann wird der pH-Wert erneut auf 7,4 eingestellt.

#### 5.4.3 Tris/EDTA Puffer (SOP 4)

6,05 g Tris und 1,85 g EDTA werden in 5 l destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wird auf 9,0 eingestellt. Danach wird 20 min gewartet, ob sich der pH-Wert wieder ändert. Dann wird der pH-Wert erneut auf 9,0 eingestellt.

#### 5.4.4 DBS 2% (SOP 6B)

Zur Herstellung einer Verdünnung von 1:50 (Serum in PBS) wird 1 ml DBS mit 0,05 g (engl.) *Cold water fish skin gelatine*, 0,5 g (engl.) *Bovine Serum Albumine*, 50 µl Tween20 10% und 49 ml PBS (1x) gemischt. Zur Aufbewahrung wird je 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### 5.4.5 DBS/Triton/PBS für Immunfluoreszenz 5% (SOP 7)

Für die Herstellung einer Verdünnung von 1:20 (Serum in PBS) werden 2,5 ml DBS mit 47,5 ml Triton/PBS 0,5% gemischt. Abgefüllt zu je 1 ml werden sie bei -20°C gelagert.

#### 5.4.6 DBS/PBS 5%

16 ml einer Verdünnung von 1:20 (Serum in PBS) bestehen aus einer Mischung von 575  $\mu$ l DBS und 10925  $\mu$ l PBS.

#### 5.4.7 Triton/PBS 0,5% (SOP 8)

Für eine Verdünnung von 1:200 (Serum in PBS) werden 5 ml Triton X-100 mit 995 ml PBS gemischt und in einem Schraubgefäß bei 4°C für kurze Zeit gelagert.

#### 5.4.8 Ketamin-Xylazin-Lösung

9,5 ml der Lösung bestehen aus 100 µl Xylazin 2%, 400 µl Ketamin 10% und 9 ml NaCl. Somit enthält die Lösung 0,42% Ketamin und 0,021 % Xylazin.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1. Lee, S.C., et al., *Multiple sclerosis: a role for astroglia in active demyelination suggested by class II MHC expression and ultrastructural study.* J Neuropathol Exp Neurol, 1990. **49**(2): p. 122-36.
- 2. Liddelow, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia*. Nature, 2017. **541**(7638): p. 481-487.
- 3. Magnus, T., et al., Astrocytes are less efficient in the removal of apoptotic lymphocytes than microglia cells: implications for the role of glial cells in the inflamed central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(9): p. 760-6.
- 4. Ponath, G., et al., Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. Brain, 2016.
- 5. Schünke, M., et al., Prometheus: Kopf, Hals und Neuroanatomie. 4th ed. 2015, Stuttgart: Thieme.
- 6. Allen Institute for Brain Science. *Allen Mouse Brain Atlas*. 2004 31.10.2020]; Available from: <a href="https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960264&structure=218&x=5508.000139508929&y=3">https://atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brain-map.org/atlas.brai
- 7. Somjen, G.G., Nervenkitt: notes on the history of the concept of neuroglia. Glia, 1988. **1**(1): p. 2-9
- 8. del Rio-Hortega, P., *La microglia y su transformacion en celulas en basoncito y cuerpos granulo-adiposos*. Trab. Lab. Invest. Biol., 1920: p. 37-82.
- 9. Fulmer, C.G., et al., *Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination*. J Neurosci, 2014. **34**(24): p. 8186-96.
- 10. Domingues, H.S., et al., Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. Front Cell Dev Biol, 2016. 4: p. 71.
- 11. Nair, A., T.J. Frederick, and S.D. Miller, *Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment.* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(17): p. 2702-20.
- 12. Correale, J. and M.F. Farez, *The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression*. Front Neurol, 2015. **6**: p. 180.
- 13. Moore, C.S., et al., *How factors secreted from astrocytes impact myelin repair*. J Neurosci Res, 2011. **89**(1): p. 13-21.
- 14. Peferoen, L., et al., Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. Immunology, 2014. **141**(3): p. 302-13.
- 15. Kornek, B. and H. Lassmann, *Axonal pathology in multiple sclerosis*. *A historical note*. Brain Pathol, 1999. **9**(4): p. 651-6.
- Dutta, R. and B.D. Trapp, *Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis*. Neurology, 2007. **68**(22 Suppl 3): p. S22-31; discussion S43-54.
- 17. Reich, D.S., C.F. Lucchinetti, and P.A. Calabresi, *Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2018. **378**(2): p. 169-180.
- 18. Hunter, S.F., *Overview and diagnosis of multiple sclerosis*. Am J Manag Care, 2016. **22**(6 Suppl): p. s141-50.
- 19. Alehashemi, A., Z. Mostafavian, and N. Dareini, *Sexual Function in Iranian Female Multiple Sclerosis Patients*. Open Access Maced J Med Sci, 2019. **7**(8): p. 1303-1308.
- 20. Kingwell, E., et al., *Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review.* BMC Neurol, 2013. **13**: p. 128.
- 21. Montalban, X., et al., *ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis*. Eur J Neurol, 2018. **25**(2): p. 215-237.
- 22. Korn, T., Pathophysiology of multiple sclerosis. J Neurol, 2008. 255 Suppl 6: p. 2-6.
- 23. Makhani, N., et al., MS incidence and prevalence in Africa, Asia, Australia and New Zealand: A systematic review. Mult Scler Relat Disord, 2014. **3**(1): p. 48-60.
- 24. Statistisches Bundesamt. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. 2020 08.11.2020]; Available from: <a href="https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html?nn=210776">https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html?nn=210776</a>.
- 25. Statistisches Bundesamt. *Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs*. 2020 08.11.2020]; Available from: <a href="https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html">https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html</a>.
- 26. Statistisches Bundesamt. *Bevölkerung in Deutschland 2018*. 2019 8.11.2020]; Available from: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2019/06/PD19\_244\_12411.html.

- 27. Poser, S., et al., *Prognostic indicators in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 1986. **74**(5): p. 387-92.
- 28. Kavaliunas, A., et al., *Income in Multiple Sclerosis Patients with Different Disease Phenotypes*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169460.
- 29. Nicholas, R. and W. Rashid, *Multiple sclerosis*. Am Fam Physician, 2013. **87**(10): p. 712-4.
- 30. Voll, R. and H.-W. Baenkler, *Immunologie*, in *Duale Reihe: Innere Medizin*, K. Arastéh, et al., Editors. 2013, Thieme: Stuttgart. p. 1315-1340.
- 31. Langer-Gould, A., et al., *Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: A multiethnic study.* Neurology, 2017. **89**(13): p. 1330-1337.
- 32. Noonan, C.W., S.J. Kathman, and M.C. White, *Prevalence estimates for MS in the United States and evidence of an increasing trend for women.* Neurology, 2002. **58**(1): p. 136-8.
- 33. Hemmer, B., et al., *Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis*. Nat Clin Pract Neurol, 2006. **2**(4): p. 201-11.
- 34. Kipp, M. and K. Radlanski, *Neuoanatomie: Nachschlagen, Lernen, Verstehen*. 1st ed. 2017, Berlin: KVM.
- 35. Mense, S., *ZNS Aufbau und Organisation*, in *Duale Reihe: Anatomie*, G. Aumüller, et al., Editors. 2010, Thieme: Stuttgart. p. 998-1077.
- 36. Spanel-Borowski, K., *Zytologie und Histologie Grundlagen*, in *Duale Reihe: Anatomie*, G. Aumüller, et al., Editors. 2010, Thieme: Stuttgart. p. 20-72.
- 37. Mosser, C.A., et al., *Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future*. Prog Neurobiol, 2017. **149-150**: p. 1-20.
- 38. Aust, G., Blut und lymphatische Organe Grundlagen, in Duale Reihe: Anatomie, G. Aumüller, et al., Editors. 2010, Thieme: Stuttgart. p. 133-159.
- 39. Mayo, L., F.J. Quintana, and H.L. Weiner, *The innate immune system in demyelinating disease*. Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 170-87.
- 40. Freeman, M.R., Specification and morphogenesis of astrocytes. Science, 2010. **330**(6005): p. 774-8.
- 41. MacVicar, B.A. and E.A. Newman, *Astrocyte regulation of blood flow in the brain*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(5).
- 42. Ponath, G., C. Park, and D. Pitt, *The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 217.
- 43. Michinaga, S. and Y. Koyama, *Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(3).
- 44. Kettenmann, H. and A. Verkhratsky, *Neuroglia: the 150 years after*. Trends Neurosci, 2008. **31**(12): p. 653-9.
- 45. Volterra, A. and J. Meldolesi, *Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues.* Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(8): p. 626-40.
- 46. Molofsky, A.V. and B. Deneen, *Astrocyte development: A Guide for the Perplexed*. Glia, 2015. **63**(8): p. 1320-9.
- 47. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(1): p. 41-53.
- 48. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(1): p. 7-35.
- 49. Dehouck, M.P., et al., *An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro.* J Neurochem, 1990. **54**(5): p. 1798-801.
- 50. Matyash, V. and H. Kettenmann, *Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology*. Brain Res Rev, 2010. **63**(1-2): p. 2-10.
- 51. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.* F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
- 52. Nowacki, P., D. Koziarska, and M. Masztalewicz, *Microglia and astroglia proliferation within the normal appearing white matter in histologically active and inactive multiple sclerosis.* Folia Neuropathol, 2019. **57**(3): p. 249-257.
- 53. Reichenbach, A., A. Derouiche, and F. Kirchhoff, *Morphology and dynamics of perisynaptic glia*. Brain Res Rev, 2010. **63**(1-2): p. 11-25.
- 54. Hamilton, N.B. and D. Attwell, *Do astrocytes really exocytose neurotransmitters?* Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(4): p. 227-38.
- 55. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 421-43.

- 56. Ito, K., et al., *Identification of genes associated with the astrocyte-specific gene Gfap during astrocyte differentiation.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 23903.
- 57. Emsley, J.G. and J.D. Macklis, *Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS*. Neuron Glia Biol, 2006. **2**(3): p. 175-86.
- 58. Liedtke, W., et al., *GFAP* is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. Neuron, 1996. **17**(4): p. 607-15.
- 59. Wilhelmsson, U., et al., Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17513-8.
- 60. Pekny, M. and M. Pekna, *Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits.* Physiol Rev, 2014. **94**(4): p. 1077-98.
- 61. Cifelli, A., et al., *Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2002. **52**(5): p. 650-3.
- 62. Novo, A.M., et al., *The neural basis of fatigue in multiple sclerosis: A multimodal MRI approach.* Neurol Clin Pract, 2018. **8**(6): p. 492-500.
- 63. Bo, L., et al., *Grey matter pathology in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand Suppl, 2006. **183**: p. 48-50.
- 64. Kipp, M., et al., *Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective*. Brain Pathol, 2017. **27**(2): p. 123-137.
- 65. O'Loughlin, E., et al., *Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(2).
- 66. Lassmann, H., Pathology of inflammatory diseases of the nervous system: Human disease versus animal models. Glia, 2020. **68**(4): p. 830-844.
- 67. Ortiz, G.G., et al., *Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis*. Arch Med Res, 2014. **45**(8): p. 687-97.
- 68. Trapp, B.D., et al., Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med, 1998. **338**(5): p. 278-85.
- 69. Huizinga, R., et al., *Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis.* Glia, 2012. **60**(3): p. 422-31.
- 70. Bruck, W., et al., *Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions*. Ann Neurol, 1995. **38**(5): p. 788-96.
- 71. Marik, C., et al., Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? Brain, 2007. **130**(Pt 11): p. 2800-15.
- 72. Skripuletz, T., et al., Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. Brain, 2013. **136**(Pt 1): p. 147-67.
- 73. Hendrickx, D.A., et al., *Enhanced uptake of multiple sclerosis-derived myelin by THP-1 macrophages and primary human microglia.* J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 64.
- 74. Barcia, C., et al., *T cells' immunological synapses induce polarization of brain astrocytes in vivo and in vitro: a novel astrocyte response mechanism to cellular injury.* PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2977.
- 75. Brambilla, R., The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Acta Neuropathol, 2019. **137**(5): p. 757-783.
- 76. Kang, W., et al., Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(29): p. E2987-95.
- 77. Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl, *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity*. Trends Immunol, 2007. **28**(3): p. 138-45.
- 78. Baert, L., et al., A proliferation-inducing ligand-mediated anti-inflammatory response of astrocytes in multiple sclerosis. Ann Neurol, 2019. **85**(3): p. 406-420.
- 79. Sun, B., et al., *A proliferation-inducing ligand: a new biomarker for non-small cell lung cancer.* Exp Lung Res, 2009. **35**(6): p. 486-500.
- 80. Kamizato, K., et al., *The role of fatty acid binding protein 7 in spinal cord astrocytes in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis.* Neuroscience, 2019. **409**: p. 120-129.
- 81. Swanson, R.A., W. Ying, and T.M. Kauppinen, *Astrocyte influences on ischemic neuronal death*. Curr Mol Med, 2004. **4**(2): p. 193-205.
- 82. Verkhratsky, A., et al., *Physiology of Astroglia*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1175**: p. 45-91.
- 83. Liberto, C.M., et al., *Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes*. J Neurochem, 2004. **89**(5): p. 1092-100.

- 84. Saadoun, S. and M.C. Papadopoulos, *Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema*. Neuroscience, 2010. **168**(4): p. 1036-46.
- 85. Bush, T.G., et al., Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron, 1999. 23(2): p. 297-308.
- 86. Fu, R., et al., *Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases*. Mol Neurobiol, 2014. **49**(3): p. 1422-34.
- 87. Kettenmann, H., et al., *Physiology of microglia*. Physiol Rev, 2011. **91**(2): p. 461-553.
- 88. Dong, Y. and E.N. Benveniste, *Immune function of astrocytes*. Glia, 2001. **36**(2): p. 180-90.
- 89. Kipp, M., et al., *The cuprizone animal model: new insights into an old story*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(6): p. 723-36.
- 90. Gudi, V., et al., Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. Front Cell Neurosci, 2014. 8: p. 73.
- 91. Scheld, M., et al., *Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain.* J Neurosci, 2016. **36**(4): p. 1410-5.
- 92. Goldberg, J., et al., *Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice.* J Mol Neurosci, 2015. **57**(2): p. 166-75.
- 93. Buschmann, J.P., et al., *Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination.* J Mol Neurosci, 2012. **48**(1): p. 66-76.
- 94. Zhang, Y., et al., *The Spatial and Temporal Characters of Demyelination and Remyelination in the Cuprizone Animal Model.* Anat Rec (Hoboken), 2019. **302**(11): p. 2020-2029.
- 95. Traugott, U. and P. Lebon, *Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis*. Ann Neurol, 1988. **24**(2): p. 243-51.
- 96. Wagenknecht, N., et al., *Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models.* J Mol Neurosci, 2016. **60**(1): p. 102-14.
- 97. Sidman. *Mouse Brain Atlas*. ohne Jahr 03.08.2018]; Available from: <a href="http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html">http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html</a>.
- 98. Java. ImageJ. ohne Jahr 05.11.2020]; Available from: https://imagej.nih.gov/ij/
- 99. Weiß, C., Basiswissen Medizinische Statistik. 7th ed. 2019, Mannheim: Springer.
- 100. Traiffort, E., et al., Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions. Front Cell Neurosci, 2020. 14: p. 79.
- 101. Hajos, F., Changes in glial fibrillary acidic protein (GFAP) immonureactivity reflect neuronal states. Neurochem Res, 2008. **33**(8): p. 1643-50.
- 102. Chrzanowski, U., et al., Evaluation strategy to determine reliable demyelination in the cuprizone model. Metab Brain Dis, 2019. **34**(2): p. 681-685.
- 103. Myllykoski, M., et al., Structural and functional evolution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. Brain Res, 2016. **1641**(Pt A): p. 64-78.
- Janssen, B.J.C., Inside-out or outside-in, a new factor in MAG-mediated signaling in the nervous system: An Editorial for 'High-affinity heterotetramer formation between the large myelin-associated glycoprotein and the dynein light chain DYNLL1' on page 764. J Neurochem, 2018. 147(6): p. 712-714.
- 105. Umemori, H., et al., *Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling*. Nature, 1994. **367**(6463): p. 572-6.
- 106. Quinlan, R.A. and W.W. Franke, *Molecular interactions in intermediate-sized filaments revealed by chemical cross-linking. Heteropolymers of vimentin and glial filament protein in cultured human glioma cells.* Eur J Biochem, 1983. **132**(3): p. 477-84.
- 107. Pixley, S.K. and J. de Vellis, *Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin*. Brain Res, 1984. **317**(2): p. 201-9.
- 108. Schildge, S., et al., Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. J Vis Exp, 2013(71).
- 109. Duan, T. and A.S. Verkman, Experimental animal models of aquaporin-4-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders: progress and shortcomings. Brain Pathol, 2020. **30**(1): p. 13-25.
- 110. Xiao, M. and G. Hu, *Involvement of aquaporin 4 in astrocyte function and neuropsychiatric disorders*. CNS Neurosci Ther, 2014. **20**(5): p. 385-90.
- 111. Kojima, K., et al., *Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ T cells specific for an astrocyte protein, S100 beta.* J Neural Transm Suppl, 1997. **49**: p. 43-51.
- 112. Tateishi, N., et al., [S100B: astrocyte specific protein]. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, 2006. **26**(1): p. 11-6.

- 113. Zhen, W., et al., An Alternative Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination Mouse Model. ASN Neuro, 2017. 9(4): p. 1759091417725174.
- 114. Matsushima, G.K. and P. Morell, *The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system.* Brain Pathol, 2001. **11**(1): p. 107-16.
- Wong, G.H., et al., *Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells.* Nature, 1984. **310**(5979): p. 688-91.
- 116. Traugott, U., D.E. McFarlin, and C.S. Raine, *Immunopathology of the lesion in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse*. Cell Immunol, 1986. **99**(2): p. 395-410.
- 117. Zeinstra, E., et al., Astrocytes in chronic active multiple sclerosis plaques express MHC class II molecules. Neuroreport, 2000. 11(1): p. 89-91.
- 118. Kort, J.J., et al., Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice. J Neuroimmunol, 2006. 173(1-2): p. 23-34.
- 119. Cahoy, J.D., et al., *A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function.* J Neurosci, 2008. **28**(1): p. 264-78.
- 120. Hira, V.V.V., et al., Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry. Acta Histochem, 2019. **121**(2): p. 125-134.

# **Danksagung**

Mein herzlichster Dank gilt:

meinem **Doktorvater und Betreuer Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Kipp**. Markus, Dein Stil des Förderns und Forderns ist für mich sicherlich nicht nur für meine akademische Arbeit wichtig gewesen. Fleiß, Sorgfältigkeit und Leidenschaft sind Werte, die nicht nur in der Wissenschaft von Wert sind. Für Dein Vertrauen, Deine immerwährende Unterstützung und Erreichbarkeit und Dein Vorbild möchte ich mich aus tiefsten Herzen bei Dir bedanken.

Beate Aschauer, Astrid Baltruschat und Sarah Wübbel, stellverstretend für das Institut für Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München. Astrid und Beate, ohne Eure Lehre in den Techniken wäre meine Arbeit sicher nicht möglich gewesen. Dank Eurer Organisation und Euren Lösungen für Alles, war diese Arbeit erst möglich. Dir, Sarah, möchte ich nicht nur für Deinen Einsatz und Deine Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit danken, sondern auch dafür, die wichtigen Dinge im Leben nicht aus den Augen zu verlieren.

dem Institut der Neuroanatomie der RWTH Aachen für Unterstützung bei der Einbettung der Gehirne.

**Sven Olaf Rohr.** Sven, ohne Dich und Deine Tipps zur Software wäre die Zeit zur Auswertung meiner Arbeit sicher unermesslich lang gewesen.

**Marlen Lauffer.** Marlen, danke für Deine konstruktiven, kritischen Gedanken. Ich wusste immer, dass Deine Anmerkungen für mich Fluch und Segen sein werden. Letztendlich kann ich Dir jedoch nicht genug dafür danken.

**Sandra Mendoza.** Sandra, ohne Dich wäre ich sicher schon im Studium und auch im Labor verzweifelt. Auch für Deine sehr bereichernden Gedanken bei dieser Arbeit kann ich Dir nicht genug danken.

**Kristina Cordier.** Kristina, Worte können nicht beschreiben, was mir Deine Unterstützung bedeutet und wie wichtig Du mir bist. Danke!

Gisela und Günther Cordier. Ihr seid immer für mich da, habt mir so viel ermöglicht und mir alles beigebracht, was ich heute weiß. Ich danke Euch von Herzen und bin sehr froh, dass ich Euch habe!

#### **Affidavit**







## Eidesstattliche Versicherung

Cordier, Sebastian Max		
Name, Vorname	 	

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

#### Morphologische Veränderungen der Astrozyten bei Multipler 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.

München, 03.02.2022 Ort, Datum Sebastian Max Cordier Unterschrift Doktorand