

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt,
Anstalt der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Christoph Schmitz

Expression immunrelevanter Gene in murinen Multiple Sklerose-Modellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Katherina Vicky Gantenbein

aus
Zürich, Schweiz

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Markus Kipp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Tania Kümpfel
PD Dr. Astrid Blaschek

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2022

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	2
II. Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1. Multiple Sklerose	8
1.2. Hypothesen zur MS-Pathogenese	10
1.3. Bedeutung der Astrozyten in der MS-Pathogenese	13
1.4. Verwendete tierexperimentelle MS-Modelle	14
1.4.1. Cuprizone-Modell	14
1.4.2. Cup/EAE-Modell	15
1.4.3. LPC-Modell	16
1.5. Untersuchte Gene: <i>C-Myc</i> , <i>Stat3</i> , <i>Vcam1</i> und <i>Tnfrsf1A</i>	16
1.6. Fragestellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Zusammensetzung der Puffer, Blockseren, Fixierungs- und Färbelösungen	20
2.2 Tierexperimente	21
2.2.1 Versuchstiere und Haltung	21
2.2.2 Versuchsaufbau	21
2.2.2.1 Cuprizone-Modell	21
2.2.2.2 LPC-Modell	21
2.2.2.3 Cup/EAE-Modell	22
2.3 Gewebsasservierung	22
2.3.1 Transkardiale Perfusion und Paraffineinbettung	22
2.3.2 Kryostateinbettung	23
2.4 Histologische Techniken	24
2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	24
2.4.2 Luxol-Fast-Blue- und Perjod-Säure-Schiff-Färbung	25
2.4.3 Immunhistochemische Färbungen	26
2.4.3.1 Chromogene Färbung	26
2.4.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung	29
2.5 Nukleinsäureanalytik	33
2.5.1 RNA-Isolierung aus Kortex und <i>Corpus Callosum</i>	33
2.5.2 Quantifizierung der Gesamt-RNA	33
2.5.3 Reverse Transkription	34
2.5.4 Kontroll-PCR	34

2.5.5	Primer-Etablierung	35
2.5.6	Reverse Transkription - Echtzeit-PCR (RT-rtPCR)	36
2.5.7	Gelelektrophorese	37
2.6	Astrozytenkultur	38
2.6.1	Herstellung und Behandlung der primären Astrozytenkultur mit Interferon- γ und Lipopolysaccharid	38
2.6.2	Zellviabilitätsbestimmung mittels des CTB-Assays	39
2.6.3	Nukleinsäureanalyse und Immunhistochemie der Astrozytenkultur	40
2.7	Auswertung	41
3.	Ergebnisse	44
3.1	Erhöhte Expression von C-MYC, STAT3, VCAM und TNFRSF1A im Cuprizone-Modell	44
3.1.1	Induktion der C-MYC-Expression nach Cuprizone-Intoxikation	44
3.1.2	Induktion der STAT3-Expression nach Cuprizone-Intoxikation	48
3.1.3	Induktion der VCAM1-Expression nach Cuprizone-Intoxikation	52
3.1.4	Induktion der TNFRSF1A-Expression nach Cuprizone-Intoxikation	57
3.2	Erhöhte mRNA-Expression von <i>C-Myc</i> , <i>Stat3</i> , <i>Vcam1</i> und <i>Tnfrsf1a</i> im Cuprizone-Modell	59
3.2.1	Induktion der <i>C-Myc</i> -mRNA-Expression im Cuprizone-Modell	60
3.2.2	Induktion der <i>Stat3</i> -mRNA-Expression im Cuprizone-Modell	61
3.2.3	Induktion der <i>Vcam1</i> -mRNA-Expression im Cuprizone-Modell	62
3.2.4	Induktion der <i>Tnfrsf1a</i> -mRNA-Expression im Cuprizone-Modell	62
3.3	Erhöhte Expression von C-MYC und STAT3 im LPC-Modell	63
3.3.1	Eine LPC-induzierte Demyelinisierung führt zu einer Zunahme der C-MYC-Proteinexpression	64
3.3.2	Eine LPC-induzierte Demyelinisierung führt zu einer Zunahme der STAT3-Proteinexpression	64
3.4	Expression von C-MYC und STAT3 in Gliazellen im Cuprizone-Modell	68
3.4.1	C-MYC-Expression in Mikroglia	68
3.4.2	STAT3-Expression in Astrozyten	71
3.5	Expression von C-MYC und STAT3 in peripheren Immunzellen im CupEAE-Modell	73
3.6	mRNA-Expression von <i>C-Myc</i> , <i>Stat3</i> , <i>Vcam1</i> und <i>Tnfrsf1a</i> in aktivierten Astrozyten	76
4.	Diskussion	79
4.1.	MS-Pathogenese	79

4.1.1. Die Rolle von C-MYC, STAT3, VCAM1 und TNFRSF1A in der neurodegenerativen Komponente der MS-Pathogenese	81
4.1.2. Die Rolle von C-MYC und STAT3 in der inflammatorischen Komponente der MS-Pathogenese	84
4.1.3. Ausblick	85
4.2. Die Astrozyten in der MS-Pathogenese	86
4.2.1. Die Rolle von STAT3 in der Funktion von Astrozyten	87
4.2.2. Die Rolle von VCAM1 in der Funktion von Astrozyten	87
4.2.3. Die Rolle von TNFRSF1A in der Funktion von Astrozyten	88
4.2.4. Limitationen und zukünftige Projekte	89
4.2.5. Fazit	90
5. Zusammenfassung	92
III. Abbildungsverzeichnis	94
IV. Tabellenverzeichnis	96
V. Literaturverzeichnis	98
VI. Anhang: Materialienliste	110
VII. Eidesstattliche Versicherung	113
VIII. Danksagung	114

II. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Komplex Avidin-Biotin-Komplex

Abb.	Abbildung
BSA	Bovines Serum Albumin
C-MYC	Zelluläres Myelomatose-Onkogen (engl. Cellular Myelomatosis-Oncogen)
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CC	Corpus Callosum
CD	Cluster of Differentiation
CIS	klinisch isoliertes Syndrom (engl. Clinically Isolated Syndrome)
Cup	Cuprizone
CTB-Assay	CellTiter-Blue Cell-Viability-Assay
CWFS	engl. Cold Water Fish Skin Gelatin
Cx	Kortex (engl. Cortex)
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic Acid)
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (engl. Enhanced Green Fluorescent Protein)
FBS	Fetales Rinderserum (engl. Fetal Bovine Serum)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. Glial Fibrillary Acidic Protein)
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien (engl. Genome Wide Association Studies)
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Hitzeinduzierte Demaskierungsmethode (engl. Heat Induced Epitope Retrieval)
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen (engl. Human Leukocyte Antigen)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish Peroxidase)
Iba1	Ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptormolekül (engl. Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule)
IF	Immunfluoreszenz
IFN γ	Interferon γ

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
Ko	Kontrolle
L	Liter
LFB/PAS	Luxol-Fast-Blue- und Perjod-Säure-Schiff-Färbung
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharid
MAX	Myc-assoziiertes Faktor X (engl. Myc-Associated Factor X)
MBP	Myelin-Basisches-Protein
mCC	mediales Corpus Callosum
M-MLV	Moloney Murines Leukämie Virus, (engl. Moloney Murine Leukemia Virus)
MOG ₃₅₋₅₅	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
N.	Nervus
Neg.Ko	Negativkontrolle
od.	oder
PenStrep	Penicilin/Streptomycin
PCR	Polymerasen-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PIRA	schubunabhängige Progression (engl. Progression Independent of Relapse Activity)
PLP	Proteolipid-Protein
Pos.Ko	Positivkontrolle
PPMS	primär progrediente MS (engl. Primary Progressive MS)
RT-rtPCR	Reverse Transkription - Echtzeit-Polymerasen-Ketten-Reaktion (engl. Reverse Transcription Real-Time-PCR)
RIS	radiologisch isoliertes Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid)
ROI	Region of interest
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. Relapsing Remitting MS)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription- Polymerasen-Ketten-Reaktion

S.	Seite
s.	siehe
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
siRNA	kleine eingreifende RNA (engl. short interfering RNA)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. Single Nucleotid Polymorphism)
SPMS	sekundäre progrediente MS (engl. Secondary Progressive MS)
STAT3	Signal-transduktor und Aktivator des Transkriptionsfaktors 3 (engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 3)
Std	Stunde
St.	Standard
T _A	Primerhybridisierungstemperatur
Tab.	Tabelle
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TNFRSF1A	Tumor-Nektose-Faktor-Rezeptor-SF1 (engl. Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 1A)
TRAPS	TNFR-assoziiertes periodisches Syndrom
u.a.	und andere
UVB	Ultraviolettstrahlung B
VCAM1	Vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül (engl. Vascular Cell Adhesion Molecule 1)
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (engl. Vascular Endothelial Growth Factor)
W	Wochen
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste chronisch entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Sie tritt hauptsächlich bei Menschen im Alter von 20 bis 40 Jahren auf. Frauen sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Männer. Die Prävalenz ist in den äquatorialen Zonen niedriger als in nördlichen und südlichen Regionen der Welt. In Deutschland liegt die Prävalenz bei 303 Fällen je 100.000 Einwohner [4]. Erste Beschreibungen des Krankheitsbildes wurden im 19. Jahrhundert von Jean Cruveilhier und Friedrich Theodor von Frerichs dokumentiert. Im Jahr 1868 hat Jean Martin Charcot erstmalig die klinische Symptomatik mit den pathologischen Läsionen in Zusammenhang gebracht und die Läsionen histologisch beschrieben [2].

Die MS-Pathologie ist durch eine Schädigung der Markscheide der Axone in der weißen und grauen Substanz des ZNS gekennzeichnet. Diese Entmarkungsherde liegen hauptsächlich periventrikulär, im *Nervus opticus*, im Hirnstamm, im Rückenmark und in den Kleinhirnstielen. Histologisch sind die frühen Läsionen durch Myelinverlust und Entzündungsinfiltrate, bestehend aus Mikroglia, Makrophagen und T-Lymphozyten, gekennzeichnet. Die Entzündungsreaktion in den MS-Läsionen verursacht axonale Schäden, die von einer Gliazellaktivierung begleitet werden [5, 6]. Nach der Entmarkung kann eine Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen mit nachfolgender Remyelinisierung der Axone stattfinden. Chronische MS-Läsionen sind durch dauerhafte Demyelinisierung, axonale Schäden und eine reaktive Gliose gekennzeichnet. Die Krankheitsprogression wird überwiegend durch die Ausprägung der Demyelinisierung und durch den axonalen Verlust im ZNS bestimmt [2].

Das klinische Bild der MS beginnt meist mit Sehstörungen, die durch eine Neuritis nervi optici verursacht werden. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu motorischen und sensiblen Ausfällen, zu vegetativen Defiziten und zu psychischen Störungen. Abhängig von der Lokalisation der Entmarkungsherde entwickelt sich ein heterogenes Krankheitsbild. Je nach Krankheitsprogression werden folgende MS-Formen gemäß den Lublin Kriterien unterschieden [7]: Die Mehrheit der Patienten, 80–85 %, weist zu Beginn eine schubförmig-remittierende Verlaufsform auf (engl. Relapsing Remitting MS, RRMS). Die Schübe sind durch neue Ausfälle und Symptome charakterisiert und dauern länger als 24 Stunden an. Die Patienten zeigen nach Tagen bis Wochen eine vollständige oder partielle Remission [6]. Ein Teil der RRMS-Patienten zeigt zwischen den Schüben keine Krankheitsprogression. Jedoch weist ein erheblicher Anteil an Patienten ein Fortschreiten der Symptomatik, das unabhängig

von Schüben auftritt (schubunabhängige Progression, engl. Progression Independent of Relapse Activity, PIRA) [8]. Die meisten Patienten mit RRMS entwickeln im Verlauf der Krankheit eine sekundäre progrediente MS-Form (engl. Secondary Progressive MS, SPMS) [9]. Dabei kommt es zu einer fortschreitenden Zunahme der neurologischen Dysfunktionen. Bei 10 bis 15 % der MS-Patienten tritt von Krankheitsbeginn an eine progressive Verlaufsform auf, die als primär progrediente MS bezeichnet

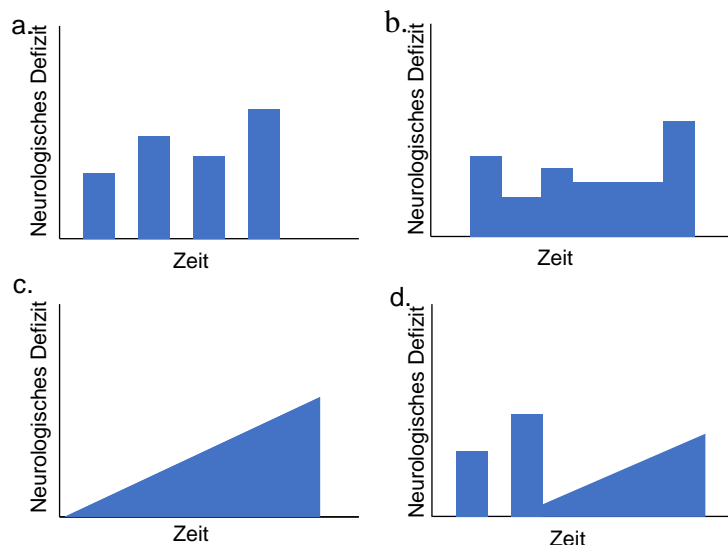


Abbildung 1: Schematische Darstellung der MS-Verlaufsformen. (a) zeigt die schubförmig-remittierende MS mit vollständiger Remission. (b) zeigt die schubförmig-remittierende MS mit partieller Remission. (c) zeigt die primär progrediente MS. (d) zeigt die sekundäre progrediente MS (modifiziert nach Schmidt et al. [2]).

wird (engl. Primary Progressive MS, PPMS). Diese Verlaufsform betrifft das weibliche und das männliche Geschlecht gleichermaßen und tritt ca. 10 Jahre später als die RRMS auf. Ein klinisches Krankheitsbild, das die radiologischen diagnostischen Kriterien nicht erfüllt, wird als ‚klinisch isoliertes Syndrom‘ (engl. Clinically Isolated Syndrome, CIS) bezeichnet. Im Gegensatz dazu wird eine MS-typische radiologische Läsion, die von einem pathologischen Liquor-Befund ohne klinische Symptome begleitet wird, ‚radiologisch isoliertes Syndrom‘ (engl. Radiologically Isolated Syndrome, RIS) genannt [6]. Die verschiedenen Verlaufsformen sind in Abbildung (Abb.) 1 dargestellt.

Die Ätiologie der MS ist nicht eindeutig geklärt. Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren spielen eine bedeutsame Rolle. Kinder von MS-Patienten haben ein 20fach erhöhtes Risiko, an MS zu erkranken. Eineiige Zwillinge haben ein Erkrankungsrisiko von 25 %, wenn der andere Zwilling bereits an MS leidet. Auch die ethnische Aufteilung der Prävalenz spricht für eine genetische Komponente der MS-Ätiologie [6]. Es wurde des Weiteren gezeigt, dass das Allel *DRB1*1501* in der HLA-Region (Humanes Leukozyten Antigen, HLA) mit der MS-Pathologie assoziiert ist und das MS-Erkrankungsrisiko dreifach erhöht [10, 11]. Außerdem sind Umweltfaktoren wie eine symptomatische EBV-Infektion (Epstein-Barr-Virus, EBV) oder das Rauchen mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert [8, 9]. MS-Patienten haben eine höhere EBV-Seropositivität als gesunde Probanden [12-14]. Die Ätiologie ist diesbezüglich nicht geklärt [15, 16]. Das Stickstoffmonoxid, das beim Rauchen freigesetzt wird, kann eine Schädigung von Neuronen und Oligodendrozyten verursachen, die

die erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit unter Rauchern erklären könnte [17]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine UVB-Exposition (Ultraviolettstrahlung B) das Erkrankungsrisiko senkt [18]. Laut Breuer et al. gibt es Hinweise dafür, dass Vitamin D sowohl das Erkrankungsrisiko als auch die Krankheitsprogression reduziert [19]. Die antiinflammatorische und immunmodulierende Wirkung von Vitamin D könnte die Immunreaktion in der MS-Pathogenese abschwächen [20].

Zur Diagnosestellung einer MS werden die McDonald Diagnosekriterien angewendet, welche klinische, radiologische sowie laborchemische Befunde beinhalten [21]. Klinisch können die neurologischen Defizite mit Hilfe der EDSS-Skala (engl. Expanded Disability Status Scale) eingestuft werden. Radiologisch sind im kranialen und im Rückenmark-MRT (MRT: Magnetresonanztomographie) die MS-typischen Entmarkungsherde sichtbar. In der Liquor-Untersuchung können häufig eine leichte Pleozytose, eine intrathekale IgG- und IgM-Synthese (Immunglobulin, Ig), oligoklonale IgG-Banden und ein positiver Antikörper-Synthese-Index für neurotrope Viren nachgewiesen werden [6].

Therapeutisch werden drei Säulen für die Behandlung der MS unterschieden. Akute Schübe werden mit hochdosierten Glukokortikoiden und bei nicht ausreichendem Ansprechen mit einer Apherese-Therapie, mittels Plasmapherese oder Immunadsorption behandelt. Als Basistherapie werden immunmodulierende Wirkstoffe eingesetzt. Diese werden je nach Wirksamkeit in drei Klassen eingeteilt. In der Wirksamkeitskategorie 1, welche eine relative Reduktion der Schubrate von 30-50% im Vergleich zu Placebo erreicht, gehören die Interferon- β , Dimethylfumarat, Glatirameramide sowie Teriflunomid. Die Medikamente der Wirksamkeitskategorie 2 (Cladribin, Fingolimod, Ozanimod) führen zu einer relativen Reduktion der Schubrate von 50-60% im Vergleich zu Placebo. In der Wirksamkeitsklasse 3 gehören Alemtuzumab, Natalizumab und die CD20-Antikörper (Ocrelizumab, Rituximab). Diese gehen mit einer relativen Reduktion der Schubrate von >60% im Vergleich zu Placebo einher [22]. Die dritte Säule ist die symptomatische Therapie von Fatigue, Schmerzen, Spastik, u.a. [6]. Im Jahr 2017 wurde Ocrelizumab als das erste Präparat für die PPMS zugelassen [23]. Neben dem Ocrelizumab kann auch Rituximab als Off-label Use Therapiemöglichkeit bei PPMS-Patienten eingesetzt werden [22].

1.2 Hypothesen zur MS-Pathogenese

Trotz intensiver Forschung konnte die MS-Pathogenese bis heute nicht geklärt werden. Zwei Hypothesen existieren diesbezüglich: Die ‚Outside-in‘-Hypothese, bei der die Pathogenese in der Peripherie beginnt, und die ‚Inside-out‘-Hypothese, die durch gehirnintrinsische Prozesse getriggert wird.

Die MS weist typische Merkmale einer Autoimmunerkrankung auf. In der MRT-Bildgebung sind die inflammatorischen Läsionen anhand der erhöhten Gadolinium-Aufnahme erkennbar.

Außerdem gibt die Anwesenheit von perivaskulären Infiltraten im ZNS einen Hinweis darauf, dass die Blut-Hirn-Schranke geschädigt ist und somit der Zugang der peripheren Immunzellen in das ZNS ermöglicht wird. Diese Beobachtungen stützen die ‚Outside-in‘-Hypothese [24]. Laut dieser liegt der Defekt im peripheren Immunsystem. Autoreaktive T-Lymphozyten entstehen in den sekundären lymphatischen Organen, wandern in das ZNS und verursachen dort eine inflammatorische Reaktion [25]. Diese ‚Outside-in‘-Hypothese wird durch Ergebnisse von genomweiten Assoziationsstudien (engl. GWAS, Genome Wide Association Studies) unterstützt. Mittels der GWAS können Gene identifiziert werden, die mit einer Erkrankung assoziiert sind. Dabei werden die Einzelnukleotid-Polymorphismen von Genen untersucht (engl. SNP, Single Nucleotide Polymorphism). Das Genom einer Kohortengruppe, in diesem Fall der MS-Patienten, wird mit dem Genom einer Kontrollgruppe verglichen. Im Rahmen von GWAS wurden über 200 Gene identifiziert, die mit der MS assoziiert sind [26]. Die meisten MS-assoziierten SNPs liegen in Genen, die in peripheren Immunzellen überexprimiert werden [27]. Ihre Genprodukte sind teilweise Zytokine (IL7, IL12A, IL12B, TNFSF14), Zytokinrezeptoren (TNFRSF1A, IL2RA, IL7R), kostimulierende Moleküle (CD6, CD40) oder an der Signaltransduktion beteiligte Moleküle (STAT3, CBLB, MALT1). Nur eine geringe Anzahl dieser identifizierten Proteine ist an neurodegenerativen Prozessen beteiligt (KIF21B, MAPK, GALC) oder wird in Mikroglia exprimiert [28]. Die Tatsache jedoch, dass die meisten MS-assoziierten Gene in Zellen des adaptiven Immunsystems überexprimiert werden, spricht dafür, dass die MS-Pathogenese durch eine Dysregulation des Immunsystems verursacht wird [10, 27]. Außerdem sind einige der MS-assoziierten Gene auch mit anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert, zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 1, Colitis Ulcerosa oder Rheumatoide Arthritis, was auf die immunologische Komponente der MS-Pathogenese hinweist [11, 29].

Laut der ‚Inside-out‘-Hypothese beginnt die MS-Pathogenese durch gehirnintrinsische Prozesse, die sekundär zu einer peripheren Immunzellrekrutierung führen. Es wird davon ausgegangen, dass die Apoptose von Oligodendrozyten diese Kaskade induziert. Dadurch kommt es zu einer Demyelinisierung im ZNS. Die Freisetzung der Myelinbestandteile führt sekundär zu einer Aktivierung des Immunsystems. Infolgedessen wandern die peripheren Immunzellen in das ZNS und lösen eine inflammatorische Reaktion gegen die Myelinbestandteile aus [24]. Traka et al. konnten zeigen, dass eine Oligodendrozytenapoptose in der chronischen Demyelinisierungsphase eine Aktivierung von CD4+T-Lymphozyten hervorrufen kann. Durch diese Oligodendrozytenapoptose werden Myelinbestandteile, wie das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG₃₅₋₅₅), freigesetzt. Folglich wandern die aktivierten CD4+T-Lymphozyten in das ZNS. Des Weiteren induzieren diese gehirnintrinsischen Prozesse die Bildung MOG₃₅₋₅₅-spezifischer autoreaktiver CD4+T-

Zellen in der Milz [25]. Barnett und Prineas haben MS-Läsionen von Patienten untersucht, die während eines MS-Schubes oder kurz danach gestorben sind. In diesen MS-Läsionen beobachteten sie, dass eine Oligodendrozytenapoptose und eine Mikrogliaaktivierung stattfanden. Es konnten fast keine T-Lymphozyten sowie Makrophagen in diesen Läsionen nachgewiesen werden. Anhand ihrer Untersuchungen stellten sie die Hypothese auf, dass die Pathogenese durch die Oligodendrozytenapoptose hervorgerufen wird. Diese Apoptose induziert im Anschluss eine Phagozytose der Oligodendrozyten durch die aktivierten Mikroglia. Erst im dritten Stadium wird eine Rekrutierung von T-Lymphozyten und Makrophagen beobachtet. Anschließend, in der Regenerationsphase, kommt es in diesen Läsionen zu einer Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen [30]. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass gehirnintrinsische Prozesse die Rekrutierung von peripheren Immunzellen induzieren können. Es wurden dabei Mäuse untersucht, die mit Cuprizone gefüttert und anschließend gegen MOG₃₅₋₅₅ immunisiert wurden. Nach einer Cuprizone-Fütterung kam es zu einer Oligodendrozytenapoptose mit Mikrogliaaktivierung, ähnlich der MS-Läsionen, die von Barnett und Prineas beschrieben wurden. Die MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung verursachte eine periphere Immunzellstimulation. Diese Mäuse wiesen im Vergleich zu solchen, die nur gegen MOG₃₅₋₅₅ immunisiert waren oder nur mit Cuprizone gefüttert wurden, eine höhere Anzahl von perivaskulären inflammatorischen Läsionen auf. Diese Befunde zeigen, dass eine vorbestehende gehirnintrinsische Zytodegeneration mit begleitender Gliose Voraussetzung für die Aktivierung und Rekrutierung von peripheren Immunzellen ist [31]. Laut Rodriguez et al. beginnt die Demyelinisierung in den MS-Läsionen in den inneren Myelinschichten, was gegen eine durch periphere Immunzellen induzierte Demyelinisierung spricht [32]. Würden die peripheren Immunzellen die Myelinscheide angreifen, wäre zu erwarten, dass zunächst die äußeren Myelinschichten von der Demyelinisierung betroffen sind [24]. Zudem wurden Entmarkungsherde mit axonalen Schäden in der weißen Substanz ohne begleitende inflammatorische Reaktion beschrieben [24, 33]. Des Weiteren konnte die bis heute eingesetzte medikamentöse Therapie, die Neurodegeneration nicht verhindern. Die aktuelle MS-Medikation zielt darauf, die Inflammation zu hemmen. Obwohl damit die Schübe bei der schubförmig-remittierenden MS-Verlaufsform wirksam unterdrückt werden, wird die neurodegenerative Komponente der Erkrankung, also das Fortschreiten der klinischen Beeinträchtigung, nicht gehemmt [34, 35]. Metz et al. haben zudem die therapeutische Wirksamkeit einer autologen Stammzelltransplantation untersucht. Sie haben festgestellt, dass trotz der Immunsuppression die Demyelinisierung und die damit einhergehende axonalen Schäden weiter voranschreiten [36].

1.3 Bedeutung der Astrozyten in der MS-Pathogenese

Astrozyten bilden die größte Gliazellpopulation im ZNS und sind essenziell für dessen regelhafte Funktion. Sie regulieren den Blutfluss durch Sekretion von Prostaglandin E, sind bei der Bildung der Extrazellulärmatrix beteiligt und steuern durch Sekretion von Chemokinen, Zytokinen sowie Wachstumsfaktoren die Homöostase des ZNS-Milieus [37, 38]. Sie schützen zudem die Neurone vor oxidativem Stress [37, 39]. Außerdem stehen Astrozyten über Gap-Junctions mit Oligodendrozyten und Neuronen in Kontakt und regulieren somit den interzellulären Transport von Metaboliten und Ionen [37, 40]. Mit ihren Fortsätzen beteiligen sie sich an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke. Nach Kontakt zu fremden Antigenen im perivaskulären Raum stimulieren sie eine Immunreaktion. Durch Zytokinsekretion können sie die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und das Ausmaß der peripheren Immunzellrekrutierung in das ZNS steuern [41]. Weitere Hinweise auf die immunregulatorische Funktion der Astrozyten im ZNS sind die Expression des Toll-Like-Rezeptors 3 und die darauffolgende Sekretion von Interleukinen und Chemokinen [42].

In aktiven MS-Läsionen kommt es zu einer Astrozytenaktivierung, die als Astrogliose bezeichnet wird. Merkmale einer Astrogliose sind hypertrophe Astrozyten mit prominenten zytoplasmatischen Zellfortsätzen und eine Induktion der Expression des sauren Gliafaserproteins (engl. Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) [43, 44]. In aktiven MS-Läsionen ist auch eine Auflockerung der *Membrana limitans glialis perivascularis* zu beobachten, die eine Einwanderung von peripheren Zellen über die Blut-Hirn-Schranke erleichtert [45, 46]. Eine Astrogliose wird auch während einer Cuprizone-Intoxikation beobachtet [47]. Im Gegensatz zu den aktiven Läsionen haben die Astrozyten in inaktiven Läsionen einen kleinen Zellkörper sowie Nukleus und ihre Zellfortsätze sind schmal und lang [38].

Die Rolle von Astrozyten bei der MS-Pathogenese ist noch unklar. Es wird kontrovers diskutiert, ob eine Astrogliose die Progression der MS-Pathogenese fördert oder verhindert. Nach einer ZNS-Läsion bilden Astrozyten eine Glianarbe [48]. Diese verhindert die Ausbreitung der Läsion in das umgebende ZNS-Gewebe. Gleichzeitig erschwert sie jedoch die Remyelinisierungsprozesse. Es wurde dennoch beschrieben, dass durch das Fehlen von Astrozyten die Mikrogliaerekrutierung gestört ist. Ohne eine regelhafte Mikrogliaerekrutierung kann das zerstörte Myelin nicht phagozytiert werden und die Remyelinisierung nicht erfolgen [49]. Diese scheinbar widersprüchlichen Funktionen der Astrozyten in der MS-Pathogenese verdeutlichen, dass deren Rolle noch nicht geklärt ist und in weiteren Studien genauer untersucht werden sollte.

1.4 Verwendete tierexperimentelle MS-Modelle

1.4.1 Cuprizone-Modell

Das Verständnis der MS-Pathogenese ist essenziell, um neue therapeutische Methoden zu erforschen. Um die daran beteiligten Prozesse darzustellen, werden tierexperimentelle Modelle genutzt, zum Beispiel das Cuprizone-Modell. Dieses ist ein toxisches Demyelinisierungsmodell, das die neurodegenerativen Aspekte der MS widerspiegeln kann. Der Pathomechanismus von Cuprizone ist noch nicht eindeutig erforscht. Cuprizone wurde im Jahr 1950 erstmalig von Gustav Nilsson beschrieben. Es ist das Kondensationsprodukt aus Oxalyldihydroxiden sowie Cyclohexanon und ist ein Kupferchelator [50]. Kupfer ist ein bedeutsamer Kofaktor zahlreicher Enzyme im Energiestoffwechsel, zum Beispiel der Cytochrom-C-Oxydase in der mitochondrialen Atmungskette [3, 51]. Durch die Bindung an den Chelator wird die Kupferhomöostase gestört [52]. Histopathologisch betrachtet bewirkt die Cuprizone-Intoxikation die Bildung von Riesenmitochondrien in der Leber und in reifen Oligodendrozyten [53, 54]. Die Bildung dieser Riesenmitochondrien verursacht einen oxidativen Stress und eine Dysfunktion des endoplasmatischen Retikulums. Infolgedessen nimmt auch die Myelinproduktion ab [52]. Es kommt zu einer Oligodendrozytenapoptose und einer Demyelinisierung. Die am stärksten betroffene Bereiche sind das *Corpus Callosum*, der *Hippocampus*, der ventrale Teil des *Nucleus caudatus*, das *Putamen* und die Kleinhirnerne [55].

Mit Hilfe des Cuprizone-Modells können De- und Remyelinisierungsprozesse untersucht werden. Nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation kommt es zur ‚akuten Demyelinisierung‘. Histopathologisch ist eine Oligodendrozytenapoptose mit Myelinscheidenverlust begleitet von einer Mikrogliaaktivierung und einer Astroglie zu beobachten [47, 56]. Im Cuprizone-Modell findet keine wesentliche T-Zell-Infiltration in das ZNS statt – sie wird vermutlich durch die intakte Blut-Hirn-Schranke verhindert [57]. Laut Morell et al. beginnt die Demyelinisierung in der dritten Woche nach Beginn der Cuprizone-Intoxikation und erreicht ihr Maximum in der vierten bis fünften Woche [58]. Ab der sechsten Woche ist auch unter fortbestehender Cuprizone-Intoxikation eine partielle Remyelinisierung feststellbar. Wird die Cuprizone-Intoxikation nach der fünften Woche abgebrochen, findet eine vollständige Remyelinisierung statt [59]. Eine zwölfwöchige Cuprizone-Intoxikation wird als ‚chronische Demyelinisierung‘ bezeichnet. Wird die Cuprizone-Intoxikation nach zwölf Wochen abgebrochen, ist eine Remyelinisierung nur eingeschränkt möglich [3, 55, 60].

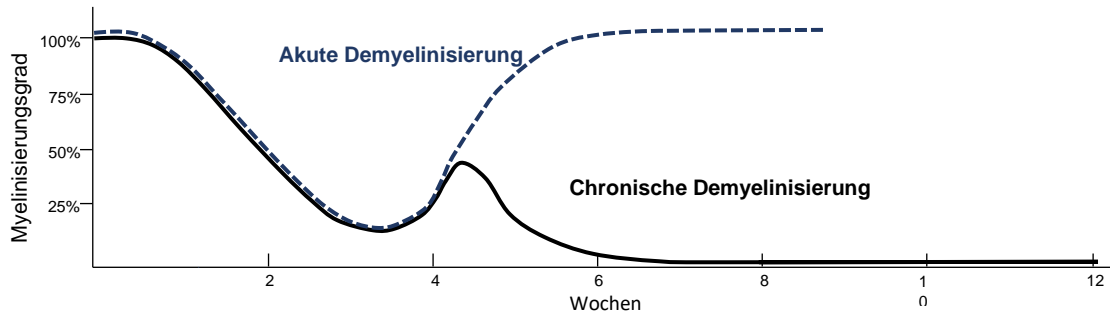


Abbildung 2: Schemazeichnung der akuten und chronischen Demyelinisierung nach Cuprizone-Intoxikation (modifiziert nach Matsushima et al. [3])

1.4.2 Cup/EAE-Modell

Das Cup/EAE-Modell ist eine Kombination aus dem Cuprizone-Modell und dem EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis)-Modell. Das Cuprizone-Modell ist, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, ein nichtautoimmunes Demyelinisierungsmodell [31]. Das EAE-Modell ist ein autoimmun-inflammatorisches Demyelinisierungsmodell. Dem Versuchstier wird dabei ein ZNS-assoziiertes Antigen injiziert, das eine Autoimmunreaktion auslöst. ZNS-assoziierte Antigene, die bei der EAE benutzt werden, sind das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG₃₅₋₅₅), das Proteolipid-Protein (PLP) und das Myelin-Basische-Protein (MBP). Antigen-präsentierende Zellen nehmen das Antigen auf und transportieren es über die Lymphbahnen zu den lymphatischen Organen. Dort werden Th1- und Th17-Zellen aktiviert, die das ZNS infiltrieren und eine Inflammation bewirken [9]. Die EAE kann auch durch die Injektion von autoimmunen myelinspezifischen T-Zellen in naiven oder immundefizienten Mäusen ausgelöst werden [61]. Histopathologisch ist am EAE-Modell eine periphere Immunezellinfiltration in das ZNS begleitet von Demyelinisierung und axonaler Degeneration zu beobachten [9]. Im EAE-Modell sind vor allem das Rückenmark, das Kleinhirn und der *Nervus opticus* betroffen [31, 62]. Das EAE-Modell an Mäusen wurde erstmals im Jahr 1949 von Olitsky und Yager beschrieben. Sie haben dafür Albino-Mäuse des Stammes Swiss verwendet und diese mit ZNS-Homogenat und Freund-Adjuvant, bestehend aus *Mycobacterium tuberculosis*, Paraffinöl und Kochsalzlösung, immunisiert [63]. Die Reaktion auf eine EAE-Immunsierung ist vom Mausstamm abhängig. Eine PLP-Immunsierung verursacht in SJL-Mäusen einen schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf. Im Gegensatz dazu nimmt in C57BL/6-Mäusen der klinische Verlauf nach der MOG₃₅₋₅₅-Immunsierung eine monophasische, chronische Form an [9, 61]. NOD-Mäuse zeigen nach einer MOG₃₅₋₅₅-Immunsierung einen schubförmig-remittierenden Verlauf und anschließend einen sekundären progressiven Verlauf [64]. Große Fortschritte in der MS-Forschung konnten mit Hilfe des EAE-Modells erzielt werden. An diesem wurden die Medikamente Natalizumab und Glatirameracetat entwickelt [9]. Im EAE-Modell werden aber

nicht alle Aspekte der MS-Pathologie widergespiegelt. Im Gegensatz zu den MS-Läsionen gibt es im EAE-Modell keine Läsionen im Großhirn. Diese Problematik konnte unsere Arbeitsgruppe mit dem Cup/EAE-Modell lösen. Dafür wird das autoimmun-inflammatorische Demyelinisierungsmodell der EAE mit den nichtautoimmunen neurodegenerativen Demyelinisierungsprozessen des Cuprizon-Modells kombiniert. Die Mäuse werden zunächst mit 0,25 % Cuprizon gefüttert und anschließend mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Im Cup/EAE-Modell sind perivaskuläre Infiltrate im Großhirn lokalisierbar [31], die ein Merkmal der akuten MS-Läsionen darstellen [65].

1.4.3 LPC-Modell

Das LPC-Modell ist ein nichtautoimmunes, toxisches Demyelinisierungsmodell, bei dem Lysophosphatidylcholin (LPC) stereotaktisch in das *Corpus Callosum* der Versuchstiere injiziert wird [66]. LPC ist ein endogenes Lysophospholipid. Es wird durch die Spaltung eines glycerinhaltigen Phospholipids mittels der Phospholipase A₂ gebildet [67]. LPC lagert sich in die Phospholipiddoppelschicht der Zellen ein und induziert dort die Bildung von Mizellen [68-70]. Somit erhöht sich die Permeabilität dieser Membranen, bis sie zerstört werden [71]. Wie von Plemel et al. beschrieben, sind erhöhte LPC-Spiegel sowohl mit neurologischen Erkrankungen, wie Ischämie [72], Amyotrophe Lateralsklerose [73] oder Rückenmarksverletzungen [74], als auch mit internistischen Erkrankungen, zum Beispiel koronarer Herzkrankheit, assoziiert [71, 75]. Bei MS-Patienten sind erhöhte LPC-Spiegel im *Liquor cerebrospinalis* zu finden [76]. Hall war der Erste, der dieses Modell beschrieben hat. Er hat beobachtet, dass die LPC-Injektion in das Rückenmark eine Demyelinisierung auslöst [77]. Histopathologisch ist eine Astroglie und eine Oligodendrozytenapoptose mit begleitender Demyelinisierung zu finden [71]. Zudem induziert LPC eine Immunreaktion. Die Anzahl von Monozyten, Makrophagen und Mikroglia nimmt zu. Auch eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wurde beobachtet [78]. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass im LPC-Modell, genau wie im Cuprizon- und im EAE-Modell, axonale Schäden in den demyelinisierten Bereichen nachzuweisen sind [79]. Eine bis zwei Stunden nach der LPC-Injektion kann eine Myelin- und Axonschwellung beobachtet werden [71]. Nach Abbruch der LPC-Intoxikation findet nach einer Woche eine Remyelinisierung statt [80].

1.5 Untersuchte Gene: *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1A*

Das Gen *C-Myc* (engl. Cellular Myelocytomatosis-Oncogene) gehört zur Familie der *Myc*-Gene [81] und entspricht dem zellulären Homolog des retroviralen *v-myc*-Onkogens [82]. Es besteht aus drei Exons, liegt im Chromosom 8 und kodiert den Transkriptionsfaktor C-MYC [83]. Zusammen mit dem Protein MAX (engl. Myc-Associated Factor X) bildet C-MYC

Heterodimere und reguliert die Expression verschiedener Gene [84, 85]. Ob diese Heterodimer-Bildung Voraussetzung für die Funktion von C-MYC als Transkriptionsfaktor ist, wurde noch nicht ausreichend erforscht [86]. C-MYC stimuliert Gene, die an der Proteinbiosynthese, dem Tumormetabolismus und dem Zellzyklus beteiligt sind [87]. Es wird behauptet, dass C-MYC die Expression von 10 bis 15 % aller Säugetiergene reguliert [86]. Wie in der Übersichtsarbeit von Gnanaprakasam et al. beschrieben, ist C-MYC relevant bei der Regulation des Immunsystems, indem es an der Aktivierung, Reifung und Differenzierung der Immunzellen beteiligt ist [88]. Campisi et al. haben beschrieben, dass in ruhenden Zellen keine *C-Myc*-Expression stattfindet [89]. Bei fehlendem *C-Myc* ist die Zellteilungsrate verlangsamt [90]. Außerdem führt das Fehlen von *C-Myc* in den Keimbahnzellen zu embryonalen Abnormalitäten und schließlich zum embryonalen Tod [81, 91].

Das Gen *Stat3* (engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 3) gehört zur Familie der *Stat*-Gene. Es liegt auf dem Chromosom 17, besteht aus 24 Exons und kodiert den Transkriptionsfaktor STAT3 [92]. Analog zu *C-Myc*, führt eine *Stat3*-Inaktivierung zum embryonalen Tod [93]. STAT3 spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum, bei der Differenzierung und der Apoptose der Zellen [94]. Im inaktiven Zustand liegt STAT3 im Zytoplasma. Die Stimulierung einer Zelle durch Zytokine führt mit Hilfe der Janus-Kinasen zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 und der Bildung von STAT3-Dimeren [95, 96]. Die STAT3-Dimere werden in den Nukleus transportiert und regulieren dort die Expression von mehreren Genen [97]. Anschließend werden die Dimere dephosphoryliert und STAT3 wird in das Zytoplasma zurücktransportiert. Die Funktionen von STAT3 wurden in Bezug auf unterschiedliche Zellen beschrieben. Wie Egwuagu dargelegt hat, ist STAT3 ein bedeutsamer Regulator des Immunsystems, da er an der Differenzierung der T-Lymphozyten beteiligt ist. Mäuse, bei denen das *Stat3*-Gen aus den CD4⁺T-Lymphozyten entfernt wurde, sind resistent gegen eine EAE, da die T-Lymphozyten nicht in das ZNS einwandern können. Eine Dysregulation von STAT3 fördert laut Egwuagu die Entwicklung von neuroinflammatorischen Erkrankungen [98]. Zudem ist STAT3 bei der Induktion der Akuten-Phase-Reaktion in der Leber beteiligt [99], reguliert die Differenzierung sowie das Zellwachstum von B- [100] und T-Lymphozyten [101], die inflammatorische Reaktion von Makrophagen [102], induziert die Synthese von Chemokinen in den Immunzellen [103] und fungiert sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressorgen [104].

Das Gen *Vcam1* (engl. Vascular Cell Adhesion Molecule), auch CD106 genannt, gehört zur Immunglobulin-Familie, liegt im Chromosom 1 und besteht aus neun Exons [105]. Es kodiert das transmembrane Adhäsionsmolekül VCAM1, das am Gefäßendothel lokalisiert ist [106]. Das von Leukozyten exprimierte $\alpha 4\beta 1$ -Integrin bindet an VCAM1 [107]. Somit haften die in Blutgefäßen zirkulierenden Leukozyten an der Endothelwand und wandern durch diese ins

Gewebe. Voraussetzung für die Expression von VCAM1 an der Endothelwand ist die Stimulation durch Zytokine [108]. Zytokine wie TNF α , Interleukin 1 β oder das Adipokin Visfatin induzieren die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [109-111], die über NF κ B die Expression von VCAM1 stimulieren. VCAM1 ist auch in löslicher Form im Zytoplasma vorhanden. Die Funktion dieser Form ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt [106]. Eine besondere Relevanz wird dem Adhäsionsmolekül VCAM1 in der Pathogenese der Atherosklerose [112], des Asthmas [113, 114] und zahlreicher Tumore zugeschrieben [41, 115, 116]. Wie *C-Myc* und *Stat3* ist auch *Vcam1* für die embryonale Entwicklung essenziell, da das Fehlen von *Vcam1* zum embryonalen Tod führt [108]. Zudem ist VCAM1 in der EAE für die Migration von T-Lymphozyten in das ZNS notwendig. Auf dieser Beobachtung basiert auch die Therapie von MS-Patienten mit Natalizumab, einem humanen monoklonalen Antikörper gegen α 4 β 1-Integrin [117, 118]. Er bindet an das α 4 β 1-Integrin der Leukozyten und verhindert somit das Haften von Leukozyten über VCAM1 an den Endothelzellen. Folglich können die Leukozyten nicht in das ZNS einwandern [106, 113].

Das Gen *Tnfrsf1a* (engl. Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 1a), auch als CD120a, p55TNFR oder p60 bekannt, gehört zur *Tnfr*-Superfamilie und kodiert den Zytokinrezeptor TNFRSF1A, auch als TNFR1 beschrieben [119]. *Tnfrsf1a* wird konstitutiv in fast allen Zellen exprimiert. Es liegt im Chromosom 12 und besteht aus elf Exons [120]. TNFRSF1A enthält drei Anteile, die intra-, trans- und extrazellulären [121]. Der extrazelluläre Anteil besteht aus drei cysteinreichen Domänen, die bei der Bindung von TNF α an den Rezeptor einen Trimer bilden. Durch diese Bindung wird TNFRSF1A stimuliert [119]. Der stimulierte TNFRSF1A reguliert das Überleben oder die Apoptose der Zelle [122]. Er ist zudem in der inflammatorischen Reaktion von Lymphozyten beteiligt [123, 124]. Neben der membrangebundenen Form von TNFRSF1A gibt es auch eine lösliche Form [120]. Laut Finsen et al. verhindert die Bindung von TNF α an den löslichen TNFRSF1A die Entwicklung einer EAE. Auch das Fehlen von TNFRSF1A verhindert die Entwicklung einer EAE, da TNF α seine Wirkung nicht ausüben kann [125]. Die Relevanz von *Tnfrsf1a* im Immunsystem wird durch das TNFR-assoziierte periodische Syndrom (TRAPS) verdeutlicht. TRAPS ist eine autoinflammatorische Erkrankung, die durch eine Mutation im *Tnfrsf1a* hervorgerufen wird. Die Mutation verursacht eine dysregulierte inflammatorische Reaktion und eine Verstärkung der proinflammatorischen Wirkung von TNF α [123]. Klinisch wird diese Dysregulation durch rezidivierende Fieberschübe, abdominale Schmerzen, kutane Inflammation und Myalgien bemerkbar [126].

1.6 Fragestellung

Die MS ist eine neuroinflammatorische Erkrankung, die durch demyelinisierte Herde im Gehirn und im Rückenmark gekennzeichnet ist [35, 79]. Trotz jahrelanger Forschung konnte die Pathogenese der MS noch nicht abschließend geklärt werden. Die Theorien, die diesbezüglich existieren, können in zwei Hypothesen zusammengefasst werden. Gemäß der ‚Outside-in‘-Hypothese wird die Pathogenese durch eine Dysregulation des peripheren Immunsystems ausgelöst. Im Rahmen von GWAS wurde gezeigt, dass Gene, die bei MS-Patienten gehäuft Varianten aufzeigen, interessanterweise vor allem von Immunzellen exprimiert werden. Es wird dementsprechend vermutet, dass durch diese genetische Varianten das Immunsystem von MS-Patienten in seiner regelhaften Funktion gestört ist [27]. Diese Beobachtungen stützen die ‚Outside-in‘-Hypothese [127]. Im Gegensatz dazu ist die MS gemäß der ‚Inside-out‘-Hypothese eine primär zytodegenerative Erkrankung. Die Pathogenese wird hauptsächlich durch die Oligodendrozytenapoptose und die Gliazellaktivierung hervorgerufen [24]. Wie auch unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, verursachen diese gehirnintrinsischen Prozesse sekundär eine periphere Immunzellrekrutierung [31].

Unsere Arbeitsgruppe hatte in vorherigen Projekten anhand einer Microarray-Genanalyse festgestellt, dass die Expression der Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* im Cuprizone-Modell induziert wird [128]. In diesen Genen werden gemäß den GWAS gehäuft bei MS-Patienten Varianten nachgewiesen [27].

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung folgender Hypothese: Gene, die gehäuft bei MS-Patienten Varianten aufzeigen, werden in Gliazellen exprimiert. Dadurch ist die Funktion der Gliazellen gestört. Diese Störung führt zu einer gehirnintrinsischen Dysregulation, welche sekundär die Rekrutierung von peripheren Immunzellen induziert. Somit wird die ‚Inside-out‘-Hypothese gestützt. Wir haben deshalb die Expression der Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* in drei murinen MS-Modellen, dem Cuprizone-, dem Cup/EAE- und dem LPC-Modell, untersucht. Wir haben untersucht, ob sich die durch die Microarray-Genanalyse erhobenen Daten mit nukleinsäureanalytischen und immunhistochemischen Methoden bestätigen lassen. Anschließend haben wir versucht herauszufinden, in welchen Zellen diese Gene exprimiert werden. Dafür haben wir die Expression dieser Proteine in Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten immunhistochemisch untersucht. Zudem haben wir mit nukleinsäureanalytischen Verfahren die Genexpression in einer Astrozytenkultur untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Zusammensetzung der Puffer, Blockseren, Fixierungs- und Färbelösungen

Citratpuffer:

- 10,5 g Zitronensäure
- 5 L destilliertes Wasser
- pH auf 6,0 einstellen

DAB-Komplex:

- Verdünnung 1:50
- 20 µl DAB-Stock
- 980 µl DAB-Substrat

Eosin-Lösung:

- 1 g Eosin
- 100 ml destilliertes Wasser
- 1 Tropfen Eisessig

Hämatoxylin-Lösung:

- 1 g Hämatoxylin
- 1000 ml destilliertes Wasser
- 200 mg Natriumjodat
- 50 mg Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat
- 50 g Chloralhydrat
- 1 g Zitronensäure-Monohydrat

Lithiumcarbonat-Lösung:

- 0,05 g Lithiumcarbonat
- 100 ml destilliertes Wasser

Lithiumcarbonat-Lösung:

- 0,1 g Luxol Fast Blue MBS
- 100 ml 96% Ethanol
- 0,5 ml 100% Essigsäure

PBS-Puffer (10x):

- 477,5 g PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- 5 l destilliertes Wasser

PBS-Puffer (1x):

- 500 ml PBS (10x)
- 4500 ml destilliertes Wasser
- pH auf 7.4 einstellen

Perfusions-/Fixationslösung:

- 100 ml Formaldehyd 37 %
- 900 ml destilliertes Wasser
- 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat
- 8,0 g Dinatriumhydrogenphosphat

Perjodsäure-Lösung:

- 0,5 g Perjodsäure
- 100 ml destilliertes Wasser

Tris/EDTA:

- 6,05 g Tris
- 1,85 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat
- 5 L destilliertes Wasser
- pH auf 9.0 einstellen

0.025 % Triton/PBS:

- 0,25 ml Triton x100
- 999,75 ml PBS (1x)

0.3% H_2O_2 :

- 1 ml H_2O_2 (30% vol/vol)
- 99 ml PBS

2 % Ziegenserum/BSA/Tween/CWFS/PBS:

- 1 ml Normales Ziegenserum
- 250 µl Tween20 10% (100ml= 10ml Tween20 100% + 90 ml PBS)
- 0,5 g BSA
- 0,05 g CWFS Gelatin
- 49 ml PBS

5 % Eselserum/Triton/BSA/CWFS/PBS:

- 2,5 ml Normales Eselserum
- 0,1 g CWFS Gelatin
- 0,5 g BSA
- 50 µl Triton x100
- 47,5 ml PBS

5 % Ziegenserum:

- 2,5 ml Normal Ziegenserum
- 47,5 ml PBS (1x)

2.2 Tierexperimente

2.2.1 Versuchstiere und Haltung

Für dieses Projekt wurden C57BL/6J Mäuse (Janvier/Frankreich) benutzt. Die Mäuse wurden gemäß der „Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA)“ behandelt. Maximal fünf Mäuse durften in einem Käfig gehalten werden. Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen mit einem stabilen Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden bei $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ Raumtemperatur und $55 \% \pm 10 \%$ Luftfeuchtigkeit mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. In jedem Käfig gab es Einstreu, Nestlet, ein Mäusehäuschen, eine Trinkflasche und 100 g Futter, verteilt auf zwei Petrischalen. Die Käfige wurden jeden dritten Tag gewechselt. Die Versuchstiere wurden täglich von unserer Forschungsgruppe begutachtet. Alle Experimente wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchgenehmigungsnummer: ROB-55.2-2532.Vet_03-17-36).

2.2.2 Versuchsaufbau

Ziel dieses Projektes war es, die Expression der immunrelevanten Proteine, C-MYC, STAT3, VCAM1 und TNFRSF1A, in Demyelinisierungsmodellen zu untersuchen. Dafür wurden drei murine MS-Modelle verwendet. Die Behandlung der Mäuse bis zur Paraffineinbettung wurde von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Mir wurden die Paraffinschnitte des ZNS-Gewebes für die weiteren Versuche zur Verfügung gestellt.

2.2.2.1 Cuprizone-Modell

Beim ersten Tiermodell wurde eine toxische Demyelinisierung mit Cuprizone (Cup) induziert. Für die Behandlung wurden 8-Wochen alte Mäuse (19–21g) verwendet. Sie wurden in vier Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe, Kontrolle (n = 5), wurde für fünf Wochen mit normalem Futter gefüttert. Die weiteren Gruppen wurden für eine (1WCup, n = 5), drei (3WCup, n = 4) oder fünf (5WCup, n = 5) Wochen mit 0,25 % Cuprizone (0,5 g Cuprizone in 200 g Standardfutter) behandelt. Das Cuprizone-Futter wurde jeden Tag frisch vorbereitet.

2.2.2.2 LPC-Modell

Beim LPC-Modell wurde eine toxische Demyelinisierung mit Lysophosphatidylcholin (LPC) induziert. Die Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, der LPC-Gruppe und der Kontrollgruppe. Die chirurgischen Eingriffe wurden von unserer Forschungsgruppe unter Allgemeinanästhesie mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (50 mg/kg Körpergewicht) und Medetomidin (0,5 mg/Körpergewicht) durchgeführt. Zur schnelleren Erholung der Mäuse wurde ihnen Atipamezol (2,5 mg/Körpergewicht) injiziert. Zur Verhinderung einer Dehydrierung wurde ihnen 500 µl Ringer-Lösung injiziert. Die Mäuse

wurden für die stereotaktische Operation fixiert. Den LPC-Mäusen (n = 9) wurde 1 % LPC-Lösung (zwei Verabreichungen von 0,75 µL von 10 µg/ µL LPC aus Rinderhirn) beidseits in das *Corpus Callosum* injiziert. Die Kontrollgruppe (n = 10) erhielt beidseits 0,75 µL Kochsalzlösung [129]. Die Mäuse wurden von unserer Forschungsgruppe täglich überwacht und nach fünf Tagen transkardial perfundiert.

2.2.2.3 Cup/EAE-Modell

Beim Cup/EAE-Modell wurden die Mäuse (n = 4) zuerst für drei Wochen mit 0,25 % Cuprizone gefüttert. Anschließend wurden sie für zwei Wochen mit normalem Futter gefüttert. Zu Beginn der sechsten Woche wurden sie mit dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG₃₅₋₅₅), das in Freund-Adjuvant gelöst war, immunisiert. Direkt nach der Immunisierung und am folgenden Tag wurde den Mäusen in PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. Phosphate Buffered Saline) gelöstes Pertussis-Toxin verabreicht. Die Mäuse entwickelten infolgedessen klinische Symptome, die anhand eines Scoring-Systems von unserer Forschungsgruppe bewertet wurden. Nach ungefähr zwei Wochen wurden sie von unserer Forschungsgruppe transkardial perfundiert.

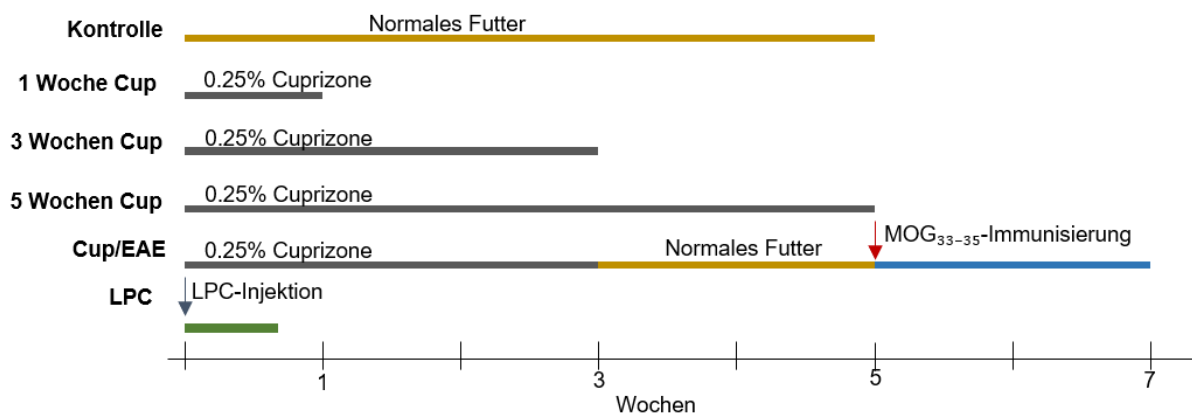


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die ersten vier Balken zeigen die vier Gruppen des Cuprizone-Modells (Kontrolle, 1 Woche Cuprizone-, 3 Wochen Cuprizone- und 5 Wochen Cuprizone-Behandlung). Der 5. Balken zeigt das Cup/EAE-Modell. Der letzte Balken zeigt das LPC-Modell.

2.3 Gewebsasservierung

2.3.1 Transkardiale Perfusion und Paraffineinbettung

Nach Ende der Behandlung wurden die Mäuse von unserer Arbeitsgruppe mit PBS und Perfusionslösung (siehe (s.) Kapitel (Kap.) 2.1) transkardial perfundiert. Die Schädelkalotten der perfundierten Mäuse wurden geöffnet. Nach einer Postfixation über Nacht bei 4 °C in der Perfusionslösung wurden die Gehirne am nächsten Tag präpariert, für mindestens 5 Stunden (Std) unter fließendem Leitungswasser gespült und über Nacht bei 4 °C in 50 % Ethanollösung

inkubiert. Am dritten Tag wurden die Gehirne gemäß der Tab. 1 dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mittels eines Schlittenmikrotoms in 5 µm dicke Schnitte geschnitten; je zwei Schnitte wurden auf einen Superfrost-plus-Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden anschließend für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur (RT) und über Nacht in den Trockenschrank bei 48° C gestellt.

2.3.2 Kryostateinbettung

Bei einem Teil der Experimente wurden GFAP-EGFP-positive Mäuse verwendet. Das saure Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein, GFAP) ist ein Intermediärfilament, was unter anderem von Astrozyten exprimiert wird [130]. In den GFAP-EGFP-positiven Mäusen wird die Expression vom grün fluoreszierenden Protein (engl. enhanced green fluorescent protein, EGFP) vom Promotor des GFAP-Gens reguliert. Infolgedessen leuchten die GFAP-positiven Astrozyten grün [131]. Um die fluoreszenzmarkierten Astrozyten bei diesen Mäusen besser darzustellen, wurden die Gehirne dieser Mäuse nach der Perfusion eingefroren. Beim eingefrorenen Gewebe bleibt das EGFP-Signal besser erhalten und die Autofluoreszenz des Gewebes ist niedriger. Dafür wurde das Gewebe nach der Perfusion in PBS und anschließend in Sucrose-PBS-Lösungen gemäß Tab. 2 behandelt. Am sechsten Tag wurde jedes Gehirn in ein mit TissueTek gefülltes Einbettförmchen gestellt und in Isopentan eingesenkt. Damit wurde es für mindestens 10 Minuten eingefroren. Die Blöcke wurden anschließend bis zum Schneiden im -20° C Gefrierschrank gelagert. Um die Kryopräparate am Kryo-Mikrotom zu schneiden, wurde auf den vorgekühlten Kryohalter TissueTek getropft und anschließend das Präparat auf den Halter platziert. Je zwei 10 µm dicke Schnitte wurden auf den raumtemperierten Objektträger aufgetragen. Der Temperaturunterschied zwischen Schnitte und Objektträger ermöglichte das Haften der Schnitte am Objektträger.

Lösung	Tag	Dauer
Fließendes Leitungswasser	2	Mind. 5 Std
50 % Ethanol	2–3	Über Nacht
70 % Ethanol	3	40 Min
70 % Ethanol	3	40 Min
96 % Ethanol	3	40 Min
96 % Ethanol	3	40 Min
96 % Ethanol	3	40 Min
100 % Ethanol	3	40 Min
100 % Ethanol	3	60 Min
100 % Ethanol	3	60 Min
Xylol-1	3	40 Min
Xylol-2	3	40 Min
Xylol-3	3	40 Min
Paraffin-1	3	60 Min
Paraffin-2	3	60 Min
Paraffin-3	3–6	Mind. 2 Tage

Tabelle 1: Paraffineinbettungsschritte (%-Angaben entsprechen Volumenprozent)

Lösung	Tag	Dauer
PBS (RT)	2	Mindestens 1 Std.
PBS (RT)	2–3	über Nacht
PBS (RT)	3	1 Std
10 % Sucrose (4 °C)	3	9 Std (tags)
10 % Sucrose (4 °C)	3–4	15 Std (nachts)
20 % Sucrose (4 °C)	4	9 Std (tags)
20 % Sucrose (4 °C)	4–5	15 Std (nachts)
30 % Sucrose (4 °C)	5	9 Std (tags)
30 % Sucrose (4 °C)	5–6	15 Std (nachts)

Tabelle 2: Kryostateinbettungsschritte (%-Angaben entsprechen Gewichtsprozent)

2.4 Histologische Techniken

2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die Struktur und den Aufbau des Gewebes darzustellen, wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H&E-Färbungen) durchgeführt. Dafür wurden eine Hämatoxylin- sowie eine Eosin-Lösung hergestellt (s. Kap. 2.1). Für die Hämatoxylin-Lösung wurde 1 g Hämatoxylin in 1 L destilliertem Wasser gelöst. Dazu wurden noch 200 mg Natriumjodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat/dodecahydrat, 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure-Monohydrat hinzugefügt. Für die Eosin-Lösung wurde 1 g Eosin in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und 1:10 verdünnt. Danach wurde 1 Tropfen Eisessig pro 100 ml Eosin-Lösung hinzugefügt. Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und durch die

absteigende Alkoholreihe rehydriert (Tab. 3). Danach wurden sie für 7 Minuten in der Mayer's Hämatoxylinlösung inkubiert. Nach einem Spülschritt in destilliertem Wasser wurden sie zum Bläuen für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gestellt. Im Anschluss dazu wurden die Schnitte nach einem Spülschritt in destilliertem Wasser für 4 Minuten in die Eosin-Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (Tab. 4). Bevor die Schnitte in das Xylol/Ethanol-Gemisch gestellt wurden, wurde die Intensität der Eosin-Färbung beurteilt. War die Intensität der Eosin-Färbung zu schwach, wurden die Schnitte wieder in der Eosin-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in das Xylol/Ethanol-Gemisch überführt und zum Schluss mit DPX eingedeckelt. Bei der H&E-Färbung werden alle Zellstrukturen, die basophil sind, zum Beispiel die DNA, der Zellkern oder die Ribosomen, durch das Hämatoxylin blau gefärbt. Die azidophilen Strukturen, wie das Zytoplasma, die Mitochondrien und das Kollagen, werden durch den Eosin-Farbstoff rot gefärbt.

Lösung	Dauer
Xylol 1	10 Min
Xylol 2	10 Min
Xylol 3	5 Min
Xylol/Ethanol 50%/50%	5 Min
Ethanol 100%	3 Min
Ethanol 100%	3 Min
Ethanol 100%	3 Min
Ethanol 96%	3 Min
Ethanol 96%	3 Min
Ethanol 70%	3 Min
Ethanol 50%	3 Min
Destilliertes Wasser	3 Min

Tabelle 3: Entparaffinierung durch Xylol und Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (%-Angaben entsprechen Volumenprozent)

Lösung	Dauer
Ethanol 70%	30 Sek
Ethanol 70%	30 Sek
Ethanol 96%	≤ 1 Min
Ethanol 96%	≤ 1 Min
Ethanol 100%	≤ 1 Min
Ethanol 100%	≤ 1 Min
Xylol/Ethanol 50%/50%	5 Min
Xylol 1	5 Min
Xylol 2	10 Min
Xylol 3	10 Min

Tabelle 4: Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung zum Eindeckeln mit Xylol (%-Angaben entsprechen Volumenprozent)

Arbeitsschritte	Zeit/ Temperatur
Entparaffinierung	
Mayers-Hämatoxylinlösung	7 Min
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
Fließendes Leitungswasser	10 Min
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
Eosin-Lösung	4 Min
Dehydrierung und Eindeckeln	

Tabelle 5: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

2.4.2 Luxol-Fast-Blue- und Perjod-Säure-Schiff-Färbung

Um die Myelinscheide im Gewebe darzustellen, wurde die Luxol-fast-Blue (LFB)- und Perjod-Säure-Schiff [132]- Färbung verwendet. Dafür wurden die Schnitte am 1. Tag durch die Xylol-Lösungen entparaffiniert und gemäß Tab. 3 bis zum zweiten 96 % igen Ethanol geführt. Danach wurden sie in die LFB-Lösung gestellt und über Nacht bei 56 ° C im Wärmeschrank inkubiert. Für die LFB-Lösung wurde 0,1 g Luxol-Fast-Blue in 100 ml 96 %iges Ethanol gelöst und 0,5 mg 100 % Essigsäure hinzugefügt (s. Kap. 2.1). Am zweiten Tag wurden die Schnitte im 96 % igen Ethanol und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Danach wurde jeder Schnitt einzeln differenziert. Dafür wurden sie für 15–20 Sekunden in eine 0,05 % Lithium-Carbonat-Lösung (0,05 g Lithium-Carbonat in 100ml destilliertem Wasser, s. Kap. 2.1) inkubiert. Nach 2-minütiger Inkubation in 70 % Ethanol und Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte mikroskopiert, um zu kontrollieren, ob die Hintergrundfärbung ausgewaschen war. Ziel war eine farblose graue Substanz und blau gefärbte Markscheiden zu erkennen. War die Hintergrundfärbung nicht ausreichend ausgewaschen, wurden sie nach einem Spülschritt in destilliertem Wasser wieder in die 0,05 % Lithium-Carbonat-Lösung und danach in 70 % Ethanol überführt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült und danach in die 0,5 % Perjodsäure-Lösung (s. Kap. 2.1) für 5 Minuten gestellt. Die Schnitte wurden nach einem Spülschnitt in destilliertem Wasser in das Schiff'sches Reagenz für 7 Minuten gestellt und für weitere 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden sie in destilliertem Wasser gespült und in die Mayer's Hämalaun-Lösung für 20 Sekunden gestellt. Dadurch wurden die Zellkerne blau angefärbt. Zum Bläuen wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem Wasser gespült. In der aufsteigenden Alkoholreihe wurden sie dehydriert (Tab. 4). Abschließend wurden sie dreimal für 10 Minuten in Xylol-Lösungen gestellt und danach eingedeckelt. Mittels der LFB-Färbung wird die Myelinscheide blau dargestellt. Die PAS-Färbung stellt die kohlenhydratreichen Komponenten des Gewebes, wie Glykoproteine, Muzine und Glykogen rot dar.

Arbeitsschritte	Zeit/ Temperatur
Entparaffinierung bis zum zweiten 96 % Ethanol	
LFB-Lösung	über Nacht bei 56°C
96 % Ethanol	kurz Spülen
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
0,05 % Lithium Carbonat-Lösung	15-20 Sek
70 % Ethanol	2 Min
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
Mikroskopische Kontrolle	
0,5 % Perjodsäure-Lösung	5 Min
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
Schiff'sches Reagenz	7 Min
Fließendes Leitungswasser	5 Min
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
Kernfärbung mit Hämalaun-Lösung	20 Sek
Fließendes Leitungswasser	5 Min
Dehydrierung und Eindeckeln	

Tabelle 6: Färbeprotokoll der Luxol-Fast-Blue- und Perjod-Säure-Schiff-Färbung

2.4.3 Immunhistochemische Färbungen

Die Expression der Proteine in einem Gewebeschnitt kann mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht werden. Mit Antikörpern, die gegen Antigene der untersuchten Proteine gerichtet sind, können diese Antigene im Gewebe dargestellt werden. Je nach Art des Sekundärantikörpers werden die Antigene in Hellfeld- oder Fluoreszenzmikroskopie sichtbar.

2.4.3.1 Chromogene Färbung

Das Prinzip der chromogenen Färbung basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Primärantikörper stammt aus einem Wirt, zum Beispiel einem Hasen, und bindet an das untersuchte Antigen. Am Primärantikörper haftet der biotinylierte Sekundärantikörper an. Dieser ist spezifisch für den Wirt, aus dem der Primärantikörper stammt, zum Beispiel anti-Hase. Als Nächstes kann der Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex) an den biotinylierten Sekundärantikörper binden. Die im ABC-Komplex enthaltene Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish Peroxidase, HRP) oxidiert das im Anschluss hinzugefügte 3,3-Diaminobenzidin (DAB). Diese Oxidierung führt zu einer braunen Verfärbung der Bereiche, an denen der ABC-Komplex gebunden ist.

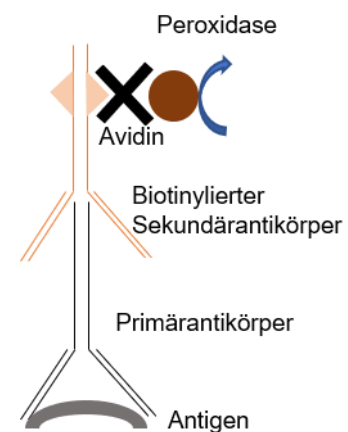


Abbildung 4: Schematische Darstellung der chromogenen, immunhistochemischen Färbung

Die Schnitte wurden für diese Färbung durch die absteigende Alkoholreihe entparaffiniert (Tab. 3) und in destilliertem Wasser gespült. Während der Perfusion, Fixierung und Paraffineinbettung des Gewebes kann es zu einer Quervernetzung der Proteine (Maskierung)

kommen. Das führt dazu, dass die Antigene bei der immunhistochemischen Färbung für den Primärantikörper nicht frei zugänglich sind. Deshalb benutzt man Methoden, um die Antigene zu demaskieren. In diesem Projekt wurde die Hitze-induzierte Demaskierungsmethode benutzt, bei der die Schnitte in einer sauren (Citratpuffer) oder einer basischen (Tris/EDTA-Puffer) Lösung für 10 Minuten in der Mikrowelle gekocht wurden (engl. Heat Induced Epitope Retrieval, HIER). Sobald die Schnitte wieder auf Raumtemperatur waren, wurden sie dreimal in PBS für je 5 Minuten gespült und anschließend mit 5 % in PBS gelöstem normalem Ziegenerum für 1 Stunde bei 26°C inkubiert (100 µl Lösung pro Schnitt bei jedem Schritt). Dieser Schritt diente der Blockierung unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers. Anschließend wurde die Blockierungslösung abgeschüttet und der in Serum verdünnte Primärantikörper auf die Schnitte pipettiert. Der Schnitt, der als Negativkontrolle diente, wurde anstatt mit Primärantikörper mit der Blockierungslösung inkubiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal in PBS für je 5 Minuten gespült und anschließend für 30 Minuten in 0,3 % -Wasserstoffperoxid (30 % H₂O₂ in 100 ml PBS, s. Kap. 2.1) im Dunkeln inkubiert. Die Negativkontrolle wurde separat gespült und inkubiert. Durch die Inkubation im Wasserstoffperoxid wurde die endogene Peroxidase des Gewebes blockiert. Nach einem dreimaligen Spülschritt in PBS für je 5 Minuten wurden die Schnitte mit dem in Serum verdünnten Sekundärantikörper bei 26°C für 1 Stunde inkubiert. Parallel wurde der 1:50 in PBS verdünnte ABC-Komplex vorbereitet und für mindestens 30 Minuten im Dunkeln gelagert. Nach der 1-stündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Schnitte dreimal in PBS für je 5 Minuten gespült und anschließend mit dem ABC-Komplex für 1 Stunde bei 26°C inkubiert. Nach einem dreimaligem PBS-Spülschritt für je 5 Minuten wurde die Färbung nach 10 minutiger Inkubation mit dem 1:50 in DAB-Substrat verdünnten DAB-Komplex visualisiert (s. Kap. 2.1). Die Schnitte wurden anschließend für 5 Minuten in Leitungswasser und weitere 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte in die Hämalaun-Lösung für 30 Sekunden gestellt. Dadurch wurden die Zellkerne blau gegengefärbt. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden sie unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gebläut. Abschließend wurden sie in destilliertem Wasser gespült und in der aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (Tab. 4). Nach der dritten Xylollösung wurden sie mit DPX eingedeckelt.

Jeder neue Antikörper musste zunächst etabliert werden, um die passende Konzentration und Demaskierungsmethode zu bestimmen. Dafür wurden im ersten Durchlauf drei Objektträger verwendet. Die Färbung wurde mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration durchgeführt. Jeder Objektträger wurde unterschiedlich behandelt. Beim ersten Objektträger wurde keine HIER-Methode verwendet, der zweite wurde in Citratpuffer und der dritte in

Tris/EDTA-Puffer gekocht. Die Schnitte der drei Objektträger wurden verglichen, um die beste HIER-Methode herauszufinden. Im nächsten Schritt wurden unterschiedlichen Konzentrationen des Primärantikörpers verglichen.

Versuch	Primär-AK	Firma	Bestellnummer	RRID	Wirt	Verdünnung	HIER
Cup	Anti-C-MYC	Abcam, UK	ab32072	AB_731658	Hase	1:200	Tris/EDTA
	Anti-STAT3	Abcam, UK	ab119352	AB_10901752	Maus	1:1600	Citrat
	Anti-VCAM1 (1)	Abcam, UK	ab134047	AB_2721053	Hase	1:150	Kein
	Anti-VCAM1 (2)	BIOSS, USA	bs-0920R	AB_10859012	Hase	1:300	Kein
	Anti-TNFRSF1A	Abcam, UK	ab111119	AB_10863360	Hase	1:500	Tris/EDTA
LPC; Cup/EAE	Anti-C-MYC	Abcam, UK	ab32072	AB_731658	Hase	1:200	Tris/EDTA
	Anti-STAT3	Abcam, UK	ab119352	AB_10901752	Maus	1:2000	Citrat
	IgG (Isotypkontrolle)	Abcam, UK	ab172730	AB_2687931	Hase	1:200	Tris/EDTA

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper (Primär-AK) mit Verdünnung und Demaskierungsmethode bei chromogenen Färbungen

Sekundär-AK	Firma	Bestellnummer	RRID	Wirt	Verdünnung
Anti-Hase IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, USA	BA 1000	AB_2313606	Ziege	1:200
Anti-Maus IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, USA	BA 9200	AB_2336171	Ziege	1:200
EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	DAKO, Deutschland	K4003	AB_2630375	Ziege	

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper (Sekundär-AK) mit Verdünnung bei chromogenen Färbungen

Um die Sensitivität der Färbung zu erhöhen und die Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurde bei der immunhistochemischen Färbungen gegen VCAM1 im Cup-Versuch das EnVision-System verwendet. Dieses ist ein HRP-markiertes Polymer, das mit einem Sekundärantikörper konjugiert ist. Es bindet direkt an den Primärantikörper und ersetzt die Schritte des Sekundärantikörpers und des ABC-Komplexes.

Das hier aufgeführte Protokoll ist das allgemeingültige Protokoll, das für jede immunhistochemische Färbung im Hellfeld in diesem Projekt benutzt wurde. Da aber nicht alle Primärantikörper unter denselben Bedingungen am besten sichtbar werden, wurde das Protokoll bei der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3 in den Cup/EAE- und LPC-Versuchen leicht modifiziert. Dabei wurden die Schnitte anstatt über Nacht nur 1 Stunde mit

dem Primärantikörper inkubiert. Die weiteren Schritte wurden wie im beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Arbeitsschritte	Zeit/ Temperatur
Entparaffinierung	
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
Demaskierung (Tris/EDTA; Citrat; Keine)	10 Min
Abkühlen in Bad mit fließendem Leitungswasser	15 Min
PBS	3 x 5 Min Spülen
5% Ziegenserum/PBS (Blockierungslösung)	1 Std bei 26°C
Blockierungslösung abschütten	
Primärantikörper	über Nacht bei 4°C
PBS	3 x 5 Min Spülen
0,3% Wasserstoffperoxid	30 Min im Dunkeln
PBS	3 x 5 Min Spülen
Sekundärantikörper	1 Std bei 26°C
PBS	3 x 5 Min Spülen
ABC-Komplex	1 Std bei 26°C
PBS	3 x 5 Min Spülen
DAB-Visualisierung	10 Min
Leitungswasser	5 Min
Destilliertes Wasser	5 Min
Kernfärbung mit Hämalaun-Lösung	30 Sek
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
Fließendes Leitungswasser	5 Min
Destilliertes Wasser	kurz Spülen
Dehydrierung und Eindeckelung	

Tabelle 9: Färbeprotokoll der chromogenen immunhistochemischen Färbung

2.4.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Bei der Immunfluoreszenz-Färbung ist der Sekundärantikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert, der diesen unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht. Mittels der Immunfluoreszenz können in einer Färbung die Antigene mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert werden, sodass sie in unterschiedlichen Farben leuchten. Damit kann die Expression mehrerer Proteine auf einem Gewebeschnitt gleichzeitig untersucht und eventuelle Kollokalisierungen festgestellt werden. Dieses Prinzip wurde auch für dieses Projekt verwendet. Um zu untersuchen, in welchen Zellen STAT3 und

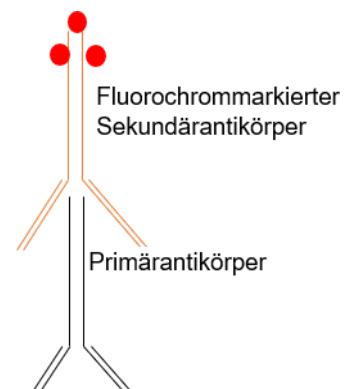


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung.

C-MYC exprimiert werden, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt. Es gibt zwei Methoden, um eine Doppelfärbung durchzuführen, simultan sowie sequenziell. Bei der simultanen Methode werden die Schnitte am ersten Tag gleichzeitig mit beiden Primärantikörpern inkubiert. Am zweiten Tag werden die entsprechenden Sekundärantikörper im selben Schritt auf die Schnitte pipettiert. Der Vorteil dieser Methode ist die Zeiteffizienz.

Bei der sequenziellen Methode werden am ersten Tag die Schnitte mit dem ersten Primärantikörper inkubiert. Am zweiten Tag wird der passende Sekundärantikörper pipettiert. Nachdem die Schnitte in PBS gespült werden, werden sie über Nacht mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert. Am dritten Tag wird der entsprechende Sekundärantikörper pipettiert. Bei dieser Methode ist die Bindung der Sekundärantikörper spezifischer, da jeweils ein Primärantikörper vorhanden ist, an den der Sekundärantikörper binden kann. In diesem Projekt wurde für alle Immunfluoreszenz-Färbungen die sequenzielle Methode verwendet. Außerdem wurden die Spülschritte in 0,025 % Triton/PBS (0,25 ml Triton in 999,75 ml PBS, s. Kap. 2.1) durchgeführt. Triton ist ein Detergens, welches die Antigene für die Antikörper besser zugänglich macht und unspezifische Bindungsstellen blockieren kann. Um die Zellkerne bei den Immunfluoreszenz-Färbungen darzustellen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff bisBenzimide H33258 verwendet. Dieser markiert die DNA und fluoresziert unter ultraviolettem Licht mit blauer Farbe. Es wurde eine Lösung aus 10 mg bisBenzimide H33258 in 1 ml destilliertem Wasser verwendet (bisBenzimide Stock A).

Das Protokoll der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung war am ersten Tag identisch mit dem der chromogenen Färbung. Am zweiten Tag wurden die Schnitte nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten in 0,025 % Triton/PBS mit dem ersten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei 26 °C inkubiert. Stammten die zwei Sekundärantikörper aus unterschiedlichen Wirten, wurden die Schnitte anschließend mit dem Serum geblockt, aus dem der zweite Sekundärantikörper stammte. Stammten die Sekundärantikörper aus demselben Tier, wurde kein Blockierungsschritt durchgeführt. Die Schnitte wurden mit dem zweiten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am dritten Tag wurden die Schnitte dreimal in 0,025 % Triton/PBS für je 5 Minuten gespült und anschließend bei 26°C für 1 Stunde mit dem zweiten Sekundärantikörper inkubiert. Nachdem die Schnitte dreimal in PBS je 5 Minuten gespült wurden, wurden sie für 5 Minuten mit 1:10.000 verdünnten bisBenzimide Stock A inkubiert. Abschließend wurden sie zweimal für 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült und mit Immumount eingedeckelt.

Um das Fluoreszenzsignal zu verstärken, wurden die Schnitte bei der Immunfluoreszenzfärbungen gegen STAT3 nach der Inkubation des Primärantikörpers mit einem passenden biotinylierten Sekundärantikörper, Anti-Maus-IgG, inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in 0,025 % Triton/PBS für je 5 Minuten gespült und für 1 Stunde mit 1:100 verdünntem fluoreszierendem Streptavidin inkubiert. Das verwendete Streptavidin AlexaFluor 488 ist mit einem Fluorochrom markiert und bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers. Die folgenden Schritte wurden wie im erwähnten Immunfluoreszenz-Protokoll durchgeführt. Die Blockierungslösungen der Immunfluoreszenz-Färbungen wurden gemäß Kap. 2.1 vorbereitet. Stammten die Sekundärantikörper aus der Ziege, wurde als

Blockierungslösung 2 % Normales Ziegen Serum verwendet, das zusätzlich 0,05 % Tween, 1 % BSA (Bovines Serum Albumin) und 0,1 % CWFS (engl. Cold Water Fish Skin Gelatin) enthielt (s. Kap. 2.1). Bei Verwendung von Sekundärantikörpern, die aus dem Esel stammten, wurde 5 % Normales Esel Serum benutzt, das zusätzlich 0,1 % Triton, 1 % BSA und 0,2 % CWFS enthielt (s. Kap. 2.1). Die enthaltenen Materialien dienen dazu, die untersuchte Antigene besser zugänglich zu machen.

Versuch	Primär-AK	Firma	Bestellnummer	RRID	Wirt	Verdünnung	HIER
Cup	Anti-C-MYC	Abcam, UK	ab32072	AB_731658	Hase	1:100	Tris/EDTA
Cup, Cup/EAE	Anti-STAT3	Abcam, UK	ab119352	AB_10901752	Maus	1:800	Citrat
	Anti-GFAP	Abcam, UK	ab4674	AB_304558	Huhn	1:2000	Tris/EDTA od. Citrat
	Anti-IBA1	Abcam, UK	ab107159	AB_10972670	Ziege	1:500	Tris/EDTA
	Anti-OLIG2	Millipore, Deutschland	MABN50	AB_10807410	Maus	1:200	Tris/EDTA
Cup/EAE	Anti-CD3	Abcam, UK	ab16669	AB_443425	Hase	1:300	Citrat
Zellkultur	Anti-IBA1	Wako, USA	019-19741	AB_839504	Hase	1:500	Kein

Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper (Primär-AK) mit Verdünnung und Demaskierungsmethode bei Immunfluoreszenz-Färbungen

Sekundär-AK	Firma	Bestellnummer	RRID	Wirt	Verdünnung
Anti-Maus- IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, USA	BA9200	AB_2336171	Ziege	1:200
Anti-Huhn AlexaFluor 594	Invitrogen, USA	A11042	AB_2534099	Ziege	1:200
Anti-Huhn, AlexaFluor 488	Invitrogen, USA	A11039	AB_2534096	Ziege	1:200
Anti-Ziege, AlexaFluor 488	Invitrogen, USA	A11055	AB_2534102	Esel	1:200
Anti-Hase, AlexaFluor 594	Invitrogen, USA	A21207	AB_141637	Esel	1:200
Anti-Hase, AlexaFluor 488	Invitrogen, USA	A11008	AB_143165	Ziege	1:200
Anti-Maus, AlexaFluor 488	Invitrogen, USA	A21202	AB_141607	Esel	1:200
Streptavidin AlexaFluor 488	Invitrogen, USA	S11223			1:100

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper (Sekundär-AK) mit Verdünnung bei Immunfluoreszenz-Färbungen.

Die Spezifität der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde mittels einer Kreuzkontrolle überprüft. Dafür wurde ein Schnitt mit dem Primärantikörper A inkubiert, der zum Beispiel aus dem Hasen stammte. Danach wurde an Stelle des wirtspezifischen anti-Hase-

Sekundärantikörpers A, der unpassende zum Beispiel anti-Maus-Sekundärantikörper B pipettiert. Ein anderer Schnitt wurde mit dem Primärantikörper B und dem unpassenden Sekundärantikörper A inkubiert. Ging der Antikörper keine unspezifischen Bindungen ein, war bei den Kreuzkontrollen kein fluoreszierendes Signal sichtbar. Dadurch konnte die Spezifität der Färbung bestätigt werden.

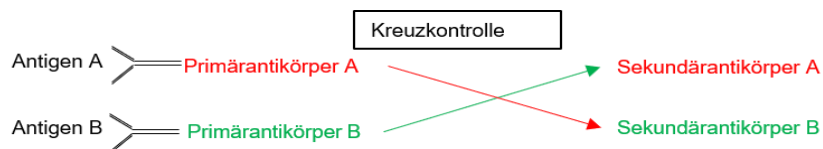


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kreuzkontrollen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.

Um die Expression von STAT3 auf GFAP-EGFP-positiven Kryoschnitten zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. In diesem Gewebe sind die GFAP-positiven-Astrozyten grün fluoreszierend. Deshalb wurde bei diesen Schnitten eine Immunfluoreszenz-Einfachfärbung angewendet. Der Hitzeinduzierte-Demaskierungsschritt wurde nicht durchgeführt, um das EGFP-Fluoreszenzsignal nicht zu schwächen. Der erste Tag der Einfachfärbung lief identisch mit dem der Doppelfärbung ab. Am zweiten Tag wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal in PBS gespült und für 1 Stunde mit dem fluorochrommarkierten Streptavidin bei 26°C inkubiert. Abschließend wurden sie zweimal in destilliertem Wasser gespült und mit Immu-Mount eingedeckelt.

Arbeitsschritte	Zeit/ Temperatur
Entparaffinierung	
Destilliertes Wasser	Kurz Spülen
Demaskierung (Tris/EDTA; Citrat; Keine)	10 Min
Abkühlen in Bad mit fließendem Leitungswasser	15 Min
0,025 % Triton/PBS	3 x 5 Min Spülen
Blockierung	1 Std bei 26°C
Blockierungslösung abschütten	
1. Primärantikörper	über Nacht bei 4°C
0,025 % Triton/PBS	3 x 5 Min Spülen
1. Sekundärantikörper	bei 26°C 1 Std
Blockierung	1 Std bei 26°C
2. Primärantikörper	über Nacht bei 4°C
0,025 % Triton/PBS	3 x 5 Min Spülen
2. Sekundärantikörper	bei 26°C 1 Std
PBS	3 x 5 Min Spülen
Kernfärbung mit bisBenzimide	5 Min
Destilliertes Wasser	5 Min
Immu-Mount-Eindeckelung	

Tabelle 12: Färbeprotokoll der Immunfluoreszenz-Färbung

2.5 Nukleinsäureanalyse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Proteinexpression von C-MYC, STAT3, VCAM1 und TNFRSF1A untersucht. Um die Ergebnisse auf mRNA-Ebene zu überprüfen, wurden Nukleinsäureanalyse-Methoden angewendet. Dafür musste die mRNA zunächst aus dem Gewebe isoliert werden. Anschließend wurde diese über eine Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, um dann anhand einer Reverse Transkription - Echtzeit-PCR (engl. Reverse Transcription Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction, RT-rtPCR) die Menge an mRNA im entsprechenden Gewebe indirekt zu bestimmen.

2.5.1 RNA-Isolation aus dem Kortex und *Corpus Callosum*

In diesem Versuch wurde die mRNA-Expression in Cuprizone-behandelten Mäusen mit der mRNA-Expression in unbehandelten Mäusen verglichen. Es wurden vier Gruppen von je fünf Mäusen verglichen. Die erste Gruppe, die Kontrollgruppe (n = 5), war unbehandelt. Die weiteren Gruppen wurden für eine (1WCup, n = 5), drei (3WCup, n = 5) oder fünf (5WCup, n = 5) Wochen mit Cuprizone behandelt. Zunächst wurde von unserer Forschungsgruppe der Kortex und das *Corpus Callosum* dieser Mäuse isoliert. Dafür wurde die Schale eines Vibratoms HM650V mit sterilen Dulbecco's Phosphatgepufferten Salzlösung (engl. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS) gefüllt. Jeder Maus wurde 1 ml einer Narkoselösung injiziert. Nachdem die Maus keine Reflexe mehr gezeigt hat, wurde sie mit 20 ml DPBS transkardial perfundiert. Das Gehirn wurde präpariert und an die Vibratom-Platte geklebt. Die Platte mit dem Gehirn wurde in die mit DPBS gefüllte Schale gelegt. Das Gewebe wurde in 400 µm Schnitten zerlegt. Anschließend wurden der Kortex und das *Corpus Callosum* präpariert. Das Gewebe wurde mit Peq-Gold homogenisiert und weiter behandelt. Nach einer zwanzigminütigen Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C sind drei Schichten entstanden: die oberste, die flüssig war und die RNA des Gewebes enthielt; die mittlere, die die DNA enthielt; und die unterste, die hauptsächlich Proteine enthielt. Die weiteren Versuche wurden mit der obersten Schicht durchgeführt.

2.5.2 Quantifizierung der Gesamt-RNA

Ziel dieses Versuchs war es, die Menge an mRNA der Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* im untersuchten Gewebe zu quantifizieren. Dafür wurde zunächst die mRNA mittels einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Damit die Konzentration an mRNA in den verschiedenen Geweben verglichen werden konnte, musste bei der Reversen Transkription bei allen untersuchten Proben dieselbe Menge an mRNA vorhanden sein. Im nächsten Schritt wurde deshalb die Konzentration an mRNA in den verschiedenen Gewebeproben mittels des NanoDrop Systems (Thermo Scientific) gemessen. Anhand dieser Konzentration wurde berechnet, wie viel Volumen von der isolierten mRNA benötigt wird, um

eine Endmenge von 1 µg mRNA zu erreichen. Abschließend wurde das benötigte Volumen an destilliertem Wasser hinzugefügt, sodass das Endvolumen der mRNA in jedem Eppendorf-Röhrchen 11 µl war.

2.5.3 Reverse Transkription

Die mit 11 µl RNA-Gemisch gefüllten Röhrchen wurden für die Reverse Transkription für 5 Minuten bei 80 °C im Thermomixer inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein mit 11 µl UltraPure Wasser gefülltes Röhrchen, das auch für 5 Minuten bei 80°C inkubiert wurde. Die Proben wurden für 5 Minuten zum Abkühlen auf Eis gelagert. Die „Mastermix“-Lösung, die die Reagenzien für die Reverse Transkription enthielt, wurde gemäß Tabelle 13 vorbereitet. In jede RNA-Probe wurden 8.1 µl „Mastermix“ hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für 50 Minuten bei 37 °C in den Thermomixer inkubiert, wo die Reverse Transkription der RNA stattfand. Um die M-MLV Reverse Transkriptase (engl. Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) zu inaktivieren und somit die Reaktion zu beenden, wurden die Proben für 15 Minuten bei 80 °C im Thermomixer inkubiert.

Reagenz	Volumen/Probe
5x First Strand Buffer (Kit)	4 µl
Dithiothreitol 0,1 M (DTT)	2 µl
dNTP Mix 10mM (Nukleotide)	1 µl
Random Primer	0.1 µl
M-MLV reverse Transkriptase	1 µl

Tabelle 13: Reagenzien für den „Mastermix“ der Reversen Transkription

2.5.4 Kontroll-PCR

Nach der Reversen Transkription wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob in jeder Probe die RNA in cDNA umgeschrieben wurde. Für die Kontroll-PCR wurde der Primer für das Gen *Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (Hprt)* verwendet. Dieses Gen ist ein Haushaltsgen (engl. Housekeeping gene). Haushaltsgene sind

Reagenzien	Volumen [µl]/ Probe
UltraPure-H ₂ O	9.3
10X PCR Buffer	1.25
MgCl ₂	0.38
dNTPs 10 mM	0.25
HPRT-Forward Primer	0.25
HPRT-Reverse Primer	0.25
Taq Polymerase Biotaq	0.08

Tabelle 14: Reagenzien für den „Mastermix“ der Kontroll-PCR

Gene, die im Idealfall, eine konstant-robuste Expression unabhängig von der Behandlung des Gewebes aufweisen. Sie sollen ubiquitär und in gleichen Mengen exprimiert werden.

Die „Mastermix“-Lösung wurde gemäß Tabelle 14 vorbereitet. In jedes PCR-Röhrchen wurden 11.5 µl „Mastermix“ pipettiert. Dazu wurde jeweils 1 µl der cDNA-Proben hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet. Als Positivkontrolle diente cDNA, die in vorherigen Experimenten erfolgreich amplifiziert wurde. Nach Zentrifugation der Proben wurde das PCR-Programm gestartet. Die PCR startete mit einer Temperatur von 95 °C für 3 Minuten. Diese Temperatur wird in der Hot-start-PCR benötigt, um die Taq-Polymerase zu

aktivieren. Anschließend fand bei 95 °C die Denaturierung statt, während der die Doppelhelix aufgespalten wurde. Dadurch entstanden zwei Einzelstränge. Während der Primerhybridisierung hafteten die Primers an den komplementären cDNA-Basen an. Die Temperatur, die dafür benötigt wurde, war vom verwendeten Primer abhängig. Wurde ein Primer zum ersten Mal benutzt, wurde diese Hybridisierungstemperatur (T_A) zunächst bestimmt (s. Kap. 2.5.5). Im nächsten Schritt wurde bei 72 °C der neue komplementäre cDNA-Strang durch die Taq-Polymerase elongiert. Ein PCR-Zyklus bestand aus den Schritten der Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Die PCR durchlief 30 Zyklen. Nach dem 30. Mal wurden die Proben für 2 Minuten bei 72 °C inkubiert, um sicherzustellen, dass die gesamte cDNA amplifiziert wurde. Die Proben wurden danach bei 4 °C inkubiert bis sie vom PCR-Gerät entfernt wurden (Tab. 15). Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um zu überprüfen, ob während der PCR das erwartete cDNA Produkt amplifiziert wurde.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1. Initialisierung	95	3 Minuten
2. Denaturierung	95	40 Sekunden
3. Primerhybridisierung	T_A	40 Sekunden
4. Elongation	72	45 Sekunden
5. Letzte Elongation	72	2 Minuten
6. Kurzzeitige Lagerung	4	Bis 1 Stunde

PCR-Zyklus x30

Tabelle 15: Schritte der Kontroll-PCR

2.5.5 Primer-Etablierung

Um die optimale Hybridisierungstemperatur für jeden Primer zu bestimmen, musste jeder Primer zunächst etabliert werden. Dafür wurde der Primer in der vom Hersteller angegebenen Menge in UltraPure Wasser gelöst. Dadurch entstand die 100 μ M Stammlösung. Diese Lösung wurde anschließend mit UltraPure

Reagenzien	Volumen [μ l] / Probe
SensiMix	5
UltraPure H ₂ O	2
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5

Tabelle 16: Reagenzien für den „Mastermix“ der Primer-Etablierung

Wasser 1:10 verdünnt (50 μ L Stammlösung + 450 μ L UltraPure Wasser). Die „Mastermix“-Lösung wurde gemäß Tabelle 16 vorbereitet und kurz zentrifugiert. In jedes Eppendorf-Tube wurden 8 μ L „Mastermix“ und 1 μ L cDNA pipettiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Tubes kurz zentrifugiert und in das PCR-Gerät gestellt. Jede Reihe erreichte eine unterschiedliche Hybridisierungstemperatur (Tab.17). Somit konnte in der anschließenden

		Reihe 3	Reihe 4	Reihe 5	Reihe 6	Reihe 7	Reihe 8	Reihe 9	Reihe 10		
50.0	50.5	51.7	53.6	55.7	57.9	60.1	62.3	64.4	66.3	67.5	68.0

Tabelle 17: Hybridisierungstemperaturen für die Primer-Etablierung (angegeben in °C)

Gelelektrophorese bestimmt werden, welche die passende Hybridisierungstemperatur für jeden Primer war.

2.5.6 Reverse Transkription - Echtzeit-PCR (RT-rtPCR)

Die mRNA-Expression der untersuchten Gene wurde mittels RT-rtPCRs quantifiziert. Die Ergebnisse der RT-rtPCRs wurden anhand eines internen Standards ausgewertet. Dafür wurde ein 100 %-Standard hergestellt. Dieser enthielt cDNA von jeder Gewebeprobe dieses Versuchs. Dieser 100 %-Standard wurde anschließend sieben Mal 1:1 verdünnt. Das Ergebnis dieser Verdünnungsreihe waren sieben Standards mit abnehmendem cDNA-Gehalt (Tab.18). Diese Standards durchliefen die RT-rtPCR zusammen mit den untersuchten Proben.

Standard (St.)	cDNA Gehalt [%]
1	100
2	50
3	25
4	12.5
5	6.25
6	3.125
7	1.5626

Tabelle 18: Interne Standardverdünnungsreihe

Ziel dieses Versuchs war es, die Genexpression von *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* im Kortex und im *Corpus Callosum* zu untersuchen. Für die Auswertung der RT-rtPCR - Ergebnisse wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen, auch als delta-delta Ct-Methode bezeichnet. Dabei wurden die Expressionsergebnisse der untersuchten Gene auf die Expressionsergebnisse der Haushaltsgene (*Hprt* und *Beta-Actin*) bezogen. Die Normierung wurde durchgeführt, um die Unterschiede bei der Ausgangsmenge der mRNA auszugleichen. Zudem wurde bei der Auswertung der RT-rtPCR - Ergebnisse die mRNA-Konzentration der behandelten Gruppen mit der mRNA-Konzentration im *Corpus Callosum* der Kontrollmäuse verglichen.

Für die RT-rtPCR wurden die Proben aufgetaut und die „Mastermix“-Lösung gemäß Tabelle 19 vorbereitet. In jedes Well der 96-Well-Platte wurden 8 µl „Mastermix“ pipettiert. In die Negativkontrolle wurden 2 µl UltraPure Wasser hinzugefügt. Von der Standard-Verdünnungsreihe und den cDNA-Proben wurden jeweils 2 µl in das entsprechende Well pipettiert. Jede Probe wurde doppelt auf die 96-Well-Platte pipettiert (Tab. 20). In der Auswertung wurde anschließend der Mittelwert der zwei Werte berechnet. Von jeder Maus wurde das Gewebe des Kortex und des *Corpus Callosum* untersucht. Es gab fünf Mäuse pro Gruppe. Nach einer kurzen Zentrifugation der 96-Well-Platte wurde das RT-rtPCR -Programm gemäß der Tab. 21 gestartet. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die RT-rtPCR wurde als aussagekräftig bewertet, wenn folgende Kriterien erfüllt wurden:

Reagenzien	Volumen [µl]/ Probe
SensiMix	5
UltraPure H ₂ O	2
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5

Tabelle 19: Reagenzien für den „Mastermix“ der RT-rtPCR

- In den Negativkontrollen war keine Amplifikation zu sehen

- In der Schmelzkurve trennten sich alle amplifizierte cDNA-Stränge bei der gleichen Temperatur
- In der Gelelektrophorese waren die Banden aller Produkte auf der erwarteten Höhe an Basenpaaren zu sehen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100%	100%	Ko 1 CX	Ko 1 CX	1 W 4 CX	1 W 4 CX	5 W 2 CX	5 W 2 CX	Ko 5 CC	Ko 5 CC	3 W 3 CC	3 W 3 CC
B	50%	50%	Ko 2 CX	Ko 2 CX	1 W 5 CX	1 W 5 CX	5 W 3 CX	5 W 3 CX	1 W 1 CC	1 W 1 CC	3 W 4 CC	3 W 4 CC
C	25%	25%	Ko 3 CX	Ko 3 CX	3 W 1 CX	3 W 1 CX	5 W 4 CX	5 W 4 CX	1 W 2 CC	1 W 2 CC	3 W 5 CC	3 W 5 CC
D	12,5%	12,5%	Ko 4 CX	Ko 4 CX	3 W 2 CX	3 W 2 CX	5 W 5 CX	5 W 5 CX	1 W 3 CC	1 W 3 CC	5 W 1 CC	5 W 1 CC
E	6,25%	6,25%	Ko 5 CX	Ko 5 CX	3 W 3 CX	3 W 3 CX	Ko 1 CC	Ko 1 CC	1 W 4 CC	1 W 4 CC	5 W 2 CC	5 W 2 CC
F	3,12%	3,12%	1 W 1 CX	1 W 1 CX	3 W 4 CX	3 W 4 CX	Ko 2 CC	Ko 2 CC	1 W 5 CC	1 W 5 CC	5 W 3 CC	5 W 3 CC
G	1,56%	1,56%	1 W 2 CX	1 W 2 CX	3 W 5 CX	3 W 5 CX	Ko 3 CC	Ko 3 CC	3 W 1 CC	3 W 1 CC	5 W 4 CC	5 W 4 CC
H	Neg. Ko	Neg. Ko	1 W 3 CX	1 W 3 CX	5 W 1 CX	5 W 1 CX	Ko 4 CC	Ko 4 CC	3 W 2 CC	3 W 2 CC	5 W 5 CC	5 W 5 CC

Tabelle 20: Schematische Darstellung der RT-rtPCR-96-Well-Platte. Reihen 1-2: Standard-Verdünnungsreihen und Negativkontrollen (Neg.Ko). Reihen 3-12: Gewebeproben

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	95	10 Minuten
2	95	15 Sekunden
3	T _A	30 Sekunden
4	72	30 Sekunden
5	95	1 Minute
6	55	30 Sekunden
7	95	1 Minute

Tabelle 21: Schritte der RT-rtPCR. T_A entspricht der Primerhybridisierungstemperatur des jeweiligen Primers. Die Schritte 2-4 wurden 35 Mal wiederholt.

Primer	Forward Sequenz	Reverse Sequenz	T _A [°C]	Anzahl von Basenpaaren
<i>Beta Actin</i>	GTACCACCATGTACCCAGGC	AACGCAGCTCAGTAACAGTCC	60	247
<i>Hprt</i>	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	CACAGGACTAGAACACCTGC	62	249
<i>18S</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	60	187
<i>C-Myc</i>	CGGACACACAACGTCTTGAA	AGGATGTAGGCGGTGGCTTTT	53,5	143
<i>Stat3</i>	CAATACCATTGACCTGCCGAT	GAGCGACTCAAACCTGCCCT	53,5	109
<i>Vcam1</i>	GCCCACTAAACGCGAAGGT	ACTGGGTAAATGTCTGGAGCC	62,3	241
<i>Tnfrsf1a</i>	CCGGGAGAAGAGGGATAGCTT	TCGGACAGTCACTACCAAGT	60,1	113

Tabelle 22: Verwendete Primers mit entsprechenden Basensequenzen, Primerhybridisierungstemperaturen (T_A) und Anzahl von Basenpaaren

2.5.7 Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob in jeder Probe nur ein cDNA-Produkt amplifiziert wurde, wurde nach jeder RT-rtPCR eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für das Gel wurden 4 g Agarose in

200 ml 1xTAE Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer, Tab.23) gelöst und 4 µl Midori Green hinzugefügt. Das Gel wurde anschließend in die Elektrophorese-Kammer gegossen. Sobald es fest war, wurden jeweils 5 µl des Easy Ladders in die erste und letzte Elektrophorese-Tasche pipettiert. Es wurden 2 µl des DNA loading Puffers in jede der untersuchten RT-rtPCR-Proben hinzugefügt. Die RT-rtPCR-Proben zusammen mit dem DNA loading Puffer wurden in die entsprechenden Elektrophorese-Taschen pipettiert (Tab. 24). Die Elektrophorese lief für 45 Minuten bei 120 V. Abschließend wurde ein Foto vom Gel gemacht, um die cDNA Proben zu visualisieren.

1x TAE-Puffer vorbereiten	
1.	EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 0,5 M vorbereiten (37,22 g EDTA Sodium Salt in destilliertem Wasser lösen und auf 200 ml auffüllen)
2.	242 g Tris Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) mit destilliertem Wasser auf 750 ml auffüllen
3.	100 ml EDTA 0,5 M hinzufügen
4.	57,1 ml Eisessig hinzufügen
5.	Die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1 L auffüllen
6.	Die Lösung 1:50 in destilliertem Wasser verdünnen

Tabelle 23: Herstellung des 1x TAE-Puffers

Die Gelelektrophorese wurde mit folgenden Proben durchgeführt, um von unterschiedlichen Gewebeproben das RT-rtPCR Ergebnis zu kontrollieren:

St.1 100%	St.7 1,5626%	Ko 1 Cx	1 W 5 Cx	3 W 1 Cx	5 W 5 Cx	Ko 1 CC	1 W 5 CC	3 W 1 CC	5 W 5 CC	Neg.Ko
--------------	-----------------	------------	-------------	-------------	-------------	------------	-------------	-------------	-------------	--------

Tabelle 24: Schematische Darstellung der Gelelektrophoresetaschen

2.6 Astrozytenkultur

Ziel dieses Versuchs war die Untersuchung der Expression von *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* in stimulierten Astrozyten. Die Stimulation der Astrozyten erfolgte durch die proinflammatorische Moleküle Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon γ (IFN γ) [42]. LPS ist ein Endotoxin, was eine bakterielle Infektion simuliert und dadurch die Astrozyten stimuliert [133, 134]. IFN γ ist ein Zytokin, das von stimulierten Lymphozyten sezerniert wird und eine Immunreaktion auslöst [135]. Zusätzlich wurde die Aktivität und Letalität der Zellen mittels eines CTB-Assays (engl. CellTiter-Blue Cell-Viability-Assay) untersucht.

2.6.1 Herstellung und Behandlung der primären Astrozytenkultur mit Interferon- γ und mit Lipopolysaccharid

Die Herstellung der primären Astrozytenkultur wurde von unserer Forschungsgruppe durchgeführt. Mir wurde die Astrozyten-RNA für die Nukleinsäureanalyse zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Astrozytenkultur wurden die Mäusegehirne entnommen und anschließend der Kortex isoliert sowie von den Meningen befreit. Das Gewebe wurde behandelt und auf 75 cm² Zellkulturflaschen mit Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium

(DMEM, mit Glukose, L-Glutamin, Phenol und Natrium Pyruvat), 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und 10 % Fetales Bovinserum (FBS) ausgesät. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach mindestens vier Tagen Inkubationszeit und sobald die Zellen in den T75 Flaschen Subkonfluenz erreicht hatten, wurden sie weiterbehandelt. Um die Genexpression der aktivierten Astrozyten zu untersuchen, wurden die Zellen in drei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe diente als Kontrolle (Ko) und wurde nur mit Medium, bestehend aus DMEM, 1 % Pen/Strep und 10 % FBS inkubiert (Tab. 25). Die zweite Gruppe wurde mit 100 ng/ml LPS für 12 Stunden inkubiert (Tab. 26). Die dritte Gruppe wurde mit 560 U/ml IFN- γ für 12 Stunden inkubiert (Tab. 27). Für die Behandlung der Zellen mit IFN- γ und LPS wurden mit Poly-D-Lysin beschichtete 6-Well-Platten verwendet. Nach 24-stündigem Wachstum in DMEM, 0 % FBS und 1% PenStrep wurden die Zellen für 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in den entsprechenden Behandlungsmedien (IFN- γ , LPS, Ko) inkubiert.

Die LPS-Verdünnung für die 6-Well-Platte wurde folgendermaßen vorbereitet:

- Stock A Lösung (1 mg/ml): 1 mg LPS + 1 ml Medium (DMEM + 1 % FCS)
- Stock B Lösung (10 μ g/ml): 10 μ l Stock A Lösung + 990 μ l Medium (DMEM + 1 % FCS + 1 % PenStrep)
- Stock C Lösung (100 ng/ml): 20 μ l Stock B + 1980 μ l im Well enthaltenen Medium (DMEM + 0 % FCS + 1 % Pen/Strep)

Die IFN γ -Verdünnung für die 6-Well-Platte wurde folgendermaßen vorbereitet:

- Stock A Lösung (561600 U/ml): 144 μ g Interferon- γ + 1000 μ l Medium (DMEM + 10 % FCS + 1 % PenStrep)
- Stock B Lösung (560 Units/ml): 1 μ l Stock A Lösung + 1999 μ l im Well enthaltenen Medium (DMEM + 0 % FCS + 1 % Pen/Strep)

Schematische Darstellung der Well-Platten:

	1	2	3
A	Ko	Ko	Ko
B	Ko	Ko	Ko

Tabelle 25: 6-Well-Platte: Kontrolle (Ko)

	1	2	3
A	LPS	LPS	LPS
B	LPS	LPS	LPS

Tabelle 26: 6-Well-Platte: Lipopolysaccharid (LPS)-Behandlung

	1	2	3
A	IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ
B	IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ

Tabelle 27: 6-Well-Platte: Interferon- γ (IFN γ)-Behandlung

2.6.2 Zellviabilitätsbestimmung mittels des CTB-Assays

Die Zellviabilität wurde mittels des CellTiter-Blue Cell-Viability-Assays gemessen. Dafür wurde eine „Mastermix“-Lösung aus 2,5 ml CellTiter-Blue-Reagent und 12,5 ml Medium (DMEM + 0 % FBS + 1 % PenStrep) hergestellt. Für die Messung wurde die mit PDL-beschichtete 24-Well-Platte verwendet, die Zellsuspensionen aus allen untersuchten Gruppen (IFN- γ , LPS, Kontrolle) enthielt. Das Medium der Zellsuspensionen wurde abgesaugt. Es wurden 500 μ l von der „Mastermix“-Lösung in jedes Well pipettiert. Drei leere Wells wurden mit 500 μ l der „Mastermix“-Lösung gefüllt. Nach 1 bis 4 Stunden Inkubation bei 37 °C und

5 % CO₂, wurde die Platte für 10 Sekunden geschüttelt. Je 100 ml aus jedem Well wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Fluoreszenz wurde bei 544/590 nm gemessen. Das Fluoreszenzsignal entsprach der Zellviabilität.

Die LPS-Verdünnung für die 24-Well-Platte wurde folgendermaßen vorbereitet:

- Stock D Lösung (100 ng/ml): 4,5 µl Stock B Lösung (s. Kap. 2.7.1.) + 395,5 µl im Well enthaltenen Medium (DMEM + 0 % FCS + 1 % Pen/Strep)

Die IFN γ -Verdünnung für die 24-Well-Platte wurde folgendermaßen vorbereitet:

- Stock C Lösung: 3 µl Stock A Lösung (s. Kap. 2.7.1.) + 7,5 µl Medium (DMEM + 10 % FCS)
- Stock D Lösung (224 U/ml): 1 µl Stock C Lösung+ 399 µl im Well enthaltenen Medium (DMEM + 0 % FCS + 1 % Pen/Strep)

	1	2	3	4	5	6
A	Ko	Ko	Ko	Ko	Ko	
B	IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ	
C	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	
D						

Tabelle 28: Schematische Darstellung der 24-Well-Platte: Bestimmung der Zellviabilität

2.6.3 Nukleinsäureanalyse und Immunhistochemie der Astrozytenkultur

Nach der 12-stündigen Inkubation wurde die RNA isoliert. In den nächsten Schritten wurde eine Reverse Transkription, eine Kontroll-PCR und RT-rtPCR durchgeführt (s. Kap. 2.5.). Zur Überprüfung der Reinheit der primären Astrozytenkulturen wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen GFAP und IBA1 durchgeführt.

2.7 Auswertung

Um die Expression der Proteine anhand immunhistochemischer Färbungen zu untersuchen, wurden bestimmte Hirnregionen als "Region of Interest" (ROI) definiert. Diese wurden eingescannt und ausgewertet. In diesem Projekt wurde als ROI der immunhistochemischer Färbungen der Cup- und LPC-Versuche das mediale *Corpus Callosum* (mCC) definiert. Die chromogen-gefärbten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Eclipse E200 (Nikon Instruments Europe B.V.) eingescannt und mittels des Programms ViewPoint (Precipoint, Freising, Deutschland) ausgewertet. Die Fläche des mCC wurde im Programm eingezeichnet. In der eingezeichneten Fläche wurden die untersuchten Zellen gezählt. Anschließend wurde der Quotient der Zellanzahl zur Fläche berechnet. Die immunfluoreszenz-gefärbten Schnitte wurden mittels eines Konfokalmikroskops (DSU-Mikroskop, Olympus; BX51WI) und einer monochromen Kamera (Hamamatsu; C9100-02) eingescannt und mittels des Programms Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, USA) ausgewertet. Dabei wurde die Fläche gemessen und die untersuchten Zellen in dieser Region gezählt.

Beim Cup/EAE-Modell sind die Pathologien in perivaskulären Läsionen sichtbar. Diese Läsionen sind im Gehirn verteilt. Zur Auswertung dieser Läsionen wurden Fotos von diesen Regionen mit einem LED Mikroskop (Eclipse 50i; Nikon Instruments Europe B.V.) und einer Kamera (Digital sight DS-2Mv; Nikon Instruments Europe B.V.) angefertigt und anschließend mit dem Programm ImageJ (Version 1.52a, National Institute of Health, USA), wie in der Abbildung 8 dargestellt, ausgewertet. Dafür wurden vier konzentrische Kreise mit einem Abstand von 25 µm zueinander um die Gefäße eingezeichnet. In den Flächen dieser konzentrischen Kreise wurden die untersuchten Zellen gezählt.

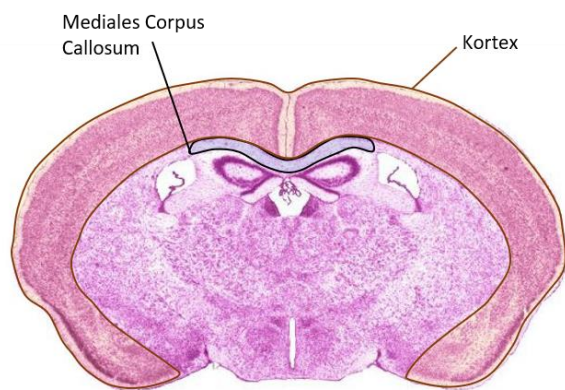


Abbildung 7: Darstellung vom Kortex und vom medialen *Corpus Callosum* an einem Hämatoxylin&Eosin (H&E)-gefärbten Gehirnschnitt auf Höhe des rostralen Hippocampus, Region 265 [1]

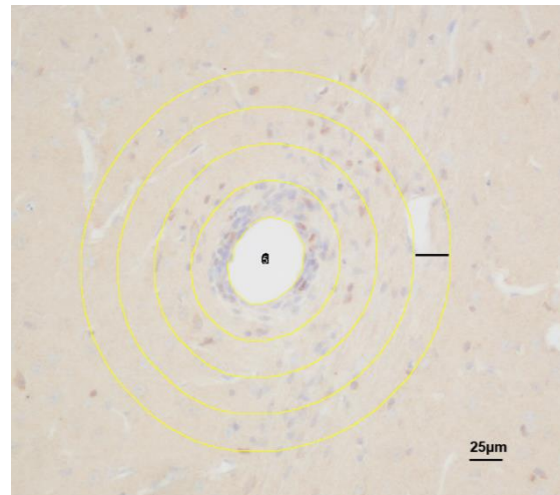


Abbildung 8: Darstellung der Auswertung von perivaskulären Läsionen. Maßstab 25 µm

Repräsentative Bilder der chromogenen Färbungen wurden mittels eines LED Mikroskops (Eclipse 50i; Nikon Instruments Europe B.V.) und einer Kamera (Digital sight DS-2Mv; Nikon Instruments Europe B.V.) aufgenommen. Repräsentative Fotos der Immunfluoreszenzfärbungen wurden mittels eines Konfokalmikroskops (DSU-Mikroskop, Olympus; BX51WI) und einer monochromen Kamera (Hamamatsu; C9100-02) gemacht.

Bei der RT-rtPCR wurde mittels RT-qPCR (TOptical Gradient Thermocycler, Biometra Analytik Jena, Deutschland) das Fluoreszenzsignal der Proben und internen Standards gemessen. Der Ct-Wert einer Probe entspricht der Anzahl der Zyklen, die die RT-rtPCR durchlaufen muss, bis das Fluoreszenzsignal der Probe das Fluoreszenzsignal des Hintergrunds überschreitet. Dementsprechend ist der Ct-Wert umgekehrt proportional zur Nukleinsäuremenge in der untersuchten Probe. Durch Messung der Ct-Werte der internen Standards wurde eine Standardkurve gebildet. Anhand dieser konnten die relativen Konzentrationen der untersuchten Proben im Verhältnis zu den internen Standards berechnet werden.

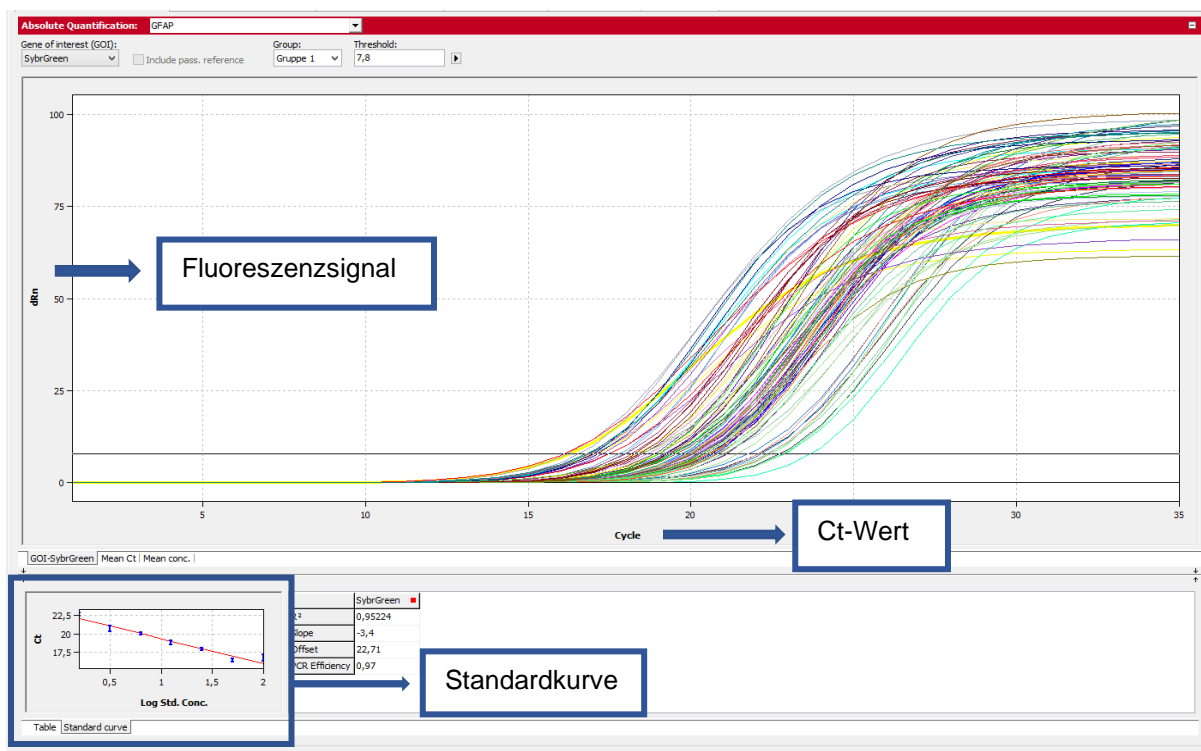


Abbildung 9: Darstellung der Auswertung einer RT-rtPCR

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Alle Daten wurden auf Normalverteilung getestet und als Mittelwert \pm Standardfehler (engl. SEM, Standard Error of the Mean) angegeben. Die Unterschiede zwischen mehr als zwei normalverteilten Gruppen wurden mit Hilfe des One-way-ANOVA-Tests und anschließend Dunn's Post-hoc-Tests ausgewertet. Bei den Versuchen, in denen zwei nicht normalverteilte Gruppen untersucht wurden, wurde der nicht

parametrische Mann-Whitney-Test angewendet. p-Werte von $\leq 0,5$ wurden als statistisch signifikant definiert. Die Auswertungen wurden verblindet durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Erhöhte Expression von C-MYC, STAT3, VCAM und TNFRSF1A im Cuprizone-Modell

Frische MS-Läsionen sind durch eine Demyelinisierung mit Oligodendrozytenverlust und Gliazellaktivierung ohne periphere Immunzellrekrutierung gekennzeichnet [30]. Um diese Pathologien widerzuspiegeln, wurde in diesem Projekt das Cuprizone-Modell verwendet, das eine reproduzierbare De- und Remyelinisierung verursacht. Histopathologische Merkmale einer Cuprizone-Intoxikation sind eine Oligodendrozytenapoptose begleitet von Gliazellaktivierung und axonalen Schäden [79, 128]. Das Immunsystem ist an diesem reinen zytodegenerativen Modell nicht beteiligt. Der Verlust der Myelinscheiden um die Axone sowie die Gliazellaktivierung lassen sich im Cuprizone-Modell im Bereich des *Corpus Callosum* gut darstellen [136]. Für die Auswertung der Versuche wurde dementsprechend als ‚Region of Interest‘ (ROI) das mediale *Corpus Callosum* definiert. In dieser ZNS-Region wurde mittels chromogener Färbungen die Expression der immunrelevanten Proteine C-MYC, STAT3, VCAM1 und TNFRSF1A im Cuprizone-Modell untersucht. Es wurde beurteilt, wie sich die Expression dieser Proteine im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation nach ein-, drei- und fünf-wöchiger Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verändert.

3.1.1 Induktion der C-MYC-Expression nach Cuprizone-Intoxikation

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen untersucht, wie sich die Expression des Transkriptionsfaktors C-MYC nach einer Cuprizone-Intoxikation verändert. In den Kontrollmäusen wurde bei der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC eine geringe Anzahl C-MYC-positiver Zellen beobachtet (Abb. **10a**). Das zelluläre Färbemuster war schwach und perinukleär in den Zellen im medialen *Corpus Callosum* angeordnet (Abb. **10b**). Nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation (1-Woche-Cup-Mäuse) war eine geringe Zunahme der Anzahl C-MYC-positiver Zellen im medialen *Corpus Callosum* erkennbar. Die Anzahl C-MYC-positiver Zellen nahm nach 3 (Abb. **10e**) und 5 Wochen (Abb. **10g**) Cuprizone-Behandlung stark zu. Das Färbemuster der C-MYC-positiven Zellen in den 3- und 5-Wochen Cup-Mäusen war nukleär. Wie in den Vergrößerungen (Abb. **10f** und Abb. **10h**) zu sehen ist, waren die C-MYC-positiven Zellen eindeutig von den negativen Zellen unterscheidbar. Die C-MYC-negativen Zellen wurden durch die nukleäre Hämatoxylin-Gegenfärbung dargestellt.

Die C-MYC-positiven Zellen wurden im medialen *Corpus Callosum* quantifiziert (Abb. **11**). Die Anzahl dieser Zellen wurde im Verhältnis zur Fläche des medialen *Corpus Callosum* berechnet. Die Anzahl C-MYC-positiver Zellen in den Behandlungsgruppen wurde mit der Anzahl C-MYC-positiver Zellen in den Kontrollmäusen verglichen. Es wurden nur die Zellen

gezählt, die ein eindeutiges nukleäres Färbemuster hatten. Bei den 1-Woche-Cup-Mäusen war eine geringe Zunahme der Anzahl C-MYC-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten (Kontrolle: $n = 5$; $10,75 \pm 9,13$; 1-Woche-Cup: $n = 5$; $20,85 \pm 8,40$ (Anzahl von Mäusen pro Gruppe; Mittelwert [Zellen/mm²] \pm Standardfehler; engl. SEM)). Eine starke Zunahme der Zellzahl wurde nach 3 Wochen Cuprizone-Intoxikation festgestellt. (3-Wochen-Cup: $n = 4$; $732,7 \pm 111,8$). Auch nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation war ein starker Anstieg der Anzahl C-MYC-positiver Zellen zu erkennen, der aber niedriger als bei den 3-Wochen-Cup-Mäusen ausfiel (5-Wochen-Cup: $n = 5$; $628,2 \pm 117,5$).

Im Kortex waren keine C-MYC-positiven Zellen zu sehen. Es wurde auch nach 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation keine Zunahme der C-MYC-Expression im Kortex beobachtet (Abb. **12**).

Um zu untersuchen, ob das Färbemuster spezifisch für C-MYC-positive Zellen war, wurden die anti-C-MYC-Schnitte mit einer Negativkontrolle verglichen. Die Negativkontrolle wurde mit Ziegenserum anstatt mit anti-C-MYC-Antikörper inkubiert. Wie in Abbildung **13a** dargestellt, war bei der Negativkontrolle nur die Hämatoxylin-Gegenfärbung zu sehen. Es waren keine C-MYC-positive Zellen lokalisierbar. Im Gegensatz dazu war bei den anti-C-MYC-gefärbten Schnitten (Abb. **13b**) eine hohe Anzahl C-MYC-positiver Zellen zu sehen.

Zusammenfassend konnten wir anhand dieses Versuchs zeigen, dass eine Cuprizone-Intoxikation eine Expressionsinduktion des Transkriptionsfaktors C-MYC im medialen *Corpus Callosum*, aber nicht im Kortex verursacht.

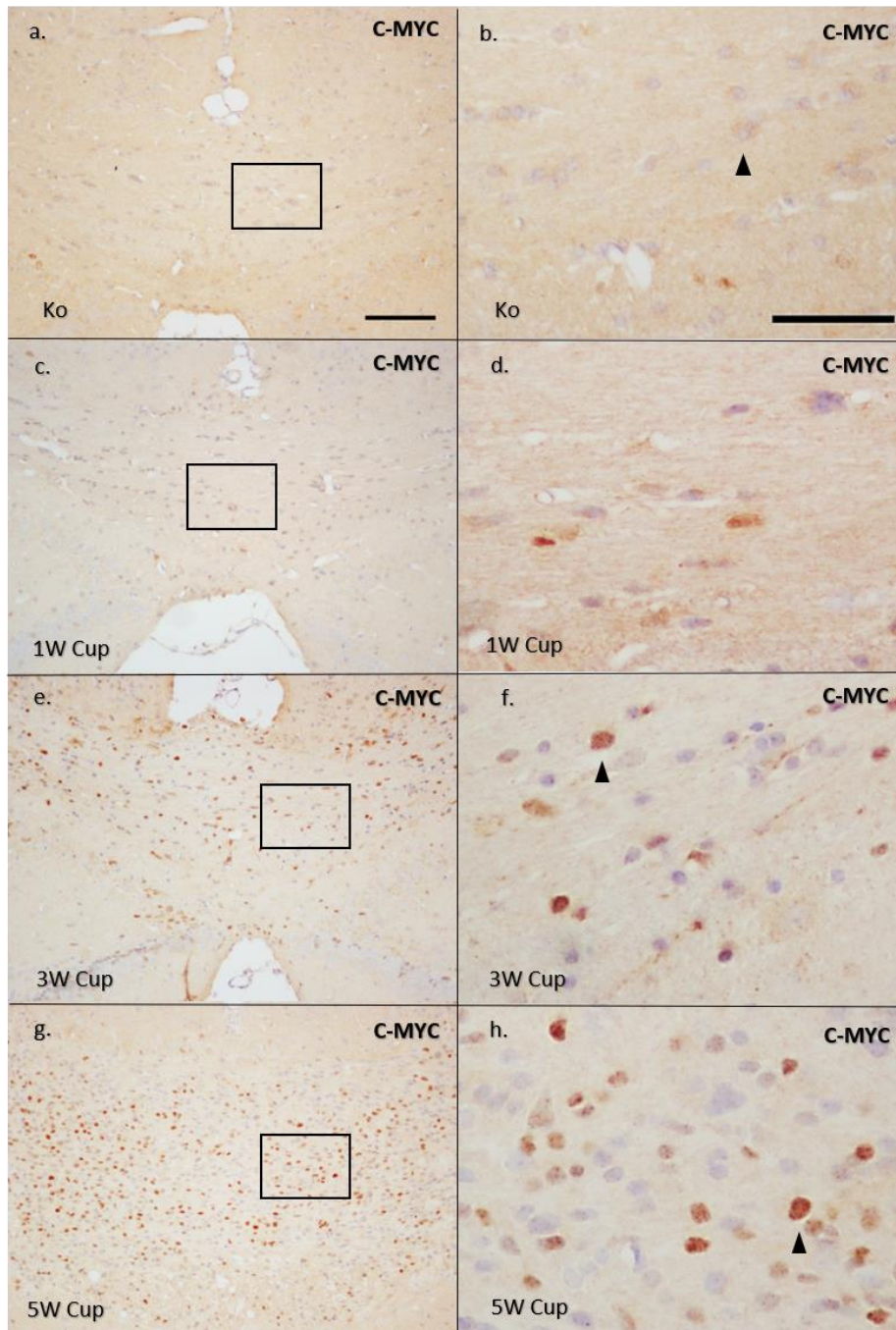


Abbildung 10: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der C-MYC-Expression im *Corpus Callosum*. Die in den Rechtecken markierten Bereiche werden in einer höheren Vergrößerung in **b, d, f, h** dargestellt. **(a)** zeigt die C-MYC-Expression im medialen *Corpus Callosum* (mCC) einer Kontrollmaus (Ko). **(b)** zeigt eine höhere Vergrößerung des mCC. Es sind keine C-MYC-positiven Zellen zu sehen. Der Pfeil zeigt eine Zelle mit schwachem perinukleärem Färbemuster. **(c)** zeigt die C-MYC-Expression im mCC einer 1 Woche-Cup-Maus (1W Cup). Es sind wenige C-MYC-positiv Zellen im mCC erkennbar (dargestellt in der höheren Vergrößerung in **d**). Nach 3 **(e)** und 5 **(g)** Wochen Cuprizone-Intoxikation ist eine Zunahme der Anzahl C-MYC-positiver Zellen im mCC zu sehen. Die entsprechenden höheren Vergrößerungen (**f, h**) zeigen C-MYC-positiv Zellen mit einem nukleärem Färbemuster. Maßstab 100 μm (**a, c, e, g**), Maßstab 50 μm (**b, d, f, h**).

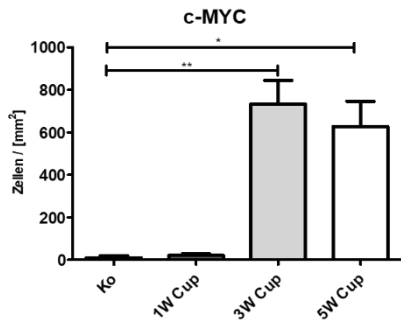


Abbildung 11: Quantifizierung der C-MYC-positiven Zellen im medialen *Corpus Callosum* von Kontroll- (n = 5), 1-Woche- (n = 5), 3-Wochen- (n = 4) und 5-Wochen- (n = 5) Cuprizone-Mäusen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des One-way-ANOVA-Tests und Dunn's Post-hoc-Tests ausgewertet; *p < 0,5; **p < 0,01 und *p < 0,001.**

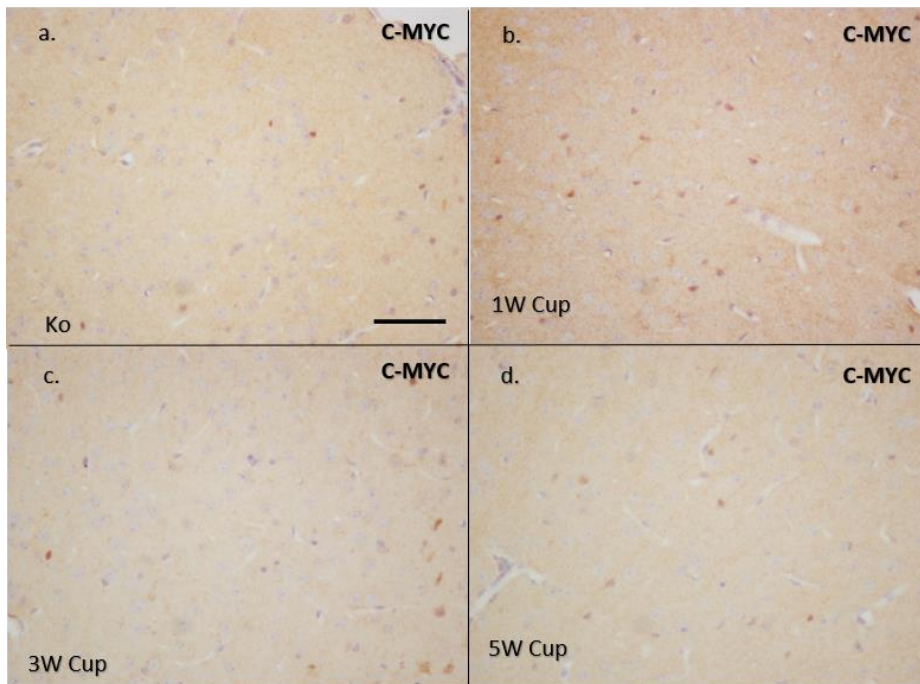


Abbildung 12: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC im Kortex einer Kontrollmaus (a), einer 1-Woche- (b), einer 3-Wochen- (c) und einer 5-Wochen- (d) Cuprizone-Maus. In keiner der Gruppen ist eine Zunahme C-MYC-positiver Zellen nach einer Cuprizone-Intoxikation zu sehen. Maßstab 50 µm (a–d).

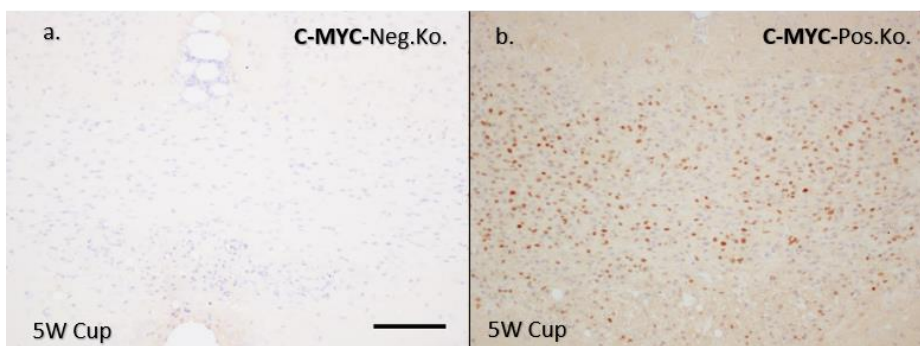


Abbildung 13: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC im medialen *Corpus Callosum* (mCC). (a) zeigt die Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC bei einer 5 Wochen-Cup-Maus (5W Cup). Im Gegensatz zum anti-C-MYC-gefärbten Schnitt (b) sind in der Negativkontrolle keine positiven Zellen zu sehen. Maßstab 100 µm (a, b).

3.1.2 Induktion der STAT3-Expression nach Cuprizone-Intoxikation

Anschließend wurde untersucht, ob die Expression des Transkriptionsfaktors STAT3 nach einer Cuprizone-Intoxikation induziert wird. Bei der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3 war das Ergebnis analog zum Ergebnis der anti-C-MYC-immunhistochemischen Färbung. Bei den Kontroll- (Abb. **14a**) und den 1-Woche-Cup-Mäusen (Abb. **14c**) war eine geringe Anzahl STAT3-positiver Zellen zu beobachten. Wie in Abbildung **14b** dargestellt, hatten einige Zellen des *Corpus Callosum* ein perinukleäres Färbemuster. Die Zellen waren klein und die Zelldichte im medialen *Corpus Callosum* war gering. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich nach 3 Wochen Cuprizone-Behandlung eine starke Zunahme der Anzahl STAT3-positiver Zellen im medialen *Corpus Callosum*, was in Abbildung **14e** dargestellt ist. In den 3- und 5-Wochen-Cup-Mäusen waren neben dem Nukleus auch die Zellfortsätze der STAT3-positiven Zellen braun angefärbt. Die Morphologie der STAT3-positiven Zellen ähnelte der von Gliazellen (Abb. **14f/h**). Auch nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation war die Zunahme der Zellzahl deutlich zu beobachten (Abb. **14g**). Des Weiteren war eine diffuse Zunahme der Hintergrundfärbung besonders im *Corpus Callosum* erkennbar. Die STAT3-positiven Zellen wurden im medialen *Corpus Callosum* quantifiziert. Die Expression von STAT3 in den 1-, 3- und 5-Wochen-Cup-Mäusegruppen wurde mit der STAT3-Expression in den Kontrollmäusen verglichen. Nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation war eine leichte Zunahme der Anzahl STAT3-positiver Zellen zu beobachten (Kontrolle: $n = 5$, $8,87 \pm 7,49$, 1-Woche-Cup: $n = 5$; $25,37 \pm 8,09$). Wie in Abbildung **15** dargestellt, war nach 3 Wochen die Zunahme der Anzahl STAT3-positiver Zellen im medialen *Corpus Callosum* am stärksten (3-Wochen-Cup: $n=4$; $959,9 \pm 149,5$). Nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation nahm die Zellzahl im Vergleich zur 3-Wochen-Cup-Gruppe ab. Sie war aber immer noch signifikant höher als die Anzahl STAT3-positiver Zellen in der Kontrollgruppe (5-Wochen-Cup: $n = 5$; $555,0 \pm 39,38$).

Im Kortex war nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation (Abb. **16b**) keine Veränderung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar. Erst nach 3 Wochen Cuprizone-Intoxikation (Abb. **16c**) kam es zu einer Zunahme der Anzahl STAT3-positiver Zellen. Auch bei den 5-Wochen-Cup-Mäusen waren im Kortex STAT3-positive Zellen zu sehen (Abb. **16d**).

Um zu untersuchen, ob das braune Färbemuster der immunhistochemischen Färbung spezifisch für STAT3 war, wurde eine Negativkontrolle angefertigt, bei der der anti-STAT3-Antikörper durch Ziegenserum ersetzt wurde. Wie in der Abbildung **17a** dargestellt, waren bei der Negativkontrolle keine STAT-3-positive Zellen zu sehen. Beim anti-STAT3-gefärbten

Schnitt war eine hohe Anzahl STAT3-positiver Zellen zu sehen (Abb. **17b**). Somit war die anti-STAT3-Färbung spezifisch.

Zusammenfassend konnten wir in diesem Versuch zeigen, dass eine Cuprizone-induzierte Demyelinisierung von einer Zunahme der Anzahl STAT3-positiver Zellen vor allem im medialen *Corpus Callosum*, aber teilweise auch im Kortex begleitet wird.

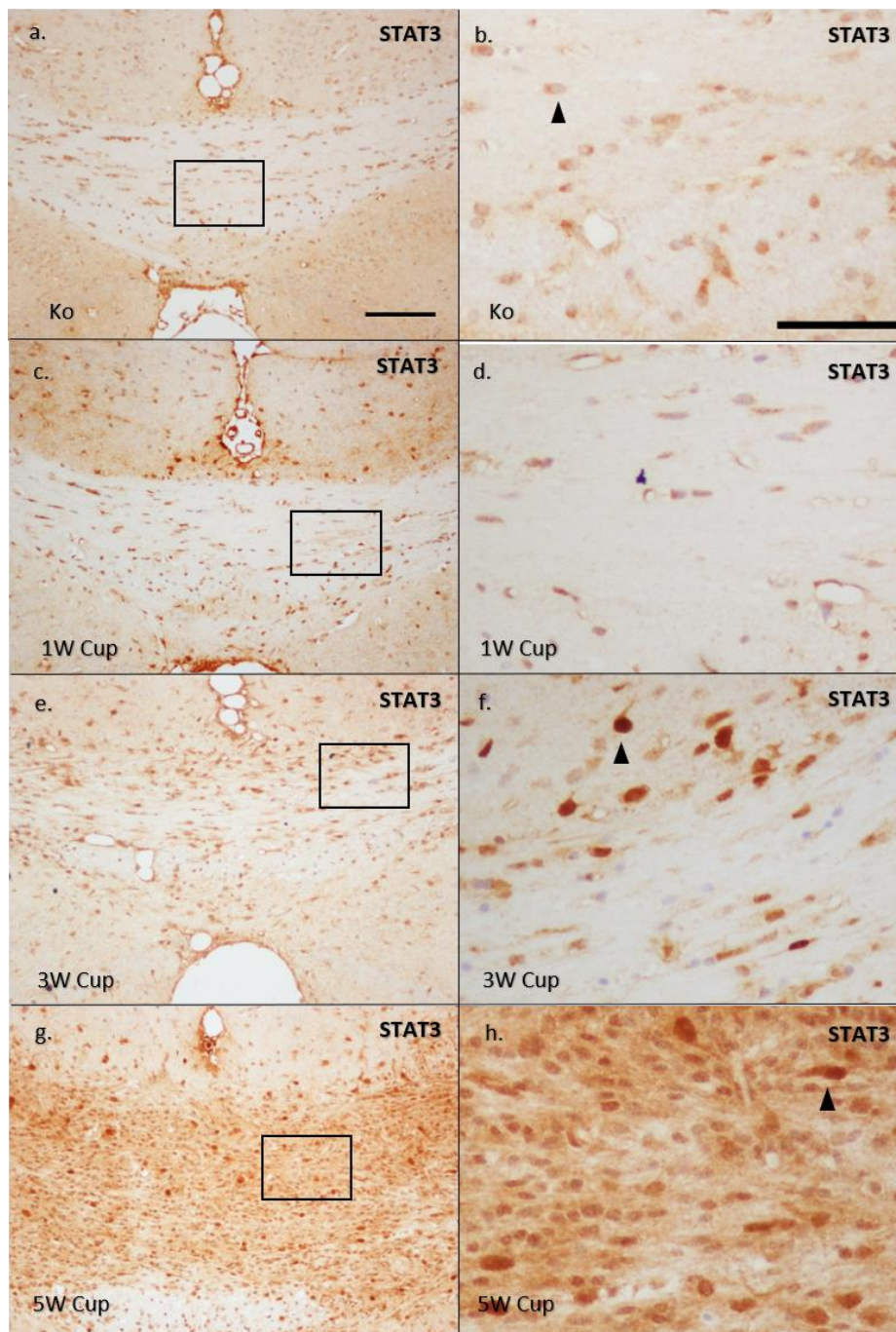


Abbildung 14: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der STAT3-Expression im *Corpus Callosum*. Die in den Rechtecken markierten Bereiche werden in einer höheren Vergrößerung in **b, d, f, h** dargestellt. **(a)** zeigt die STAT3-Expression im medialen *Corpus Callosum* (mCC) einer Kontrollmaus (Ko). **(b)** zeigt eine höhere Vergrößerung des mCC. Es sind keine STAT3-positiven Zellen zu sehen. Der Pfeil zeigt eine Zelle mit schwachem perinukleärem Färbemuster. **(c)** zeigt die STAT3-Expression im mCC einer 1 Woche-Cup-Maus (1W Cup). Es sind fast keine STAT3-positiven Zellen im mCC zu sehen (dargestellt in der höheren Vergrößerung in **d**). Nach 3 **(e)** und 5 **(g)** Wochen Cuprizone-Intoxikation ist eine starke Zunahme der Anzahl STAT3-positiver Zellen im mCC erkennbar. In den STAT3-positiven Zellen (dargestellt in den höheren Vergrößerungen **f, h**) ist das Färbemuster sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch. Maßstab 100 μm (**a, c, e, g**), Maßstab 50 μm (**b, d, f, h**).

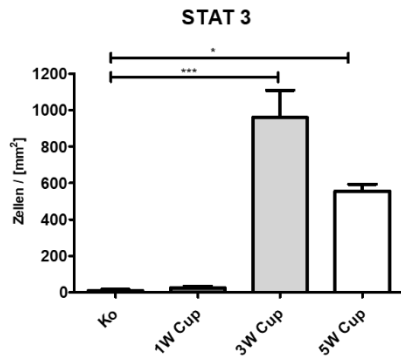


Abbildung 15: Quantifizierung der STAT3-positiven Zellen im medialen Corpus Callosum von Kontroll- (n = 5), 1-Woche- (n = 5), 3-Wochen- (n = 4) und 5-Wochen- (n = 5) Cuprizone-Mäusen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des One-way-ANOVA-Tests und Dunn's Post-hoc-Tests ausgewertet; *p < 0,5; **p < 0.01 und ***p < 0,001.

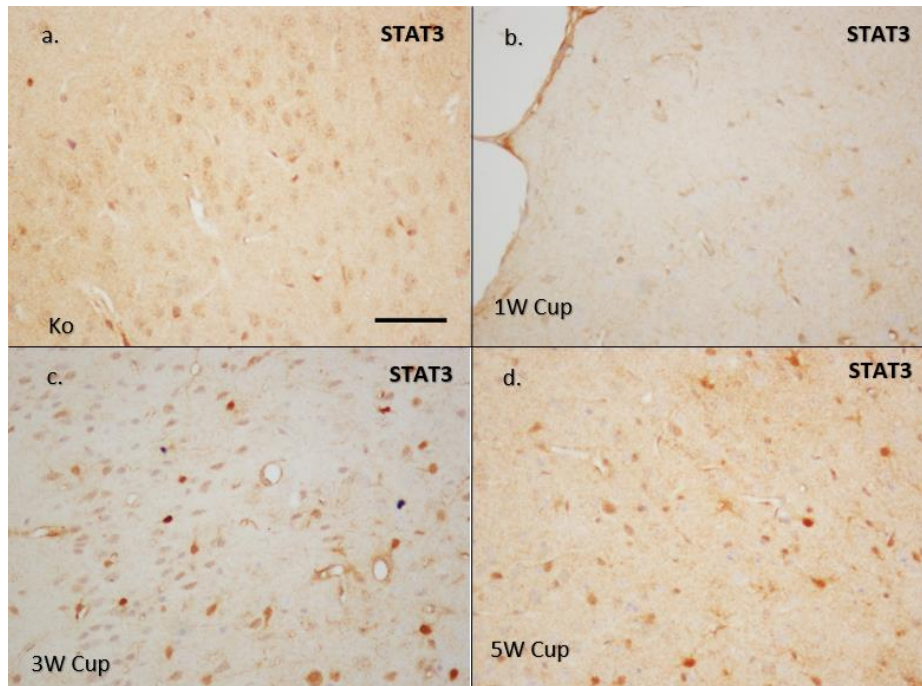


Abbildung 16: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3 im Kortex einer Kontrollmaus (a), einer 1-Woche- (b), einer 3-Wochen- (c) und einer 5-Wochen- (d) Cup-Maus. Eine Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Zunahme der Anzahl STAT3-positiver Zellen nach 3- (c) und 5- (d) wöchiger Behandlung. Maßstab 50 µm (a–d).

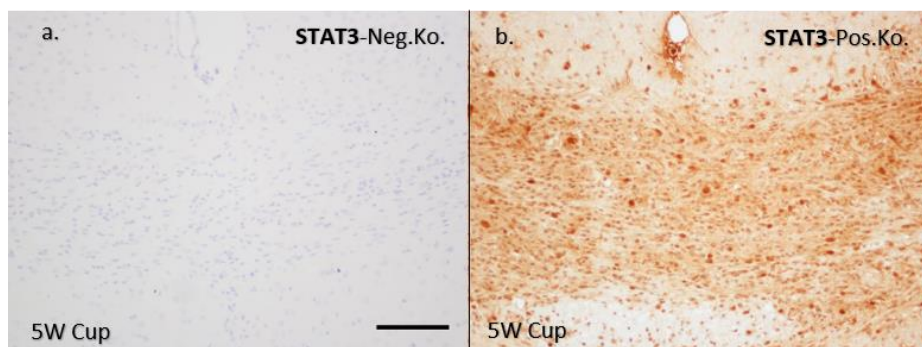


Abbildung 17: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3 im medialen Corpus Callosum (mCC). (a) zeigt die Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3 bei einer 5 Wochen-Cup-Maus (5W Cup). Im Gegensatz zum anti-STAT3-gefärbten Schnitt (b) sind in der Negativkontrolle keine positiven Zellen zu sehen. Maßstab 100 µm (a, b).

3.1.3 Induktion der VCAM1-Expression nach Cuprizone-Intoxikation

Als Nächstes wurde die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM1 nach einer Cuprizone-Intoxikation untersucht. Bei der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1 war bei Kontroll- und 1-Woche-Cup-Mäusen eine geringe Anzahl VCAM1-positiver Zellen zu beobachten (Abb. **18a/c**). Nach 3 Wochen Cuprizone-Intoxikation war eine Zunahme der Anzahl VCAM1-positiver Zellen erkennbar (Abb. **18e**). Bei den 5-Wochen-Cup-Mäusen kam es zu einem weiteren Anstieg der Zellzahl (Abb. **18g**). Die VCAM1-positiven Zellen im *Corpus Callosum* hatten ein diffuses zytoplasmatisches Färbemuster. Der Nukleus der positiven Zellen war relativ groß und heller im Vergleich zu den restlichen Zellen (Abb. **18h**).

Die VCAM1-positiven Zellen wurden im medialen *Corpus Callosum* quantifiziert (Abb. **19**). Bei den Kontrollmäusen waren kaum VCAM1-positive Zellen im medialen *Corpus Callosum* zu sehen (Kontrolle: n = 5; $31,12 \pm 6,59$). Nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation war noch kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zu sehen (1-Woche-Cup: n=5; $28,76 \pm 11,66$). Erst nach 3 Wochen Cuprizone-Intoxikation nahm die Anzahl VCAM1-positiver Zellen deutlich zu (3-Wochen-Cup: n = 4; $204,3 \pm 46,32$). Die Zellzahl nahm nach weiteren 2 Wochen Cuprizone-Behandlung noch stärker zu (5-Wochen-Cup: n = 5; $670,2 \pm 93,04$).

Im Gegensatz zu den anderen zwei Färbungen gegen C-MYC und STAT3 waren bei dieser Färbung VCAM1-positive Zellen im Kortex aller untersuchten Gruppen sichtbar (Abb. **20**). Diese Zellen hatten jedoch ein schwächeres Färbemuster als die VCAM1-positiven Zellen im *Corpus Callosum*.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die immunhistochemische anti-VCAM1-Färbung spezifisch für VCAM1-positive Zellen war. In Abbildung **21a** ist eine Negativkontrolle dargestellt, bei der der anti-VCAM1-Antikörper mit Ziegen Serum ersetzt wurde. Im Gegensatz zum anti-VCAM1-gefärbten Schnitt (Abb. **21b**) wurden keine positiven Zellen in der Negativkontrolle beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass das braune Färbemuster spezifisch für VCAM1-positive Zellen war.

Da das Färbemuster der VCAM1-positiven Zellen schwach und nicht eindeutig zellulär abgrenzbar war, wurde das Ergebnis mit einem zweiten Antikörper gegen VCAM1 (VCAM1') überprüft. Dafür wurden Schnitte von Kontroll- (Abb. **22a**) und 5-Wochen-Cup-Mäusen (Abb. **22b**) untersucht. Das Ergebnis war ähnlich dem der ersten Färbung gegen VCAM1. Im *Corpus Callosum* zeigte sich nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation eine starke Zunahme der Anzahl VCAM1'-positiver Zellen (Abb. **22b'**) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. **22a'**). Im Kortex war sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei den 5-Wochen-Cuprizone-Mäusen ein leichtes nukleäres Färbemuster der VCAM1'-positiven Zellen zu erkennen (Abb. **22c/d**).

Zusammenfassend konnten wir in diesem Versuch zeigen, dass Cuprizone die Expression von VCAM1 im medialen *Corpus Callosum* induziert.

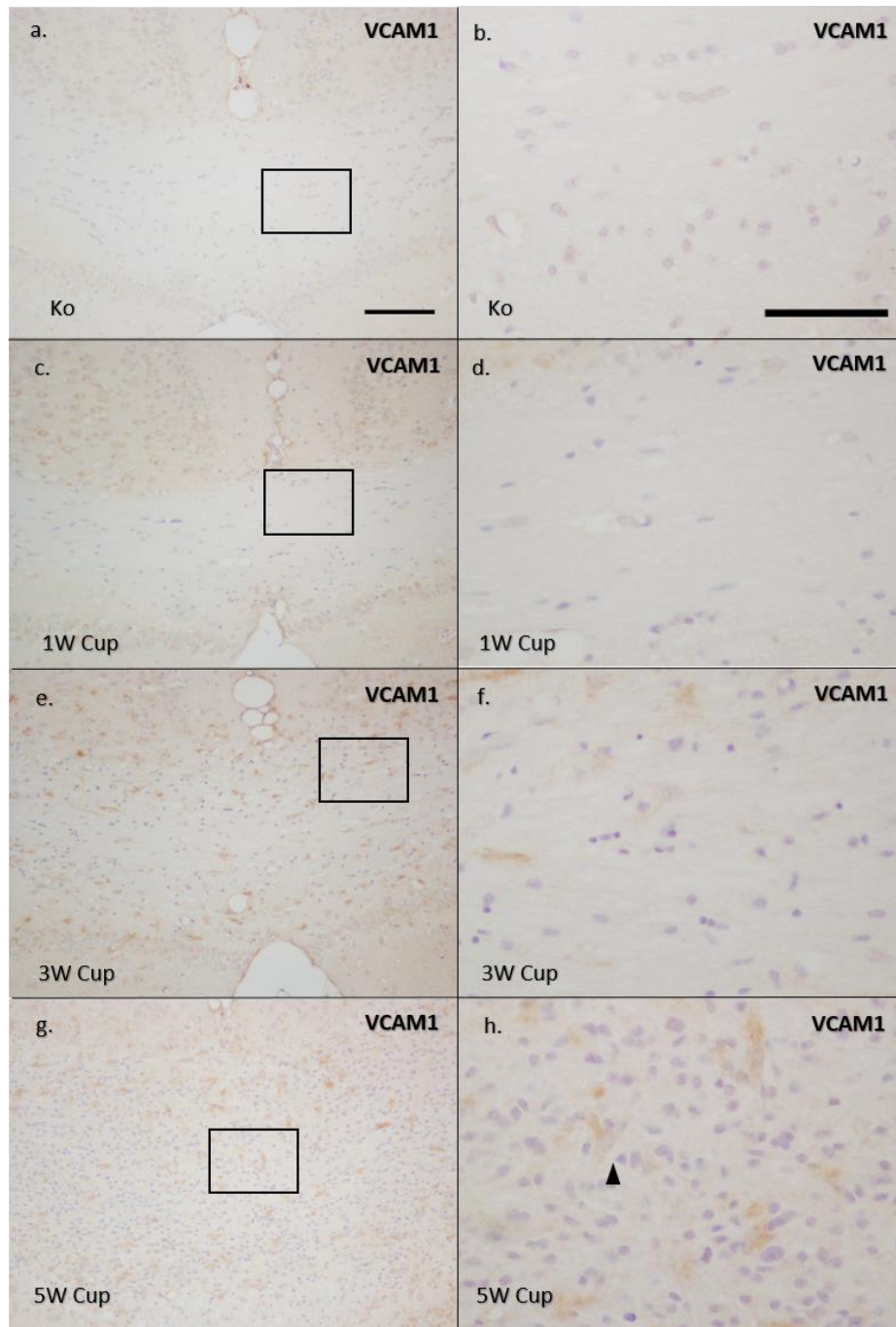


Abbildung 18: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der VCAM1-Expression im *Corpus Callosum*. Die in den Rechtecken markierten Bereiche werden in einer höheren Vergrößerung in **b, d, f, h** dargestellt. **(a)** zeigt die VCAM1-Expression im medialen *Corpus Callosum* (mCC) einer Kontrollmaus. **(b)** zeigt eine höhere Vergrößerung des mCC. Es sind keine VCAM1-positiven Zellen zu sehen. **(c)** zeigt die VCAM1-Expression im mCC einer 1 Woche-Cup-Maus (1W Cup). Es sind keine VCAM1-positiven Zellen sichtbar (dargestellt in einer höheren Vergrößerung in **d**). Nach 3 Wochen **(e)** Cuprizone-Intoxikation ist eine leichte Zunahme der Anzahl VCAM1-positiver Zellen im mCC erkennbar. Eine starke Zunahme der Zellzahl ist nach 5 Wochen **(g)** Cuprizone-Intoxikation zu sehen. Wie auch in der höheren Vergrößerung **(h)** sichtbar, haben die VCAM1-positiven Zellen ein zytoplasmatisches Färbemuster. Der Nukleus der VCAM1-positiven Zellen ist heller und größer als der in den VCAM1-negativen Zellen. Maßstab 100 µm (**a, c, e, g**), Maßstab 50 µm (**b, d, f, h**).

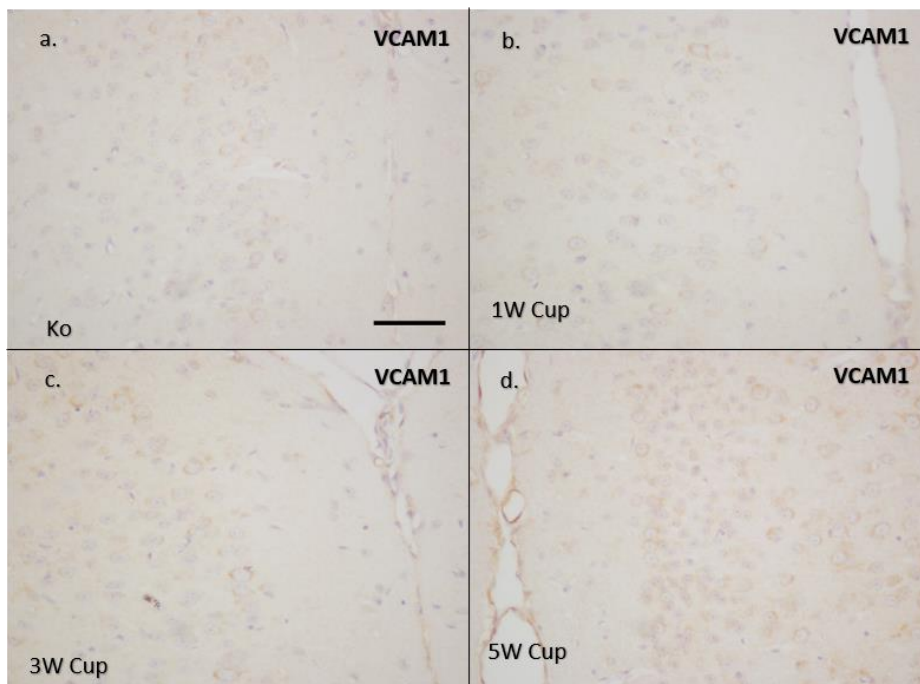
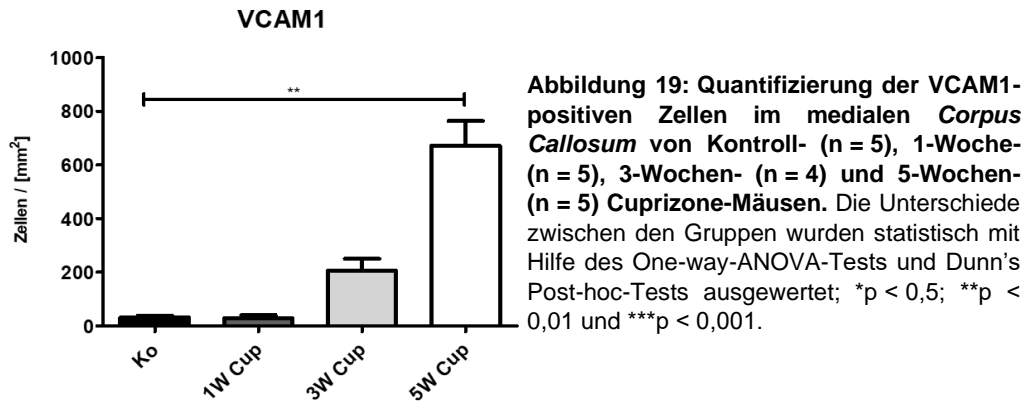


Abbildung 20: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1 im Kortex einer Kontrollmaus (a), einer 1-Woche- (b), einer 3-Wochen- (c) und einer 5-Wochen- (d) Cuprizone-Maus. In allen Gruppen ist nur ein schwaches zytoplasmatisches Färbemuster sichtbar. Maßstab 50 µm (a–d).

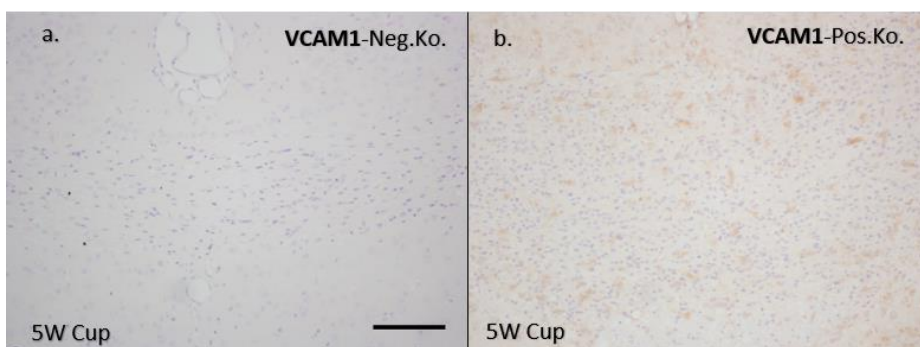


Abbildung 21: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1 im medialen *Corpus Callosum* (mCC). (a) zeigt die Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1 bei einer 5 Wochen-Cup-Maus (5W Cup). Im Gegensatz zum anti-VCAM1-gefärbten Schnitt (b) sind in der Negativkontrolle keine positiven Zellen zu sehen. Maßstab 100 µm (a, b).

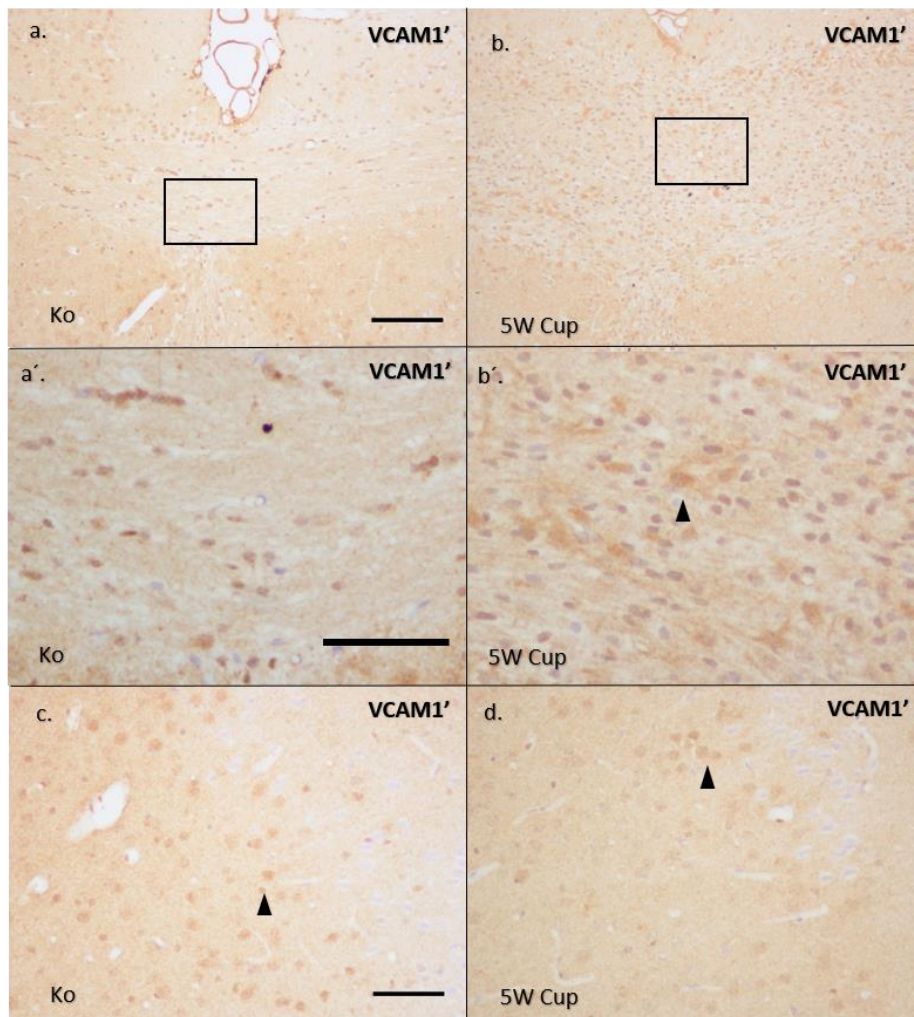


Abbildung 22: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1'. Die Cuprizon-Intoxikation verursacht eine Induktion der VCAM1'-Expression im *Corpus Callosum*. Die in den Rechtecken markierten Bereiche werden in einer höheren Vergrößerung in **a'**, **b'** dargestellt. **(a)** zeigt die VCAM1'-Expression im medialen *Corpus Callosum* (mCC) einer Kontrollmaus (Ko). **(a')** zeigt eine höhere Vergrößerung des mCC. Es sind wenige VCAM1'-positive Zellen zu sehen. **(b)** zeigt die VCAM1'-Expression im mCC einer 5 Wochen-Cup-Maus (5W Cup). Es ist eine starke Zunahme der Anzahl VCAM1'-positiver Zellen erkennbar. Die VCAM1'-positiven Zellen haben ein zytoplasmatisches Färbemuster, dargestellt in einer höheren Vergrößerung in **(b')**. Im Kortex ist keine Veränderung der Zellzahl zwischen einer Kontroll-**(c)** und einer 5-Wochen-Cup-Maus **(d)** sichtbar. Die Zellen haben ein schwaches nukleäres Färbemuster. Maßstab 100 µm **(a, b)**, Maßstab 50 µm **(a', b', c, d)**.

3.1.4 Induktion der TNFRSF1A-Expression nach Cuprizone-Intoxikation

Abschließend wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen untersucht, ob die Expression des Rezeptors TNFRSF1A nach einer Cuprizone-Intoxikation induziert wird. Bei der immunhistochemischen Färbung gegen TNFRSF1A waren im *Corpus Callosum* der Kontrollmäuse wenige TNFRSF1A-positive-Zellen zu sehen (Abb. **23a**). Die TNFRSF1A-positiven Zellen hatten ein perinukleäres Färbemuster (Abb. **23a**). Im Gegensatz dazu war nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation eine starke Zunahme der Anzahl TNFRSF1A-positiver Zellen zu sehen (Abb. **23b**). Die Zellen in den 5-Wochen-Cup-Mäusen hatten ein zytoplasmatisches Färbemuster (Abb. **23b**).

Im *Corpus Callosum* war kein zelluläres Färbemuster der TNFRSF1A-positiven Zellen eindeutig abgrenzbar, was eine Quantifizierung dieser Zellen erschwerte. Stattdessen war nur eine diffuse Zunahme der Immunreaktivität gegen TNFRSF1A zu sehen. Deshalb wurde die Anzahl der Zellen nicht quantifiziert.

Im Kortex der Kontrollmäuse konnte eine Vielzahl von TNFRSF1A-positiven Zellen beobachtet werden (Abb. **23c**). Ihre Zellfortsätze waren braun angefärbt. Die Morphologie der TNFRSF1A-positiven Zellen ähnelte im Kortex der Kontrollmäuse der Morphologie von Neuronen. Nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation waren keine TNFRSF1A-positiven Zellen im Kortex zu sehen (Abb. **23d**).

Um die Spezifität der immunhistochemischen Färbung gegen TNFRSF1A zu untersuchen, wurde eine Negativkontrolle angefertigt. Bei dieser wurde der anti-TNFRSF1A-Antikörper durch Ziegen Serum ersetzt. Wie in Abbildung **24** dargestellt, waren in der Negativkontrolle (Abb. **24a**) keine positiven Zellen zu sehen. Im Gegensatz dazu war die Anzahl TNFRSF1A-positiver Zellen beim anti-TNFRSF1A-gefärbten Schnitt hoch (Abb. **24b**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Cuprizone-Intoxikation eine Induktion der Expression des Rezeptors TNFRSF1A im *Corpus Callosum* verursacht. Obwohl die Zellanzahl nicht quantifiziert wurde, war die Zunahme der Immunreaktivität gegen TNFRSF1A nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation eindeutig.

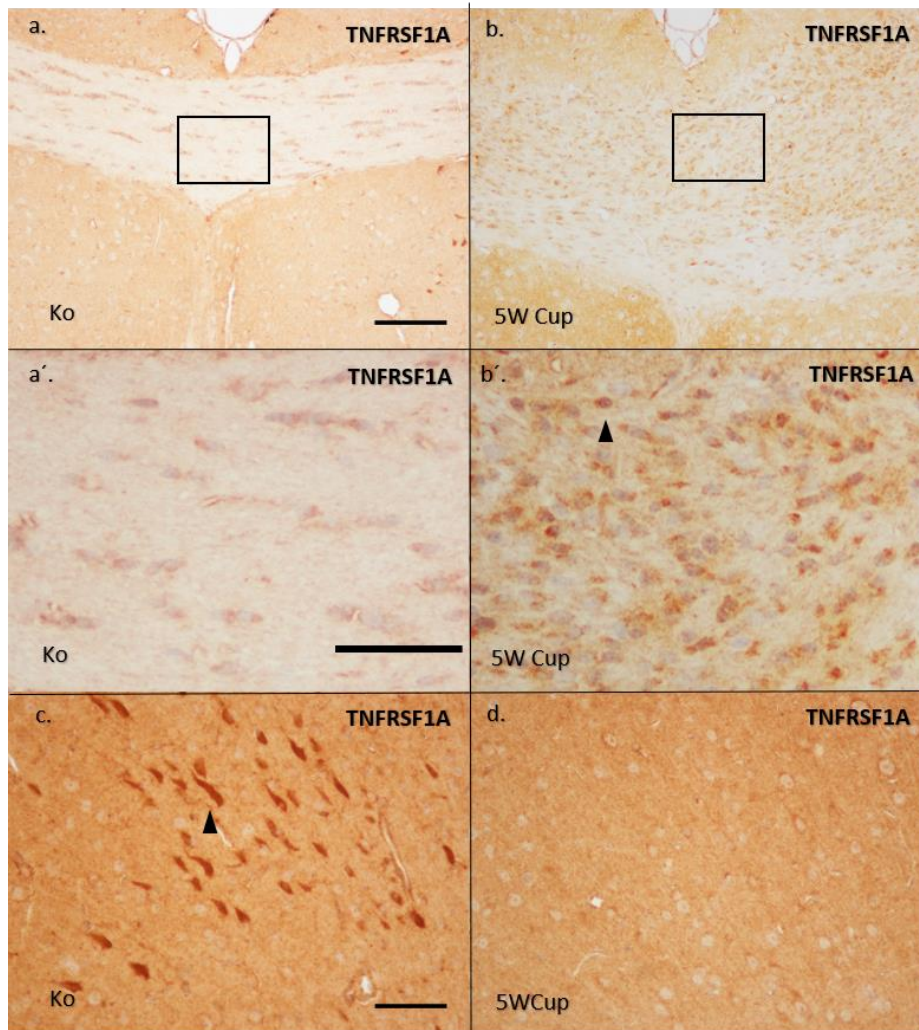


Abbildung 23: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen TNFRSF1A. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der TNFRSF1A-Expression im *Corpus Callosum*. Die in den Rechtecken markierten Bereiche werden in einer höheren Vergrößerung in **a'**, **b'** dargestellt. **(a)** zeigt die TNFRSF1A-Expression im medialen *Corpus Callosum* (mCC) einer Kontrollmaus (Ko). **(a')** zeigt eine höhere Vergrößerung des mCC. Es sind wenige TNFRSF1A-positive Zellen zu sehen. **(b)** zeigt die TNFRSF1A-Expression im mCC einer 5 Wochen-Cup-Maus (5W Cup). Es ist eine starke Zunahme der Anzahl TNFRSF1A-positiver Zellen erkennbar. Diese haben ein zytoplasmatisches Färbemuster, dargestellt in einer höheren Vergrößerung in **(b')**. Der Nucleus ist nicht angefärbt. Im Kortex sind TNFRSF1A-positive Zellen im mCC einer Kontrollmaus sichtbar. **(c)**. Nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation sind keine TNFRSF1A-positive Zellen zu sehen **(d)**. Maßstab 100 μ m (**a**, **b**), Maßstab 50 μ m (**a'**, **b'**, **c**, **d**).

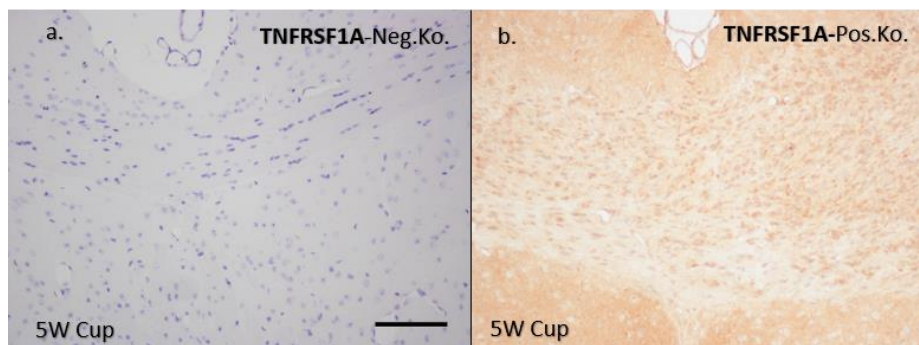
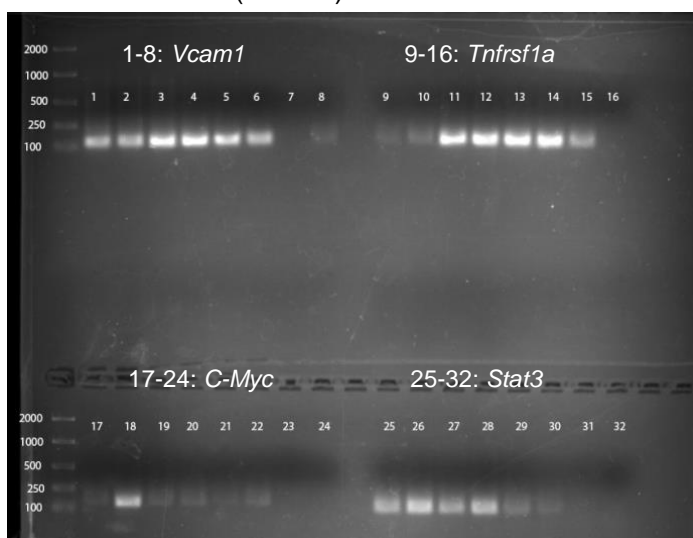


Abbildung 24: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen TNFRSF1A im medialen *Corpus Callosum* (mCC). **(a)** zeigt die Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung gegen TNFRSF1A bei einer 5 Wochen-Cup-Maus (5W Cup). Im Gegensatz zum anti-TNFRSF1A-gefärbten Schnitt **(b)** sind in der Negativkontrolle keine positiven Zellen zu sehen. Maßstab 100 μ m (**a**, **b**).

3.2 Erhöhte mRNA-Expression von *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* im Cuprizone-Modell

Anhand der immunhistochemischen Färbungen wurde die Expression der immunrelevanten Proteine C-MYC, STAT3, VCAM1 und TNFRSF1A in einem nichtautoimmunen Demyelinisierungsmodell dargestellt. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben wurde, wird die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung von einer erhöhten Expression dieser Proteine begleitet. Im nächsten Schritt wurde dieses Ergebnis auf der mRNA-Ebene überprüft. Dafür wurden Reverse Transkription - Echtzeit-Polymerasekettenreaktionen (engl. Reverse Transcription Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-rtPCR) für die vier untersuchten Gene, *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a*, durchgeführt. Für die Auswertung der Expressionsergebnisse wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen. Dabei wurden die Expressionsergebnisse der untersuchten Gene (*C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a*) auf die Expressionsergebnisse der Haushaltsgene (*Hprt* und *Beta-Actin*) bezogen. Die mRNA-Expression von *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* bei den 1-, 3- und 5- Wochen-Cup-Mäusen wurde mit der mRNA-Expression dieser Gene in den Kontrollmäusen verglichen. Die Expression der mRNA dieser Gene wurde sowohl im Kortex als auch im *Corpus Callosum* untersucht. Referenzwert für die Quantifizierung war der Mittelwert der mRNA-Konzentrationen des *Corpus Callosum* der Kontrollmäuse. Für jede Gruppe wurde das Gewebe von fünf Mäusen untersucht (n = 5).

Zunächst wurden die Primer für die untersuchten Gene etabliert, um die passende Hybridisierungstemperatur zu bestimmen. Anhand einer PCR und einer anschließenden Gelelektrophorese (Abb. 25) konnten folgende optimale Hybridisierungstemperaturen bestimmt werden (Tab.29):



Gen	T _A [°C]
<i>C-Myc</i>	53,5
<i>Stat3</i>	53,5
<i>Vcam1</i>	62,3
<i>Tnfrsf1a</i>	60,1

Tabelle 29: Primer-Hybridisierungstemperaturen (T_A) der untersuchten Gene.

Abbildung 25: Gel-Elektrophorese der Primer-Etablierung.

Zu Beginn wurden die RT-rtPCRs für die Haushaltsgene *Hprt* und *Beta-Actin* durchgeführt. Die mRNA-Konzentrationen der untersuchten Gene wurden im Verhältnis zum Mittelwert der Haushaltsgene-mRNA berechnet (Tab.30).

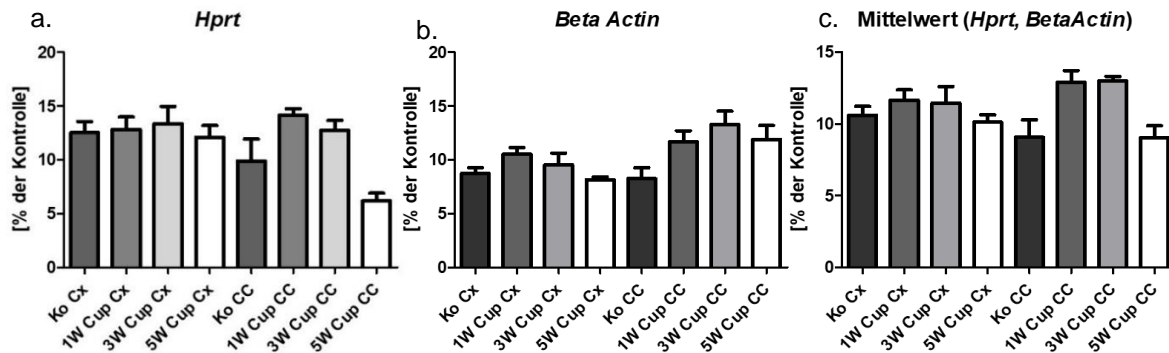


Abbildung 26: mRNA-Quantifizierung der Haushaltsgene *Hprt* und *Beta-Actin* im Kortex (Cx) und im *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche- (1W Cup), 3-Wochen- (3W Cup) und 5-Wochen- (5W Cup) Cup-Mäusen. (a) zeigt die mRNA-Quantifizierung von *Hprt*. (b) zeigt die mRNA-Quantifizierung von *Beta-Actin*. (c) zeigt den Mittelwert der mRNA-Quantifizierungen von *Hprt* und *Beta-Actin*.

Gen	Region	Kontrolle	1-Woche-Cup	3-Wochen-Cup	5-Wochen-Cup
<i>Hprt</i>	Cx	12,50± 1,06	12,82± 1,16	13,37± 1,60	12,07± 1,10
	CC	9,90± 2,02	14,14± 0,61	12,75± 0,92	6,17± 0,73
<i>Beta-Actin</i>	Cx	8,72± 0,55	10,51± 0,63	9,52± 1,10	8,16± 0,25
	CC	8,24± 1,02	11,68± 1,02	13,25± 1,25	11,90± 1,29
Mittelwert	Cx	10,61± 0,61	11,66± 0,71	11,44± 1,16	10,12± 0,51
	CC	9,07± 1,21	12,91± 0,80	13,00± 0,31	9,03± 0,84

Tabelle 30: mRNA-Konzentration der Haushaltsgene im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen.

3.2.1 Induktion der *C-Myc*-mRNA-Expression im Cuprizone-Modell

Anschließend wurde mittels einer RT-rtPCR die *C-Myc*-Expression nach Cuprizone-Intoxikation untersucht. Es wurde beobachtet, dass es nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation (1-Woche-Cup) zu einer Zunahme der *C-Myc*-mRNA-Konzentration sowohl im Kortex (Cx) als auch im *Corpus Callosum* (CC) kommt (Abb. 27). Diese Induktion war in beiden Gehirnregionen signifikant. Nach 3 Wochen Cuprizone-Intoxikation (3-Wochen-Cup) nahm die *C-Myc*-mRNA-Konzentration im Vergleich zur 1-Woche-Cup-Gruppe in beiden Gehirnregionen ab. Sie war aber immer noch höher als in der Kontrollgruppe (Ko). Nach 5

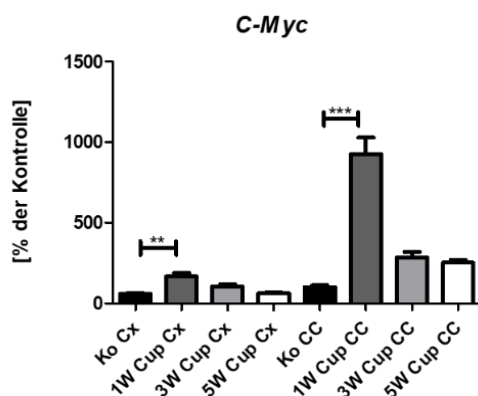


Abbildung 27: *C-Myc*-mRNA-Quantifizierung im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche- (1W Cup), 3-Wochen- (3W Cup) und 5-Wochen- (5W Cup) Cuprizone-Mäusen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des One-way-ANOVA-Tests und Dunn's-Post-hoc-Tests ausgewertet; *p < 0,5; **p < 0,01 und ***p < 0,001.

Wochen Cuprizone-Intoxikation (5-Wochen-Cup) nahm die mRNA-Konzentration von *C-Myc* im *Corpus Callosum* und im Kortex weiter ab, blieb jedoch höher als in der Kontrollgruppe.

Kortex	Kontrolle	58,49± 7,458
	1-Woche-Cup	167,0± 20,82
	3-Wochen-Cup	102,9± 15,61
	5-Wochen-Cup	62,31± 5,555
Corpus Callosum	Kontrolle	100,0± 11,40
	1-Woche-Cup	925,8± 104,0
	3-Wochen-Cup	285,2± 34,88
	5-Wochen-Cup	252,3± 18,81

Tabelle 31: *C-Myc*-mRNA im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen.

3.2.2 Induktion der *Stat3*-mRNA-Expression im Cuprizone-Modell

Als Nächstes wurde untersucht, wie sich die *Stat3*-Expression nach einer Cuprizone-Intoxikation verändert. Anhand der Ergebnisse der RT-rtPCR zum Nachweis der *Stat3*-mRNA wurde eine Zunahme der mRNA-Konzentration im Kortex (Cx) aller Cuprizone-behandelten Gruppen festgestellt (Abb. 28). Am höchsten war die mRNA-Konzentration in der 1-Woche-Cup-Gruppe, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe zu erreichen. Im *Corpus Callosum* (CC) war nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation eine signifikante Zunahme der *Stat3*-mRNA-Konzentration zu beobachten. In der 3-Wochen-Cup-Gruppe nahm die *Stat3*-mRNA-Konzentration ab und nach 2 weiteren Wochen Cuprizone-Intoxikation nahm sie wieder zu, erreichte aber keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

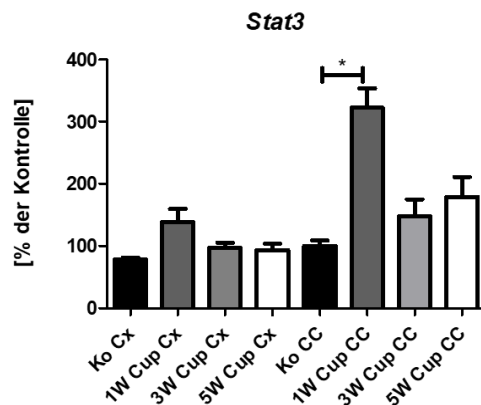


Abbildung 28: *Stat3*-mRNA-Quantifizierung im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche (1W Cup), 3-Wochen (3W Cup) und 5-Wochen (5W Cup) Cuprizone-Mäusen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des One-way-ANOVA-Tests und Dunn's-Post-hoc-Tests ausgewertet; *p < 0,5; **p < 0.01 und ***p < 0.001.

Kortex	Kontrolle	78,16± 3,102
	1-Woche-Cup	138,2± 21,66
	3-Wochen-Cup	97,12± 8,367
	5-Wochen-Cup	93,60± 10,15
Corpus Callosum	Kontrolle	100,0± 8,752
	1-Woche-Cup	322,6± 30,75
	3-Wochen-Cup	148,1± 26,89
	5-Wochen-Cup	179,2± 32,06

Tabelle 32: *Stat3*-mRNA im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen

3.2.3 Induktion der *Vcam1*-mRNA-Expression im Cuprizone-Modell

Anschließend wurde untersucht, ob sich die Expressionsinduktion des Proteins VCAM1 nach einer Cuprizone-Intoxikation auch in der Expression der *Vcam1*-mRNA widerspiegelt. Wie in Abbildung 29 dargestellt, war die *Vcam1*-mRNA-Konzentration im Kortex (Cx) aller untersuchten Gruppen (Kontrolle, 1-, 3- 5-Wochen-Cup) annähernd gleich. Eine Zunahme der *Vcam1*-mRNA-Konzentration war nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation im *Corpus Callosum* (CC) zu beobachten. Der Unterschied der *Vcam1*-mRNA-Konzentration im *Corpus Callosum* zwischen der 1-Woche-Cuprizone- und der Kontrollgruppe war signifikant. Die *Vcam1*-mRNA-Konzentration nahm nach weiteren 2 Wochen Cuprizone-Intoxikation ab. In der 5-Wochen-Cup-Gruppe konnte eine leichte Zunahme der *Vcam1*-mRNA-Konzentration im *Corpus Callosum* festgestellt werden, die aber keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe darstellte.

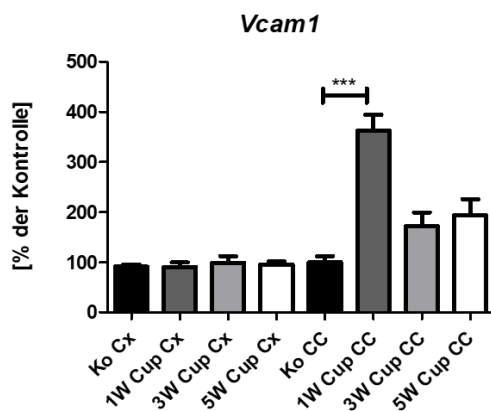


Abbildung 29: *Vcam1*-mRNA-Quantifizierung im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche- (1W Cup), 3-Wochen- (3W Cup) und 5-Wochen- (5W Cup) Cuprizone-Mäusen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des One-way-ANOVA-Tests und Dunn's Post-hoc-Tests ausgewertet; *p < 0,5; **p < 0,01 und ***p < 0,001.

Kortex	Kontrolle	91,27 ± 4,472
	1-Woche-Cup	90,91 ± 8,999
	3-Wochen-Cup	99,58 ± 12,70
	5-Wochen-Cup	95,65 ± 6,801
Corpus Callosum	Kontrolle	100,0 ± 12,14
	1-Woche-Cup	363,1 ± 31,55
	3-Wochen-Cup	172,6 ± 26,82
	5-Wochen-Cup	194,3 ± 31,81

Tabelle 33: *Vcam1*-mRNA-Konzentration im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen.

3.2.4 Induktion der *Tnfrsf1a*-mRNA-Expression im Cuprizone-Modell

Abschließend wurde die Expression der *Tnfrsf1a*-mRNA nach einer Cuprizone-Intoxikation untersucht. Wie in Abbildung 30 dargestellt, kam es im Kortex (Cx) nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation zu einer signifikanten Zunahme der *Tnfrsf1a*-mRNA-Konzentration. Nach 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation nahm die Konzentration von *Tnfrsf1a*-mRNA im Kortex ab. Im *Corpus Callosum* (CC) war eine Zunahme der *Tnfrsf1a*-mRNA-Konzentration nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation zu beobachten. Nach 3 Wochen Cuprizone-Intoxikation nahm die

Tnfrsf1a-mRNA-Konzentration ab. In der 5-Wochen-Cup-Gruppe wurde eine weitere signifikante Zunahme der *Tnfrsf1a*-mRNA-Konzentration festgestellt.

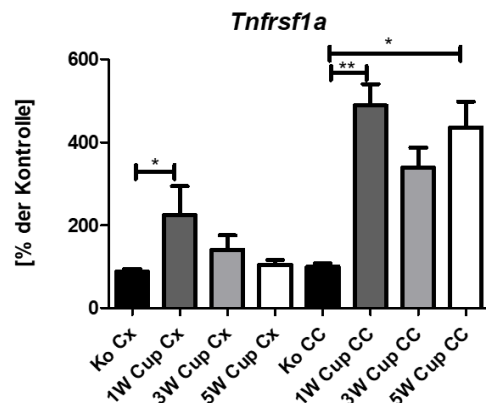


Abbildung 30: *Tnfrsf1a*-mRNA-Quantifizierung im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche- (1W Cup), 3-Wochen- (3W Cup) und 5-Wochen- (5W Cup) Cuprizone-Mäusen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des One-way-ANOVA-Tests und Dunn's-Post-hoc-Tests ausgewertet; * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Kortex	Kontrolle	88,68± 6,532
	1-Woche-Cup	225,4± 68,96
	3-Wochen-Cup	141,3± 34,46
	5-Wochen-Cup	105,3± 11,69
Corpus Callosum	Kontrolle	100,0± 8,475
	1-Woche-Cup	489,0± 51,50
	3-Wochen-Cup	339,5± 47,78
	5-Wochen-Cup	436,2± 61,95

Tabelle 34: *Tnfrsf1a*-mRNA-Konzentration im Kortex (Cx) und *Corpus Callosum* (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen.

Im Rahmen der RT-rtPCR-Analysen konnten wir zeigen, dass eine Cuprizone-Intoxikation zu einer Zunahme der *C-Myc*-, *Stat3*-, *Vcam1*- und *Tnfrsf1a*- mRNA-Expression im *Corpus Callosum* führt. Diese auf der mRNA-Ebene erhobenen Daten bestätigen unsere immunhistochemischen Ergebnisse, die eine vergleichbare Induktion der C-MYC-, STAT3-, VCAM1- und TNFRSF1A-Proteinexpression zeigten. Zusammenfassend konnte verdeutlicht werden, dass intrinsische ZNS-Prozesse, wie die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung, unabhängig von einer T-Zell-Reaktivität zu einer Expressionsinduktion immunrelevanter Gene führen.

3.3 Erhöhte Expression von C-MYC und STAT3 im LPC-Modell

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Expression der Proteine C-MYC, STAT3, VCAM1 und TNFRSF1A im Cuprizone-Modell induziert wird. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese Beobachtung auch in anderen Demyelinisierungsmodellen zu finden ist. Dafür wurde die Proteinexpression im Lysophosphatidylcholin-Modell (LPC-Modell) untersucht. Das Membrandetergens LPC wurde stereotaktisch beidseitig ins mediale *Corpus Callosum* injiziert, wo es eine lokale Demyelinisierung verursachte. Diese Demyelinisierung konnte durch die LFB/PAS-Färbung dargestellt werden. Wie in Abbildung 31b dargestellt, war das *Corpus Callosum* der LPC-behandelten Mäuse (LPC) fast vollständig demyelinisiert. Im Gegensatz dazu war bei den Kontrollmäusen (Ko) das *Corpus Callosum* noch myelinisiert

(Abb. **31a**). Der Demyelinisierungsgrad im *Corpus Callosum* der Gehirnschnitte wurde verblindet ausgewertet. Eine vollständige Myelinisierung wurde mit 100 % und eine vollständige Demyelinisierung mit 0 % gewertet (Kontrolle: n = 10; $98,00 \pm 0,82$; LPC: n = 9; $8,89 \pm 2,98$).

Wir haben uns dazu entschieden, die weiteren Untersuchungen mit den zwei Proteinen C-MYC und STAT3 weiterzuführen, da diese die eindeutigsten Färbemuster aufwiesen. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen wurde die Expression von C-MYC und STAT3 im LPC-Modell untersucht. Als ROI wurde das mediale *Corpus Callosum* definiert.

3.3.1 Eine LPC-induzierte Demyelinisierung führt zu einer Zunahme der C-MYC-Proteinexpression

Bei der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC an Kontrollmäusen gab es kaum C-MYC-positive Zellen im medialen *Corpus Callosum* (Abb. **31c**). Im Gegensatz dazu wurde bei der LPC-behandelten Gruppe eine starke Zunahme der Anzahl C-MYC-positiver Zellen im medialen *Corpus Callosum* beobachtet (Abb. **31d**). Die positiven Zellen hatten ein deutlich nukleäres Färbemuster (Abb. **31d'**). Die C-MYC-positiven Zellen wurden im medialen *Corpus Callosum* quantifiziert (Abb. **32**). Die Anzahl der C-MYC-positiven Zellen wurde im Verhältnis zur Fläche des medialen *Corpus Callosum* berechnet. Wie in Abbildung **32** dargestellt, war die LPC-induzierte Zunahme der C-MYC-positiven Zellen signifikant (Kontrolle: n = 5; $2,14 \pm 1,34$; LPC: n = 9; $405,3 \pm 39,23$).

Um die Spezifität der Färbung zu überprüfen, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde der anti-C-MYC-Antikörper durch Ziegenserum ersetzt. Wie in Abbildung **33a** gezeigt, waren keine positiven Zellen in der Negativkontrolle zu finden. Im medialen *Corpus Callosum* des anti-C-MYC-gefärbten Schnittes war eine hohe Anzahl C-MYC-positiver Zellen zu sehen (Abb. **33b**). Des Weiteren wurde eine Isotypkontrolle angefertigt. Dabei wurde der spezifische Primärantikörper durch einen unspezifischen Primärantikörper ersetzt. Letzterer stammte vom selben Wirt wie der spezifische Primärantikörper und hatte dieselbe schwere Immunglobulinkette, war aber nicht gegen das untersuchte Antigen gerichtet. Wie in Abbildung **34a** dargestellt, war auch die Isotypkontrolle frei von positiven Zellen.

3.3.2 Eine LPC-induzierte Demyelinisierung führt zu einer Zunahme der STAT3-Proteinexpression

Analog zur anti-C-MYC-Färbung waren auch bei der anti-STAT3-Färbung in der Kontrollmaus keine STAT3-positiven Zellen im medialen *Corpus Callosum* erkennbar (Abb. **31c**). Nach einer LPC-induzierten Demyelinisierung war eine Zunahme der Anzahl STAT3-positiver

Zellen im medialen *Corpus Callosum* zu sehen (Abb. **31d**). Die STAT3-positiven Zellen hatten, wie auch im Cuprizone-Modell beschrieben, ein nukleäres Färbemuster (Abb. **31f**).

Die STAT3-positiven Zellen wurden im medialen *Corpus Callosum* quantifiziert. Die Anzahl der STAT3-positiven Zellen wurde im Verhältnis zur Fläche des medialen *Corpus Callosum* berechnet. Wie in der Abbildung **32** dargestellt, kam es nach einer LPC-induzierten Demyelinisierung zu einer Zunahme der Anzahl STAT3-positiver Zellen. Die Zunahme der Zellzahl in der LPC-behandelten Gruppe war signifikant (Kontrolle: n = 5; $13,05 \pm 11,84$; LPC: n = 9; $295,0 \pm 29,88$).

Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle angefertigt, um die Spezifität der Färbung für STAT3 zu überprüfen. Dafür wurde der anti-STAT3-Antikörper durch Ziegenserum ersetzt. In der Negativkontrolle waren keine positiven Zellen zu sehen (Abb. **33c**). Diese Beobachtung bestätigte die Spezifität der anti-STAT3-immunhistochemischen Färbung.

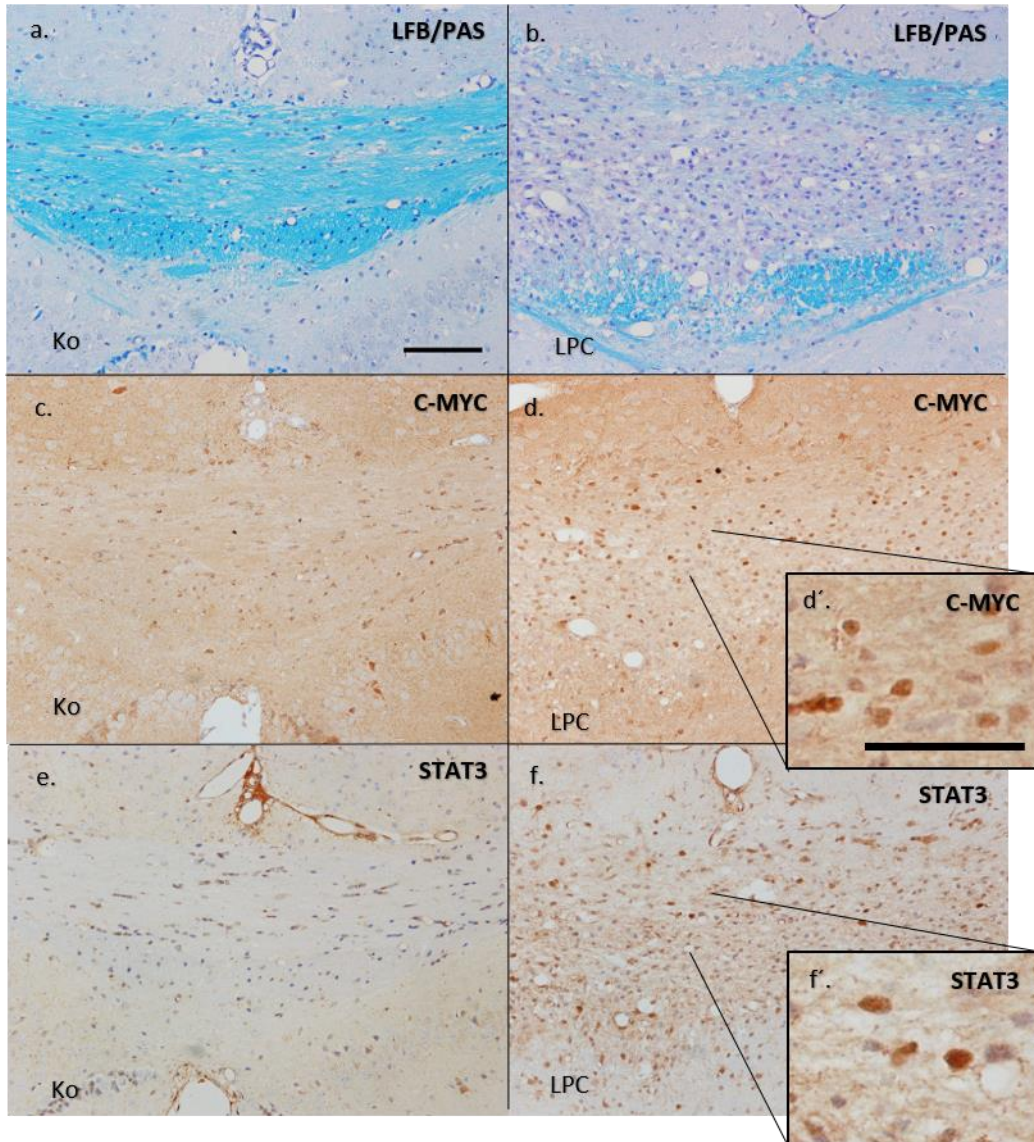


Abbildung 31: Darstellung der Demyelinisierung und der Expressionsinduktion immunrelevanter Proteine im LPC-Modell. (a) zeigt ein repräsentatives Bild der LFB/PAS-Färbung an einer Kontrollmaus (Ko). Das mediale *Corpus Callosum* (mCC) ist vollständig myelinisiert. **(b)** zeigt ein repräsentatives Bild der LFB/PAS-Färbung im mCC einer LPC-behandelten Maus (LPC). Es ist eine deutliche Demyelinisierung zu erkennen. **(c)** zeigt die immunhistochemische Färbung gegen C-MYC im mCC einer Kontrollmaus. Es sind kaum C-MYC-positive Zellen zu sehen. **(d)** zeigt die immunhistochemische Färbung gegen C-MYC im mCC einer LPC-Maus. Es ist eine hohe Anzahl C-MYC-positiver Zellen im mCC zu sehen. Die C-MYC-positiven Zellen haben ein nukleäres Färbemuster, dargestellt in der höheren Vergrößerung in **d'**. **(e)** zeigt die immunhistochemische Färbung gegen STAT3 im mCC einer Kontrollmaus. Es sind kaum STAT3-positive Zellen erkennbar. **(f)** zeigt die immunhistochemische Färbung gegen STAT3 im mCC einer LPC-Maus. Eine hohe Anzahl STAT3-positiver Zellen ist erkennbar. In der höheren Vergrößerung **f'** sind STAT3-positive Zellen mit einem nukleären Färbemuster zu sehen. Maßstab 100 µm (**a-f**), Maßstab 50 µm (**d', f'**).

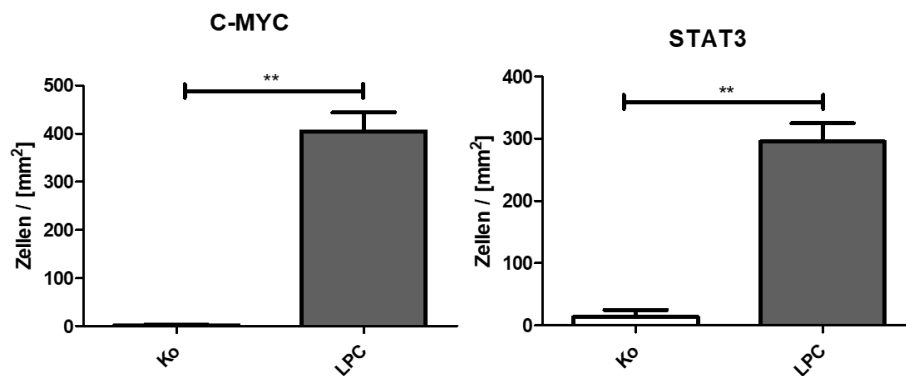


Abbildung 32: Quantifizierung der C-MYC- und STAT3- positiven Zellen im *medialen Corpus Callosum* (mCC) bei Kontroll- (Ko) und LPC-Mäusen (LPC). Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ausgewertet; *p < 0,5; **p < 0,01 und ***p < 0,001.

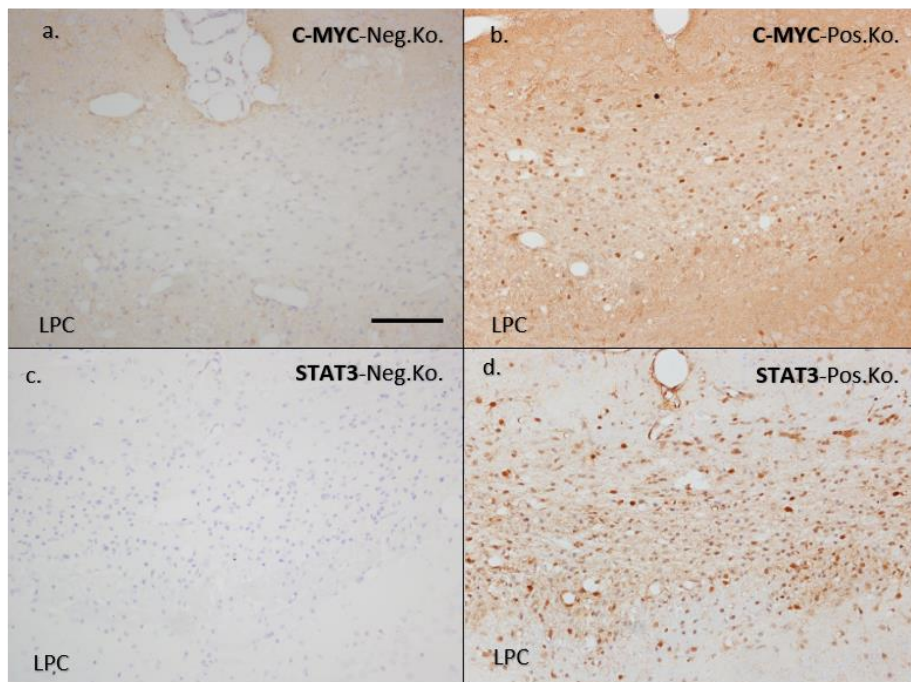


Abbildung 33: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC und STAT3 im *medialen Corpus Callosum* (mCC) von LPC-Mäusen. (a) zeigt die Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC im mCC einer LPC-Maus (LPC). Im Gegensatz zum anti-C-MYC-angefärbten Schnitt (b) sind in der Negativkontrolle keine positiven Zellen zu sehen. (c) zeigt die Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3 im mCC einer LPC-Maus. Es sind keine STAT3-positiven Zellen erkennbar. Maßstab 100 µm (a–d).

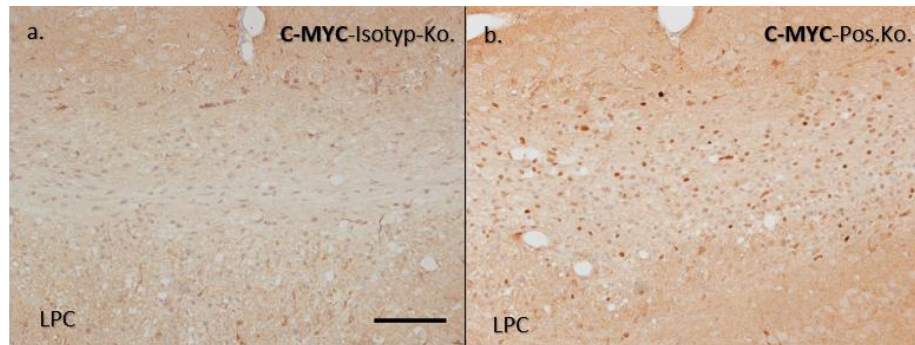


Abbildung 34: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC im medialen Corpus Callosum (mCC) von LPC-Mäusen. (a) zeigt die Isotypkontrolle der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC im mCC einer LPC-Maus (LPC). Im Gegensatz zum anti-C-MYC-gefärbten Schnitt **(b)** sind in der Isotypkontrolle keine C-MYC-positiven Zellen zu sehen. Maßstab 100 µm **(a, b)**.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Expression der untersuchten Proteine in zwei unterschiedlichen Demyelinisierungsmodellen, im Cuprizone- und im LPC-Modell, induziert wird. Bei beiden Modellen kommt es durch eine Zytodegeneration der Oligodendrozyten zu einer Demyelinisierung; das periphere Immunsystem ist dabei nicht beteiligt. Entsprechend wird auch die Expression von C-MYC und STAT3 ohne die Einwirkung des peripheren Immunsystems induziert.

3.4 Expression von C-MYC und STAT3 in Gliazellen

Wir konnten bisher zeigen, dass die Expression der Proteine C-MYC und STAT3 in zwei rein zytodegenerativen Demyelinisierungsmodellen induziert wird. Als Nächstes stellten wir uns die Frage, in welchen gehirnintrinsischen Zellen diese Proteine im ZNS exprimiert werden. Während der akuten Demyelinisierung findet eine Gliazellaktivierung statt. Es kommt zu einer Zunahme der Anzahl und einer morphologischen Änderung von Mikroglia und Astrozyten. Die beschriebenen Versuche haben gezeigt, dass die C-MYC- und STAT3- Proteinexpression während der akuten Demyelinisierung induziert wird. Deshalb haben wir im nächsten Schritt untersucht, ob diese Proteine von Gliazellen exprimiert werden. Dafür wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt. Mittels dieser kann die Expression mehrerer Proteine an einem Schnitt untersucht werden. Die Sekundärantikörper, die die Proteine sichtbar machen, leuchten in unterschiedlichen Farben. So kann gleichzeitig die Lokalisation mehrerer Proteine verglichen werden. Wir haben uns dazu entschieden, zur Beantwortung dieser Fragestellung 5-Wochen-Cup-Mäuse (n = 4) zu verwenden, da nach der 5-wöchigen Cuprizone-Behandlung eine starke Mikrogliose und Astrogliose beobachtet wird.

3.4.1 C-MYC-Expression in Mikroglia

Im ersten Schritt wurde untersucht, in welchen Zellen C-MYC exprimiert wird. Dafür wurde eine Doppelfärbung gegen C-MYC und gegen Gliazellmarkern durchgeführt. Der erste Gliazellmarker, der untersucht wurde, war IBA1 (Ionisiertes Kalzium-bindendes

Adaptormolekül 1, engl. Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1). Er ist ein Marker für Mikroglia sowie Makrophagen und ist essenziell für die Ausübung ihrer Funktionen, wie Zellmigration und Phagozytose. Dementsprechend wird seine Expression im Rahmen einer Mikroglia-Aktivierung induziert [137]. Wie in Abbildung 35 dargestellt, war bei der Doppelfärbung gegen C-MYC und IBA1 eine Kolokalisation von C-MYC- und IBA1-positiven Zellen zu sehen. C-MYC-positive Zellen hatten ein nukleäres Färbemuster und waren hauptsächlich im medialen *Corpus Callosum* (mCC) lokalisiert. IBA1-positive Zellen hatten ein zytoplasmatisches Färbemuster. Sie kamen sowohl im Kortex als auch im *Corpus Callosum* vor. In Letzterem war ihre Anzahl deutlich höher als im Kortex.

Für die Auswertung dieser Färbung wurden die C-MYC-, die IBA1- und die doppelpositiven Zellen im mCC quantifiziert (n=4; C-MYC-positive Zellen = $212,4 \pm 129,7$; IBA1-positive Zellen = $239,4 \pm 107,1$; C-MYC/IBA1-doppelpositive Zellen = $18,2 \pm 9,6$; (Anzahl von Mäusen pro Gruppe; Mittelwert [Zellen/mm²] \pm SEM)). Anschließend wurde das Verhältnis der doppelpositiven Zellen zur Anzahl aller C-MYC-positiven Zellen berechnet. Die Anzahl der doppelpositiven Zellen betrug 8,58 % aller C-MYC-positiven Zellen (Abb. 35d). Außerdem wurde das Verhältnis der doppelpositiven Zellen zur Anzahl aller IBA1-positiven Zellen ermittelt. Die Anzahl der doppelpositiven Zellen betrug 7,61 % aller IBA1-positiven Zellen (Abb. 35e).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob C-MYC auch in anderen Gliazellen exprimiert wird. Dafür wurde eine Doppelfärbung gegen C-MYC und GFAP durchgeführt. GFAP (Saures Gliafaserprotein, engl. Glial Fibrillary Acidic Protein) ist ein Marker für Astrozyten. Er ist an einer Vielzahl von zellulären Funktionen beteiligt, zum Beispiel Zellmigration, Proliferation, synaptische Plastizität, Myelinisierung und Bildung der Blut-Hirn-Schranke [138]. GFAP-positive Zellen ließen sich zytoplasmatisch anfärben. Sie lagen sowohl im Kortex als auch im *Corpus Callosum*. Wie die Abbildung 36a repräsentativ zeigt, konnte keine Kolokalisation von C-MYC- und GFAP-positiven Zellen festgestellt werden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob C-MYC in Oligodendrozyten exprimiert wird. Dafür wurde der Oligodendrozytenmarker OLIG2 verwendet. Dieser ist ein Transkriptionsfaktor und ist dementsprechend nukleär lokalisiert. Er reguliert die Migration und Differenzierung der Oligodendrozyten [139]. Bei der Doppelfärbung gegen C-MYC und OLIG2 konnte, wie in Abbildung 36b dargestellt, keine Kolokalisation der C-MYC- und OLIG2-positiven Zellen beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass C-MYC in Mikroglia jedoch nicht in Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert wird. Die niedrige Kolokalisationsrate zwischen

C-MYC- und IBA1-positiven Zellen gibt jedoch Hinweise, dass C-MYC auch in anderen Zellpopulationen im ZNS exprimiert wird.

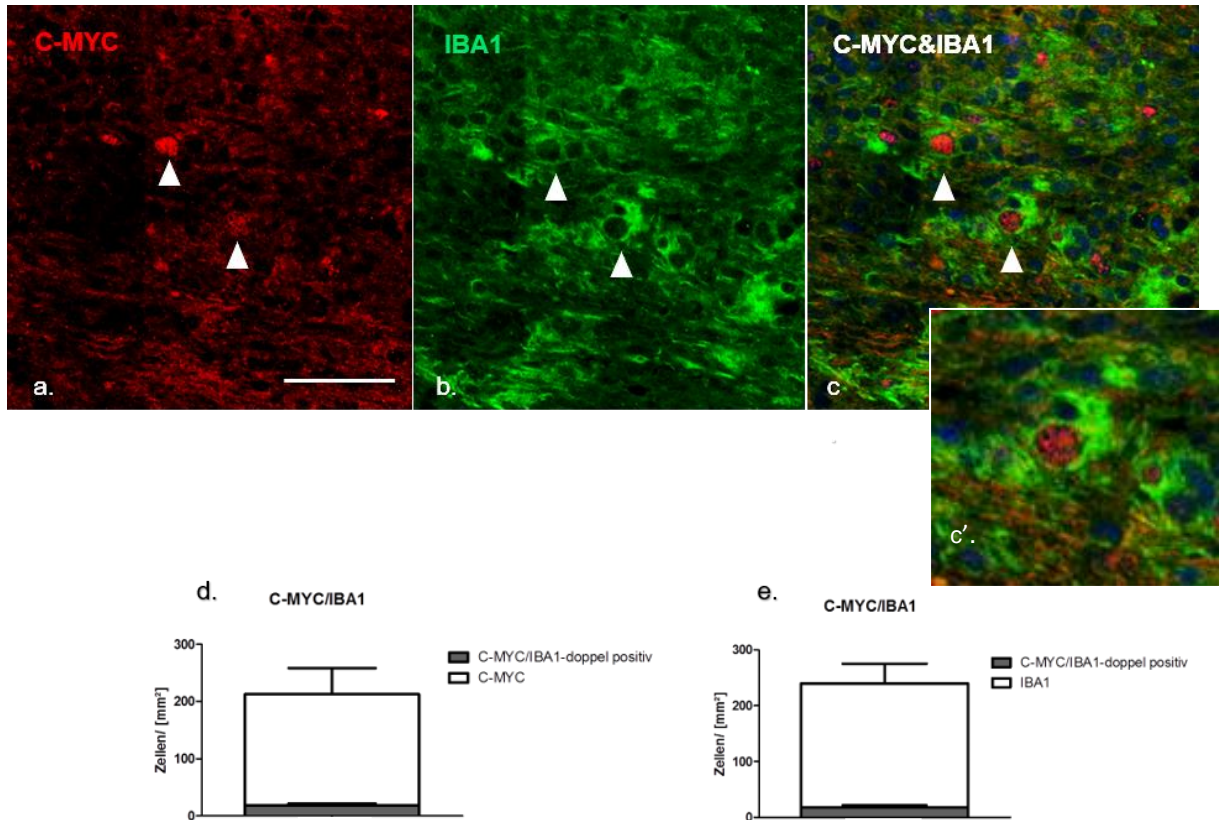


Abbildung 35: C-MYC wird in IBA1-positiven Mikroglia exprimiert. (a–c) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen C-MYC und dem Mikroglia-Marker IBA1 im medialen *Corpus Callosum* (mCC) einer 5-Wochen-Cup-Maus. In der Vergrößerung (c') ist eine Kolo-kalisation von einer C-MYC- und einer IBA1-positiven Zelle zu erkennen. (d) Quantifizierung der C-MYC/IBA1-doppelpositiven Zellen im Verhältnis zur Anzahl der C-MYC-positiven Zellen im mCC. (e) Quantifizierung der C-MYC/IBA1-doppelpositiven Zellen im Verhältnis zur Anzahl der IBA1-positiven Zellen im mCC. Maßstab 50 µm (a–c, c').

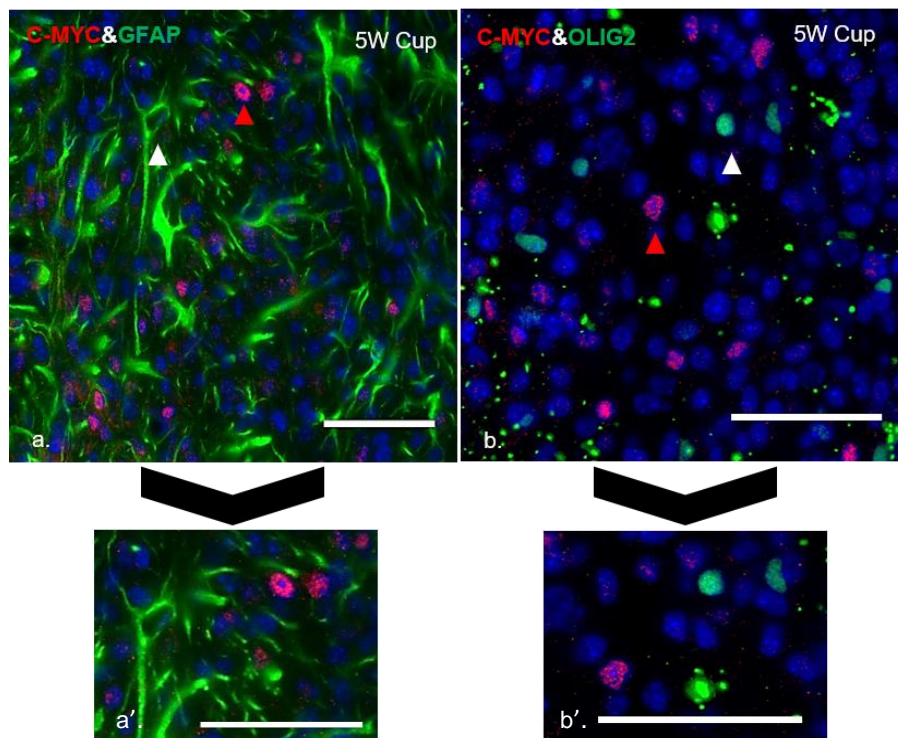


Abbildung 36: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen C-MYC und Gliazellmarker im *Corpus Callosum* von 5-Wochen-Cup-Mäusen (5W Cup). (a) zeigt die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen C-MYC und GFAP-positiven-Astrozyten. (weißer Pfeil markiert einen GFAP-positiven Astrozyt, roter Pfeil markiert eine C-MYC-positive Zelle). (a') zeigt eine höhere Vergrößerung von (a). (b) zeigt die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen C-MYC und OLIG2-positive Oligodendrozyten. In (b') ist die Vergrößerung zu sehen (weißer Pfeil markiert einen OLIG2-positiven Oligodendrozyt, roter Pfeil markiert eine C-MYC-positive Zelle). C-MYC wird weder in Astrozyten noch in Oligodendrozyten exprimiert. Maßstab 50 μ m (a, b).

3.4.2 STAT3-Expression in Astrozyten

Als Nächstes wurde untersucht, in welchen Zellen STAT3 exprimiert wird. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen STAT3 und den Astrozyten-Marker GFAP durchgeführt. Die Expression von GFAP wird bei Aktivierung der Astrozyten induziert. GFAP ist sowohl im Kortex als auch im *Corpus Callosum* lokalisiert und weist ein zytoplasmatisches Färbemuster auf. Die Anzahl STAT3-positiver Zellen ist in den Kontrollmäusen gering. Nach einer Cuprizone-Intoxikation wird die STAT3-Expression induziert. STAT3 wird hauptsächlich im *Corpus Callosum* exprimiert. Im aktiven Zustand weist STAT3 ein nukleäres Färbemuster auf. Wie in Abbildung 37 dargestellt, gab es eine häufige Kollokalisierung von STAT3- und GFAP-positiven Zellen. Zur Quantifizierung wurden die STAT3-, die GFAP- und die doppelpositiven Zellen im medialen *Corpus Callosum* gezählt ($n = 4$; STAT3-positive Zellen = $229,5 \pm 82,7$; GFAP-positive Zelle = $273,1 \pm 109,1$; STAT3/GFAP-doppelpositive Zellen = $97,5 \pm 47,6$). Die Kollokalisierung von STAT3-positiven Zellen und GFAP-positiven Astrozyten betrug 42,48 % aller STAT3-positiven Zellen (Abb. 37d). Die Anzahl der doppelpositiven Zellen betrug 35,70 % aller GFAP-positiven Zellen (Abb. 37e).

Anschließend wurde das Ergebnis der STAT3/GFAP-Doppelfärbung auch bei einer Einfachfärbung gegen STAT3 an GFAP-EGFP-positiven-Mäusen überprüft. GFAP-EGFP-positiv-Mäuse sind genmanipulierte Mäuse, bei denen die GFAP-positiven Zellen mit dem grün fluoreszierenden Protein EGFP (engl. Enhanced Green Fluorescent Protein) markiert sind und dementsprechend grün leuchten [131]. Bei der Einfachfärbung gegen STAT3 an GFAP-EGFP-positiven-Mäusen wurde beobachtet, dass STAT3-positive Zellen sowohl in den Kontrollmäusen als auch in den 5-Wochen-Cup-Mäusen vorhanden waren. Außerdem wurden STAT3-positive Zellen im Kortex und im *Corpus Callosum* lokalisiert. Wie in Abbildung 38 dargestellt, konnte eine geringe Kolo-kalisation von STAT3-positiven Zellen und EGFP-markierten Astrozyten festgestellt werden. Da die Merkmale der STAT3-positiven Zellen in dieser Färbung nicht mit den in den chromogenen Färbungen beobachteten Merkmalen der STAT3-positiven Zellen übereinstimmen, haben wir diese Färbung als unspezifisch bewertet.

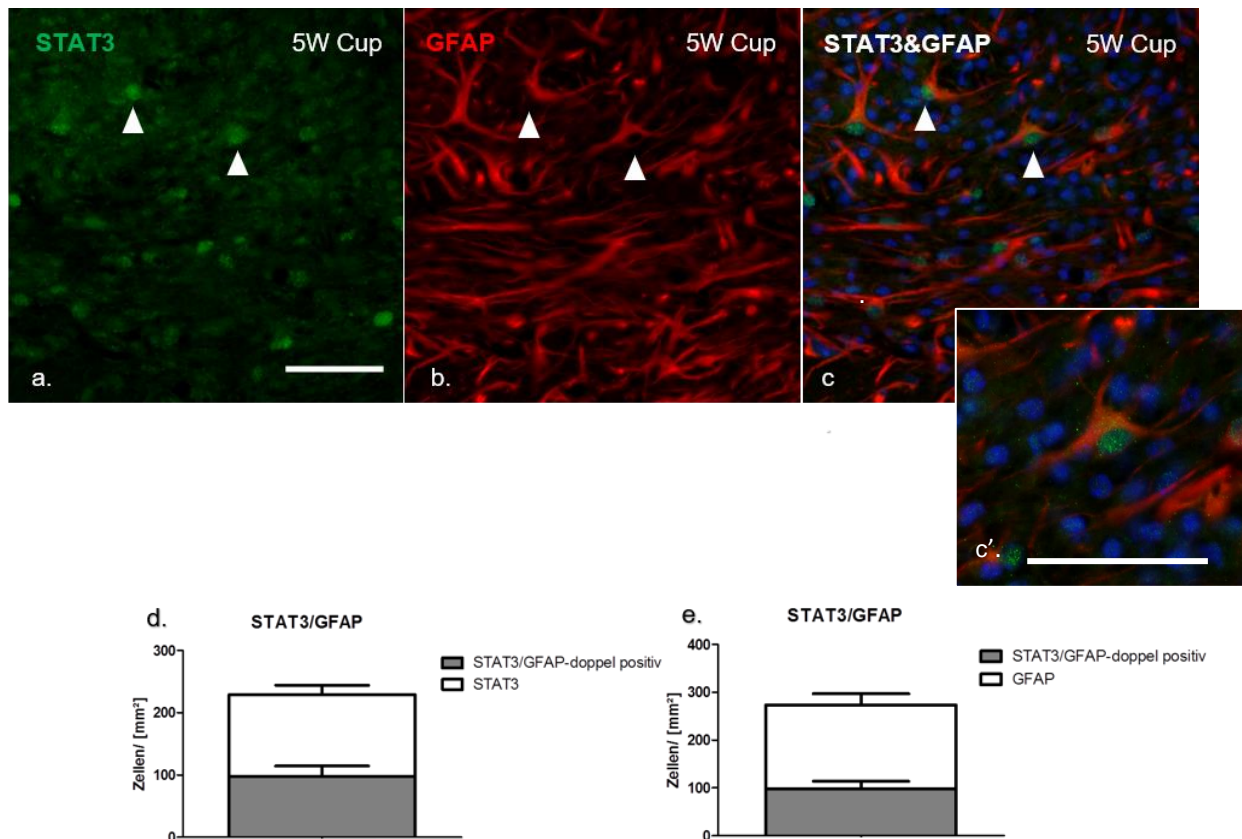


Abbildung 37: STAT3 wird in GFAP-positiven Astrozyten exprimiert. (a–c) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen STAT3 und den Astrozyten-Marker GFAP an 5-Wochen-Cup-Mäusen (5W Cup). Es ist eine Kolo-kalisation von STAT3- und GFAP-positiven Zellen im medialen *Corpus Callosum* (mCC) zu sehen. In der Vergrößerung (c') ist eine Kolo-kalisation von einer STAT3- und einer GFAP-positiven Zelle zu erkennen. **(d)** Quantifizierung der STAT3/GFAP-doppelpositiven Zellen im Verhältnis zur Anzahl der STAT3-positiven Zellen im mCC. **(e)** Quantifizierung der STAT3/GFAP-doppelpositiven Zellen im Verhältnis zur Anzahl der GFAP-positiven Zellen im mCC. Maßstab 50 μm (a–c, c').

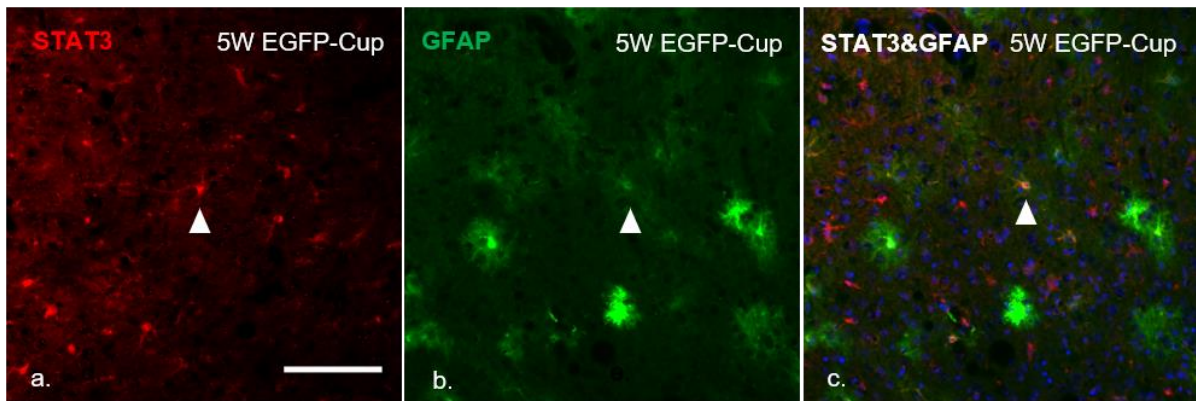


Abbildung 38: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen STAT3 und den Astrozyten-Marker GFAP an 5-Wochen mit Cuprizone-behandelten GFAP-EGFP-positiven-Mäusen (5W EGFP-Cup). Es ist eine geringe Kolokalisation von STAT3 und EGFP-markierten GFAP-positiven Astrozyten im *Corpus Callosum* zu sehen. Maßstab 100 µm (a-c).

Zusammenfassend konnte anhand von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen gezeigt werden, dass zwei immunrelevante Proteine, C-MYC und STAT3, auch in Gliazellen exprimiert werden, und zwar C-MYC in Mikroglia und STAT3 in Astrozyten.

3.5 Expression von C-MYC und STAT3 in peripheren Immunzellen im Cup/EAE-Modell

Das Cup/EAE-Modell ist eine Kombination des nichtautoimmunen Demyelinisierungsmodells Cuprizone-Modell, und der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), die eine inflammatorische Demyelinisierung induziert. Dieses Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe entwickelt; es kombiniert gehirnintrinsische Prozesse mit einer peripheren Immunzellrekrutierung. Dabei wurden die Mäuse für drei Wochen mit 0,25 % Cuprizone gefüttert, anschließend zwei Wochen mit normaler Nahrung gefüttert und zu Beginn der sechsten Woche mit MOG₃₅₋₅₅ (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein₃₅₋₅₅) immunisiert (Cup/EAE-Mäuse). Die Immunisierung mit dem ZNS-assoziierten Antigen MOG₃₅₋₅₅ löst eine Autoimmunreaktion aus und verursacht daraufhin eine Rekrutierung von peripheren Immunzellen, hauptsächlich T-Zellen sowie Makrophagen, von den lymphatischen Organen in das ZNS. Die Einwanderung der Immunzellen findet in den perivaskulären Regionen des ZNS statt und führt zur Bildung perivaskulärer Läsionen [31]. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass diese perivaskuläre Läsionen Entzündungsinfiltrate darstellen, die vor allem CD3⁺ Lymphozyten (T-Zellen) sowie IBA1⁺ Makrophagen beinhalten [65]. Im EAE-Modell sind diese perivaskulären Läsionen im Rückenmark, im Kleinhirn und im *Nervus opticus* lokalisiert. Im Cup/EAE-Modell sind diese Läsionen auch im Großhirn zu finden [31].

Die Expression der Transkriptionsfaktoren C-MYC und STAT3 wird im Rahmen von Immunreaktionen induziert. Im nächsten Schritt dieses Projektes untersuchten wir, ob diese Proteine auch in Zellen der perivaskulären Entzündungsinfiltraten exprimiert werden. Dafür

wurden immunhistochemische Färbungen gegen C-MYC und STAT3 an Cup/EAE-Mäusen durchgeführt (n = 4). Zur Lokalisation der perivaskulären Läsionen wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H&E-Färbung) durchgeführt. Die perivaskulären Läsionen waren daran erkennbar, dass um ein Gefäß herum eine große Ansammlung von Zellen vorlag. Abbildung **39b** zeigt eine perivaskuläre Läsion im Kortex einer Cup/EAE-Maus. Anschließend wurden immunhistochemische Färbungen gegen C-MYC und STAT3 durchgeführt. Für die anti-C-MYC-, anti-STAT3- und H&E-Färbungen wurden benachbarte Gehirnschnitte verwendet. Somit konnten zuerst auf den H&E-Schnitten die Gefäße lokalisiert werden, bei denen eine Ansammlung von Zellen perivaskulär zu sehen war. Diese Gefäße wurden anschließend an den anti-C-MYC- und den anti-STAT3-gefärbten Schnitten lokalisiert. Die Expression von C-MYC und STAT3 wurde dann in diesen perivaskulären Läsionen an den anti-C-MYC- und den anti-STAT3-gefärbten Schnitten untersucht.

Wie in Abbildung **39c** dargestellt, war eine hohe Anzahl C-MYC-positiver Zellen in den perivaskulären Läsionen erkennbar. Da diese perivaskuläre Läsionen hauptsächlich rekrutierte periphere Immunzellen (T-Zellen und Makrophagen) beinhalten, ließ dies vermuten, dass C-MYC in diesen peripheren Immunzellen exprimiert wird. Im nächsten Schritt wurden die C-MYC-positiven Zellen in den perivaskulären Läsionen quantifiziert. Dafür wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ vier konzentrische Kreise um jedes Gefäß markiert, in denen die C-MYC-positiven Zellen gezählt wurden. Es wurden 33 perivaskuläre Läsionen von vier Mäusen ausgewertet. Wie in Abbildung **39e** dargestellt, nahm die Anzahl der C-MYC-positiven Zellen mit dem Abstand zum Gefäß ab (25 µm: $105,6 \pm 8,89$; 50 µm: $30,62 \pm 3,24$; 75 µm: $22,44 \pm 2,53$; 100 µm: $15,66 \pm 1,64$). Dies wies darauf hin, dass die C-MYC-positiven Zellen vom Gefäß ins ZNS-Gewebe einwandern, wie auch die rekrutierten peripheren Immunzellen im Cup/EAE-Modell. Wie in Abbildung **39d** dargestellt, war eine hohe Anzahl STAT3-positiver Zellen in den perivaskulären Läsionen zu finden. Dies wies darauf hin, dass STAT3 ebenfalls in rekrutierten peripheren Zellen exprimiert wird. Wie der Abbildung **39d** zu entnehmen ist, hatten die STAT3-positiven Zellen ein schwer abgrenzbares Färbemuster. Es wurde eine diffuse anti-STAT3-Immunreaktivität beobachtet, ohne die einzelnen Zellen identifizieren zu können. Deshalb wurde die Anzahl der STAT3-positiven Zellen nicht quantifiziert.

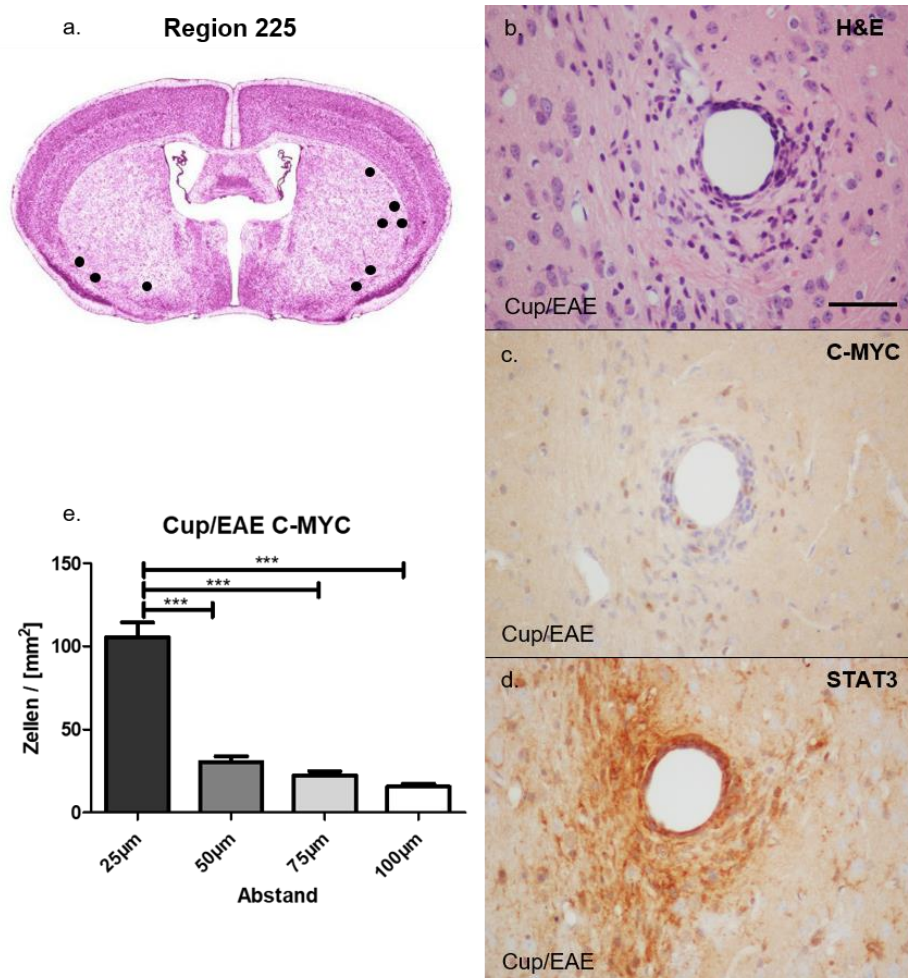


Abbildung 39: C-MYC- und STAT3-Proteinexpression in peripheren Immunzellen. (a) zeigt eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) in Übersicht in der Region 225 [1]. Die Punkte stellen die Lokalisation der perivaskulären Läsionen dar. (b) zeigt eine perivaskuläre Läsion an einem H&E-Schnitt einer Cup/EAE- Maus (Cup/EAE). (c) zeigt die C-MYC-positiven Zellen in einer perivaskulären Läsion einer Cup/EAE-Maus (Cup/EAE). (d) zeigt die anti-STAT3-Immunreaktivität in einer perivaskulären Läsion einer Cup/EAE-Maus. (e) zeigt die Quantifizierung der C-MYC-positiven Zellen in den perivaskulären Läsionen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des One-way ANOVA-Tests und Dunn's Post-hoc-Tests ausgewertet; *p < 0,5, **p < 0,01 und ***p < 0,001. Maßstab 50 µm (b–d).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob STAT3 in CD3-positiven Lymphozyten exprimiert wird. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen STAT3 und CD3 durchgeführt. In dieser Doppelfärbung konnte keine Kolokalisation von STAT3- und CD3-positiven Zellen festgestellt werden (Abb. 40).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl C-MYC als auch STAT3 in peripheren Immunzellen, am ehesten T-Zellen und Makrophagen, exprimiert werden. STAT3 wird nicht in CD3-positiven Lymphozyten exprimiert.

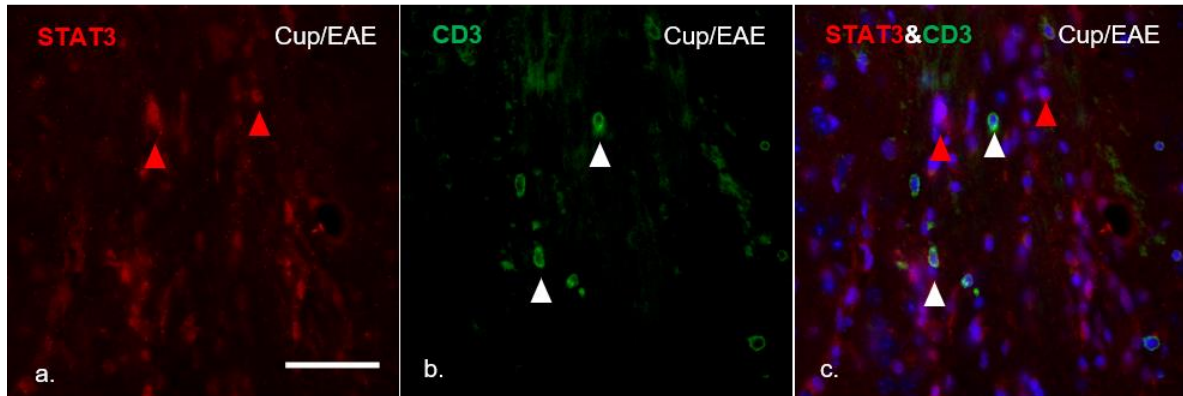


Abbildung 40: (a–c) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen STAT3 und CD3 an Cuprizone-EAE-Mäusen (Cup/EAE). Es ist keine Kolokalisation von STAT3- und CD3-positiven Zellen im *Corpus Callosum* zu sehen. Die roten Pfeile zeigen STAT3-positive Zellen. Die weißen Pfeile zeigen CD3-positive Zellen. Maßstab 50 µm (a–c).

3.6 mRNA-Expression von *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1A* in aktivierten Astrozyten

Astrozyten bilden die größte Gliazellpopulation im ZNS. Sie sind zuständig für die Ernährung, Regeneration und Stützfunktion der Neuronen im ZNS und modulieren die Blut-Hirn-Schranke sowie die interneuronale Signalübertragung [140]. Des Weiteren sind sie bedeutsame Faktoren der MS-Pathogenese. In den bisher beschriebenen Versuchen dieser Arbeit wurde erforscht, wie sich die Expression der immunrelevanten Genen *C-Myc*-, *Stat3*-, *Vcam1*- und *Tnfrsf1A* und der entsprechenden Proteinen C-MYC, STAT3, VCAM1 und TNFRSF1A nach einer Cuprizone-induzierten Demyelinisierung verändert. Im nächsten Schritt haben wir untersucht, ob diese Gene in aktivierten Astrozyten exprimiert werden.

Dafür wurde eine primäre Astrozytenkultur verwendet. Diese wurde in drei Gruppen aufgeteilt. In der ersten wurden die Astrozyten nicht stimuliert (Kontrolle), die Astrozyten der zweiten Gruppe wurden mit Interferon- γ (IFN γ) stimuliert und die dritte Astrozytengruppe wurde mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert.

Von den primären Astrozytenkulturen wurde anschließend die mRNA isoliert. Nachdem diese mittels einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wurde, wurden RT-rtPCRs für die Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* durchgeführt. Als Haushaltsgen wurde *18S* benutzt. Wie in Abbildung 41a gezeigt wird, war die mRNA-Konzentration von *18S* in allen untersuchten Gruppen annähernd konstant (Kontrolle: n = 6; $16,57 \pm 1,53$; IFN: n = 6; $16,11 \pm 0,65$; LPS: n = 6; $15,79 \pm 1,81$).

Die RT-rtPCR zum Nachweis der *C-Myc*-mRNA zeigte keine Zunahme der *C-Myc*-mRNA-Konzentration in den stimulierten Astrozyten (Kontrolle: n=6; $100 \pm 5,76$; IFN: n=6; $90,27 \pm 17,81$; LPS: n=6; $122,4 \pm 9,28$). Bei der RT-rtPCR zum Nachweis der *Stat3*-mRNA in

Astrozyten wurde eine signifikante Zunahme der mRNA-Konzentration in der IFN γ -stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Kontrolle: n = 6; $100 \pm 9,52$; IFN: n = 6; $229,4 \pm 39,95$; LPS: n=6; $170,9 \pm 25,63$; Abb. **41c**). Wie in Abbildung **41d** gezeigt wird, war eine signifikante Zunahme der *Vcam1*-mRNA-Konzentration in Astrozyten nach einer LPS-Stimulation zu sehen (Kontrolle: n = 6; $100 \pm 5,91$; IFN: n = 6; $598,6 \pm 36,79$; LPS: n=6; $1864 \pm 151,6$). In der RT-rtPCR zum Nachweis der *Tnfrsf1a*-mRNA war erkennbar, dass die Konzentration von *Tnfrsf1a*-mRNA nach der IFN γ -Stimulation signifikant zunahm (Kontrolle: n = 6; $100 \pm 11,39$; IFN: n = 6; $192,9 \pm 15,14$; LPS: n=6; $116,9 \pm 12,34$; Abb. **41e**).

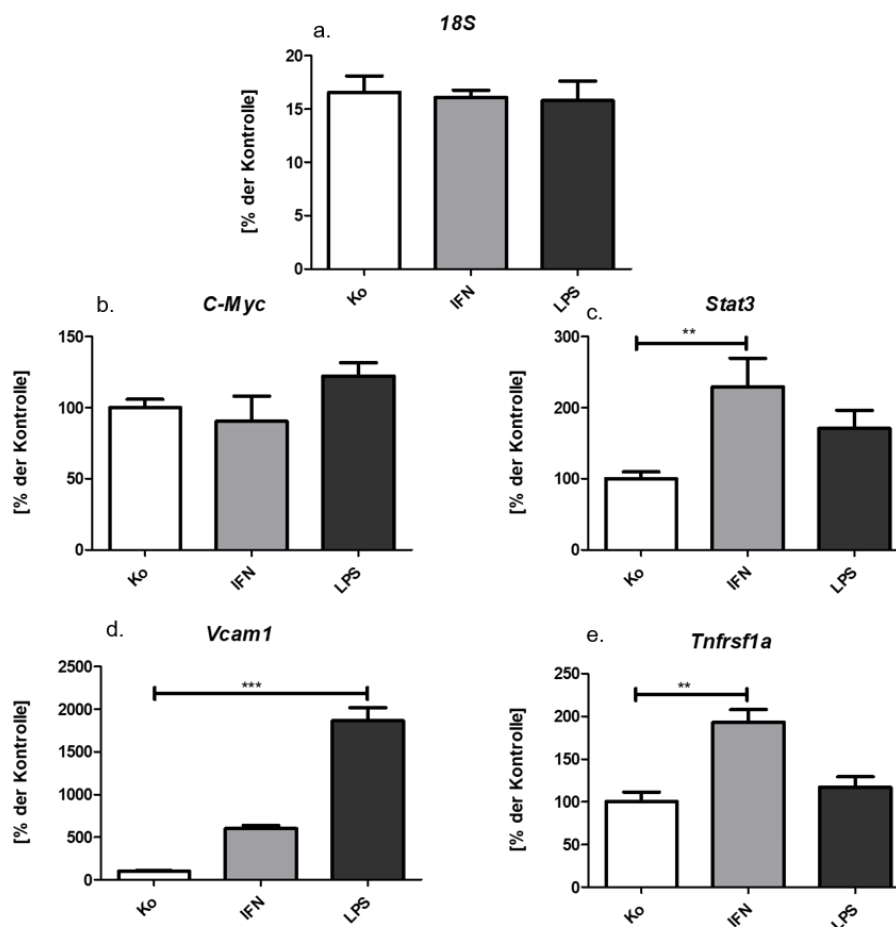


Abbildung 41: mRNA-Expression immunrelevanter Gene in stimulierten Astrozyten. (a) zeigt die mRNA-Quantifizierung des Haushaltsgens 18S. (b) zeigt die mRNA-Quantifizierung von *C-Myc*. (c) zeigt die mRNA-Quantifizierung von *Stat3*. (d) zeigt die mRNA-Quantifizierung von *Vcam1*. (e) zeigt die mRNA-Quantifizierung von *Tnfrsf1a*. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des One-way-ANOVA-Tests und Dunn's-Post-hoc-Tests ausgewertet; *p < 0,5; **p < 0,01 und ***p < 0,001.

Zur Überprüfung der Reinheit der primären Astrozytenkultur wurden immunhistochemische Färbungen gegen GFAP und IBA1 durchgeführt. Wir konnten feststellen, dass die Astrozytenkulturen hauptsächlich aus GFAP-positiven Astrozyten bestanden (Abb. **42a**). Wie in Abbildung **42b** dargestellt, war nur eine geringe Anzahl IBA1-positiver Mikroglia vorhanden.

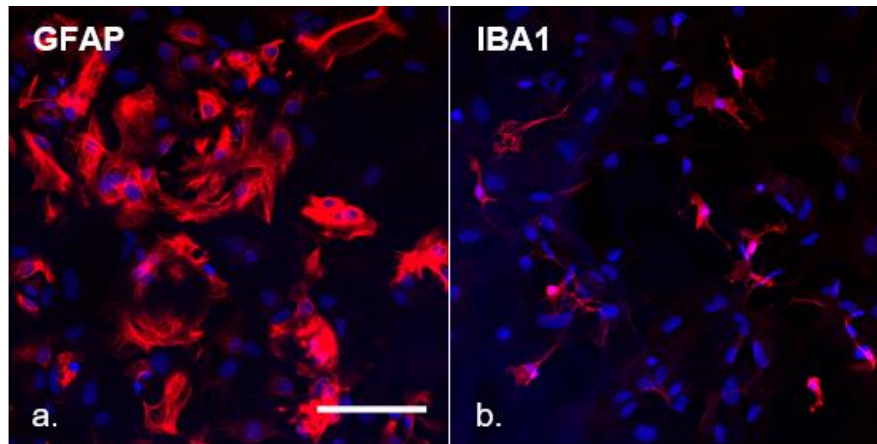


Abbildung 42: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung gegen GFAP und IBA1 an einer primären Astrozytenkultur. (a) zeigt die GFAP-positiven Astrozyten. (b) zeigt die IBA1-positiven Mikroglia. Maßstab 100 µm.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von Astrozyten zu einer Expressionsinduktion von *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* führt. Dementsprechend werden die untersuchten immunrelevanten Gene, mit Ausnahme von *C-Myc*, auch in aktivierten Astrozyten exprimiert.

4. Diskussion

4.1 MS-Pathogenese

Die MS ist die häufigste neuroinflammatorische, demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Histopathologisch findet man im ZNS von MS-Patienten Entmarkungsherde begleitet von Oligodendrozytenapoptose, Astrogliose und Mikrogliose. Zudem sind perivaskuläre inflammatorische Infiltrate lokalisierbar [62]. Diese Merkmale zeichnen die inflammatorische Komponente der Erkrankung aus. Neben dieser gibt es auch eine neurodegenerative Komponente. Histologisch wird diese in einem neuronalen Schaden widergespiegelt. Dieser führt zu einer kortikalen sowie spinalen ZNS-Atrophie, die sich als Progression der MS-Klinik manifestiert [141, 142]. Das Ausmaß der spinalen Atrophie korreliert mit dem Ausmaß der Immobilität der Patienten [143].

Die aktuelle MS-Medikation ist überwiegend gegen das Immunsystem gerichtet [144]. Als Schubtherapie werden Kortikosteroide eingesetzt, die eine antiinflammatorische Wirkung haben [145]. Als Zweitlinientherapie kann eine Apherese in Betracht gezogen werden [22]. Die verlaufsmodifizierende Therapie besteht unter anderem aus Interferon β , das die inflammatorische Reaktion reguliert und die Anzahl der rekrutierten Lymphozyten reduziert, Natalizumab, das die periphere Immunzellrekrutierung verhindert und die Anzahl an MRT-sichtbaren Läsionen reduziert und Glatirameracetat, das immunmodulatorisch wirkt [146]. Zudem werden die CD20-Antikörper (Ocrelizumab, Rituximab) eingesetzt, die sowohl bei der RRMS auch bei der PPMS eine Anwendung finden. Diese sind gegen das CD20-Molekül der B-Zellen gerichtet, sodass dadurch eine gezielte Depletion der CD20-exprimierenden B-Zellen erreicht werden kann, ohne die humorale Immunantwort stark einzuschränken [23, 147]. Die Medikamente, die in der verlaufsmodifizierenden Therapie eingesetzt werden, reduzieren die Häufigkeit von MS-Schüben und die Bildung von inflammatorischen Infiltraten. Sie haben aber keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die neurodegenerative Progression der Erkrankung [148, 149]. Auch die CD20-Antikörper, welche bei der PPMS eingesetzt werden, haben einen moderaten Effekt auf die Progression der Erkrankung, was eventuell durch die neurodegenerative Komponente der MS-Pathogenese erklärbar ist [23]. Eine Ausnahme stellt der Sphingosin-1 Phosphat (S1P)-Rezeptor Modulator, Siponimod, welcher bei Patienten mit SPMS verabreicht wird und das Fortschreiten der Behinderung teilweise aufhält [22, 150]. Es bleibt daher notwendig, an der Entwicklung von weiteren Medikamenten zu forschen, die die Progression und damit auch die fortlaufende klinische Beeinträchtigung der MS-Patienten hemmen. Dafür müsste jedoch zunächst die Pathogenese der Erkrankung geklärt werden.

Es sind zwei Hypothesen beschrieben, die die MS-Pathogenese erklären [151]. Gemäß der ‚Outside-in‘-Hypothese wird die MS-Pathogenese durch eine Dysregulation des peripheren Immunsystems hervorgerufen. Die Lymphozyten gelangen durch die zerstörte Blut-Hirn-

Schranke in das ZNS und lösen eine inflammatorische Reaktion aus [146]. Dort greifen sie das Myelin an und verursachen eine Demyelinisierung. Im Rahmen von GWAS wurde gezeigt, dass über 200 Gene mit der MS-Pathogenese assoziiert sind [26]. Die Mehrheit dieser Gene ist an Prozessen des Immunsystems beteiligt, unter ihnen befinden sich auch *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* [27]. Forscher vermuten, dass durch Varianten dieser Gene das Immunsystem von MS-Patienten in seiner regelhaften Funktion gestört ist. Gehäufte Varianten in immunregulatorischen Genen werden als Argument zur Stützung der ‚Outside-in‘-Hypothese herangezogen. Auch die Umweltfaktoren, die als Risikofaktoren für die Entwicklung einer MS gelten, wie EBV-Virus, Rauchen und Vitamin D-Mangel, beeinflussen hauptsächlich die Funktion des adaptiven Immunsystems [152]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass laut der ‚Outside-in‘-Hypothese die Pathogenese durch die Dysregulation des Immunsystems hervorgerufen wird. Sekundär kommt es zu einer Aktivierung der Gliazellen und zu neuronalen Schäden.

Im Gegensatz zur ‚Outside-in‘-Hypothese steht die ‚Inside-out‘-Hypothese, laut der die Pathogenese primär im ZNS stattfindet. Zunächst kommt es zu einer Oligodendrozytenapoptose und einer Gliazellaktivierung. Sekundär findet eine periphere Immunzellrekrutierung statt [152]. Henderson et al. haben frische MS-Läsionen beschrieben, bei denen keine Plasmazellen und kaum Lymphozyten vorhanden waren [153]. Die Abwesenheit von Immunzellen bei der Bildung neuer MS-Läsionen weist darauf hin, dass das Immunsystem keine primäre Rolle in der Bildung von MS-Läsionen spielt. Die Beobachtung, dass axonale Schäden auch in Abwesenheit von inflammatorischen Infiltraten vorhanden sind, stützt zudem die ‚Inside-out‘-Hypothese [144]. Außerdem wurden bis heute keine Unterschiede bezüglich der Anzahl und des Phänotyps von gegen Myelin-Antigenen gerichteten T-Zellen zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden gefunden. Würde man veränderte oder mehr T-Zellen bei MS-Patienten finden, wäre dies ein Hinweis auf eine Dysregulation der T-Zellen und somit des erworbenen Immunsystems [152]. Casanova et al haben gezeigt, dass eine autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation nur bei der RRMS erfolgreich ist. Bei Patienten mit SPMS schreitet die Symptomatik trotz der Stammzelltransplantation weiter fort [154]. Wäre eine Dysregulation des Immunsystems für die MS-Pathogenese verantwortlich, würde eine Stammzelltransplantation das Fortschreiten der Krankheit aufhalten. Diese Beobachtung weist dementsprechend zusätzlichen darauf hin, dass das Immunsystem eine untergeordnete Rolle bei der MS-Pathogenese spielt. Im Gegensatz dazu hält, das bei der SPMS eingesetzte Medikament Siponimod, die Krankheitsprogression zum Teil auf. Es wird behauptet, dass dies teilweise durch den Effekt von Siponimod auf die neurodegenerativen Prozesse erklärbar ist. Wie schon beschrieben, ist Siponimod ein S1P-Rezeptor-Modulator. S1P spielt eine wichtige Rolle in der vaskulären

Homöostase sowie der Regulation des Immunsystems und der Blut-Hirn-Schranke [155, 156]. Die S1P-Rezeptoren werden unter anderem in Lymphozyten, Endothelzellen und Gliazellen exprimiert. Siponimod führt zu einer Internalisierung des S1P-Rezeptors und hemmt damit die Wirkung von S1P. Es verhindert den Austritt von Lymphozyten aus den Lymphknoten und führt damit zu einer Immunsuppression [155]. Jedoch wird behauptet, dass Siponimod neben der immunomodulatorischen Wirkung auch einen neuroprotektiven Effekt hat [157, 158]. Gemäß Gentile et al. führt die intrazerebroventrikuläre Verabreichung von Siponimod in einem murinen EAE-Modell zu einer Reduktion der Astrogliose und Mikrogliose und zu einer Verlangsamung der Krankheitsprogression [159]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Siponimod remyelinisierungsfördernd wirken kann [160, 161]. Colombo et al. konnten in einem in-vitro- Experiment zeigen, dass die Behandlung von Astrozyten mit Siponimod zu einer Expressionsinduktion antiinflammatorischer und einer Herunterregulierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren in den Astrozyten führt. Somit wird über die Funktion der Astrozyten ein neuroprotektiver Effekt erreicht [162]. Zusammenfassend weisen all diese Beobachtungen darauf hin, dass Siponimod über eine Wirkung auf die Gliazellen die Neurodegeneration teilweise aufhalten kann.

4.1.1 Die Rolle von C-MYC, STAT3, VCAM1 und TNFRSF1A in der neurodegenerativen Komponente der MS-Pathogenese

In diesem Projekt wurden die Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* in verschiedenen MS-Modellen untersucht. Im Rahmen von GWAS wurde gezeigt, dass diese Gene mit der MS-Pathogenese assoziiert sind.

Unsere Arbeitsgruppe konnte durch Gene-Array-Analysen an Mäusen bereits zeigen, dass die mRNA-Expression der vier untersuchten Gene nach einer Cuprizone-Intoxikation induziert wird [128]. Diese Beobachtung konnten wir in diesem Projekt auf der Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbungen an Cuprizone-intoxikierten Mäusen bestätigen. Wir haben eine erhöhte Expression der Proteine nach einer Cuprizone-Intoxikation beobachtet. Das Cuprizone-Modell ist ein rein zytodegeneratives Modell, bei dem die Blut-Hirn-Schranke intakt bleibt und dementsprechend die Entmarkungsläsionen ohne den Einfluss von peripheren Immunzellen entstehen [57, 163]. Somit wird die Expressionsinduktion dieser Proteine im Cuprizone-Modell ohne die Beteiligung des peripheren Immunsystems hervorgerufen. Stimulus für die Expressionsinduktion dieser Gene könnten gehirnintrinsische Prozesse, zum Beispiel eine Gliazellaktivierung, sein. Diese Annahme stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass die Gliazellen nach einer Cuprizone-Intoxikation stimuliert werden und somit die Expression von elementaren Proteinen in diesen Zellen induziert wird.

Bei den immunhistochemischen Färbungen gegen C-MYC und STAT3 war in den Kontroll- und 1-Woche-Cup-Mäusen ein schwaches perinukleäres Färbemuster zu sehen. In den 3-

und 5-Wochen-Cup-Mäusen war ein starkes nukleäres Färbemuster zu erkennen. Die Tatsache, dass beide Proteine, C-MYC und STAT3, Transkriptionsfaktoren sind, könnte diese Beobachtung erklären. Transkriptionsfaktoren befinden sich nämlich im inaktiven Zustand im Zytoplasma und werden nach einer Aktivierung in den Nukleus transportiert, um dort die Genexpression zu regulieren. Die Stimulation von STAT3 erfolgt über extrazelluläre Zytokine, die über die Rezeptor-assoziierte Tyrosin Kinase, Janus-Kinase, zu einer Dimerisierung von STAT3 im Zytoplasma führen. Diese Dimere werden anschließend in den Nukleus transportiert [164]. Die Expression von C-MYC und STAT3 war nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation am höchsten. Nach einer fünfwöchigen Cuprizone-Intoxikation nahm die Expression dieser Proteine wieder ab. Die Expression von VCAM1 war erst nach fünf Wochen am höchsten. TNFRSF1A-positive Zellen wiesen kein eindeutiges zelluläres Färbemuster auf, was eine Quantifizierung der Zellzahl erschwerte. Trotzdem war der Unterschied der TNFRSF1A-Expression zwischen Kontrollmäusen und Mäusen nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation deutlich. In zukünftigen Projekten könnte die TNFRSF1A-Expression mit weiteren Quantifizierungsmethoden untersucht werden. Man könnte zum Beispiel durch densitometrische Methoden die Unterschiede der Intensität der Immunreaktivität zwischen den verschiedenen Gruppen quantifizieren und somit Rückschlüsse auf die Expression der Proteine ziehen.

Die durch RT-rtPCR auf mRNA-Ebene erhobenen Daten bestätigen unsere immunhistochemischen Ergebnisse. In den immunhistochemischen Färbungen konnten wir eine Expressionsinduktion der Proteine C-MYC-, STAT3-, VCAM1- und TNFRSF1A sehen. Entsprechend zeigte sich in den RT-rtPCR eine Expressionsinduktion der Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1A*. Die mRNA-Quantifizierung verdeutlichte, dass die mRNA-Konzentration der vier untersuchten Gene in den 1-Woche-Cup-Mäusen am höchsten war. Da die mRNA-Bildung Voraussetzung für die Proteinexpression ist, ist es nachvollziehbar, dass die Induktion auf mRNA-Ebene nach einer kürzeren Intoxikationszeit auftritt und die Proteinexpression erst nach einiger Zeit ihr Maximum erreicht. In diesem Zeitintervall wird die mRNA translatiert und die Proteine werden synthetisiert. Das Zeitintervall zwischen RNA- und Proteinsynthese beträgt einige Minuten bis Stunden [165]. In diesem Projekt wurde anhand der RT-rtPCR-Analysen beobachtet, dass die mRNA-Expression von *C-Myc* und *Stat3* nach einer Woche Cuprizone-Intoxikation am höchsten war und ab der dritten Woche abnahm. Die immunhistochemischen Analysen zeigten jedoch, dass die Expression der entsprechenden Proteine erst nach drei Wochen Cuprizone-Intoxikation am stärksten war. Dementsprechend lässt sich diese Latenz dadurch nicht erklären. Erwähnenswert ist jedoch, dass in diesen Versuchen die mRNA- und die Proteinexpression nach 2 Wochen Cuprizone-Behandlung nicht untersucht wurden. Demzufolge können wir nicht ausschließen, dass die Proteinexpression

nach zwei Wochen Cuprizone-Behandlung ihren maximalen Wert erreichte und eventuell in der dritten Cup-Woche schon abnahm. Das würde bedeuten, dass die Latenz zwischen mRNA- und Proteinexpression geringer ist und könnte diese scheinbar widersprüchlichen Beobachtungen erklären. Um diese Problematik dementsprechend besser beurteilen zu können, sollten die mRNA- und Proteinexpression bei einer zweiwöchigen mit Cuprizone behandelten Mäusegruppe untersucht werden. Auch die Tatsache, dass die VCAM1-Proteinexpression nach fünf Cup-Wochen die höchsten Werte erreichte, obwohl die *Vcam1*-mRNA nach einer Woche Cuprizone-Intoxikation am höchsten war, kann nicht eindeutig erklärt werden. Man könnte deswegen die Expression dieser Gene mit weiteren Methoden untersuchen und sie mit den vorherigen Ergebnissen vergleichen. Eine mögliche Methode ist die In-situ-Hybridisierung, bei der die entsprechende mRNA eines Gens auf Gewebeschnitten dargestellt werden kann. Dadurch könnte geprüft werden, ob die Ergebnisse der RT-rtPCR mit denen der In-situ-Hybridisierung übereinstimmen.

Des Weiteren konnten wir in diesem Projekt zeigen, dass diese Gene auch in anderen toxischen Demyelinisierungsmodellen erhöht exprimiert werden. Die Proteinexpression von C-MYC und STAT3 wurde auch in den LPC-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe induziert. Im LPC-Modell findet primär eine lokale Demyelinisierung statt. Sekundär kommt es zu einer erhöhten Immunreaktivität mit einer peripheren Immunzellrekrutierung [71, 78].

Anhand unserer Experimente konnten wir darlegen, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren C-MYC und STAT3 an zwei unterschiedlichen MS-Modellen, dem Cuprizone- und dem LPC-Modell, induziert wird. Dies weist auf eine mögliche Beteiligung dieser Transkriptionsfaktoren an der MS-Pathogenese hin. Im nächsten Schritt haben wir untersucht, in welchen Zellen des ZNS C-MYC und STAT3 exprimiert werden. Durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen konnten wir nachweisen, dass STAT3 in GFAP-positiven Astrozyten und C-MYC in IBA1-positiven Mikroglia exprimiert werden. Die Beobachtung, dass STAT3 in Astrozyten exprimiert wird, stimmt mit vorherigen Studienergebnissen überein [166, 167]. Weitere Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass STAT3 auch in Mikroglia exprimiert wird [166]. Diese Resultate sollten in zukünftigen Projekten zum Beispiel mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen gegen STAT3 und den Mikroglia-Marker IBA1 überprüft werden. Die Expression von C-MYC in Mikroglia wird auch in der Datenbank von Zhang et al. bestätigt [168]. Die Kollokalisierung von C-MYC-positiven Zellen und IBA1-positiven Mikroglia betrug allerdings nur 7,61 % aller IBA1-positiven Mikroglia. Man könnte in weiteren Projekten eine Kollokalisierung von C-MYC-positiven Zellen mit anderen Mikroglia-Markern untersuchen. Ein Beispiel wäre das Transmembranprotein 19 (TMEM119), ein Marker, der im Gegensatz zu IBA1 nur in Mikroglia und nicht in Makrophagen

exprimiert wird [169]. In unseren Experimenten wurde keine Kollokalisierung von C-MYC-positiven Zellen, weder mit GFAP-positiven Astrozyten noch mit OLIG2-positiven Oligodendrozyten, festgestellt. Die Frage, in welchen weiteren Zellen C-MYC exprimiert wird, bleibt somit unbeantwortet. Laut Magri et al. wird C-MYC in proliferierenden Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimiert [170]. Die Differenzierung dieser Zellen zu reifen Oligodendrozyten geht mit einer Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors C-MYC einher. Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass eine Inhibierung des C-MYC die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen fördert. Diese Inhibierung war aber nicht ausreichend, um eine vollständige Reifung der Oligodendrozyten hervorzurufen. Die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen im *Corpus Callosum* beginnt in den ersten Wochen nach einer Cuprizone-induzierten Demyelinisierung und erreicht nach drei bis vier Wochen ihr Maximum [171, 172]. Dieser Verlauf korreliert mit der beschriebenen C-MYC-Proteinexpression beim Cuprizone-Modell. In Anbetracht dessen könnte die Beobachtung von Magri et al. die Expressionsinduktion von C-MYC im Cuprizone-Modell erklären. Es bleibt allerdings ungeklärt, warum bei der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen C-MYC und OLIG2 keine Kollokalisierung feststellbar war. Da OLIG2 ein Marker der Oligodendrozytenvorläuferzellen und der reifen Oligodendrozyten ist, würde man eine Kollokalisierung von C-MYC- und OLIG2-positiven Zellen erwarten [173]. In zukünftigen Projekten könnte diese Kollokalisierung mit anderen Markern erforscht werden, die spezifischer für Oligodendrozytenvorläuferzellen sind. Des Weiteren könnte die Expression von C-MYC in einer Oligodendrozytenvorläuferzellkultur untersucht werden. Sollte die Inhibierung von C-MYC eine Differenzierung zu reifen Oligodendrozyten fördern, könnte eine medikamentöse Inaktivierung von C-MYC zum Beispiel durch *stapled peptides* positive Wirkungen auf die Remyelinisierungsprozesse in MS-Läsionen haben. *Stapled peptides* sind zellgängige Moleküle, die intrazellulär Protein-Protein-Interaktionen regulieren können [174]. Dementsprechend könnten sie auch die Wirkungen des Transkriptionsfaktors C-MYC inhibieren. Die genauere Erforschung der Funktion von C-MYC ist daher von hoher Bedeutung.

4.1.2 Die Rolle von C-MYC und STAT3 in der inflammatorischen Komponente der MS-Pathogenese

Im vorliegenden Projekt wurde die Expression von C-MYC und STAT3 auch im Cup/EAE-Modell untersucht. In diesem sind perivaskuläre Infiltrate zu finden, in denen die peripheren Immunzellen, hauptsächlich T-Zellen und Makrophagen, von den Blutgefäßen in das ZNS wandern [31]. Wir konnten zeigen, dass C-MYC und STAT3 in den perivaskulären Infiltraten verstärkt exprimiert werden. Das deutet darauf hin, dass diese Proteine in peripheren Immunzellen exprimiert werden und bei deren Rekrutierung in das ZNS von Bedeutung sind.

Diese Annahme stimmt mit vorherigen Studienergebnissen überein, da diese Proteine als Immunzell-assoziierte Proteine beschrieben wurden [11]. Es wurde weiter untersucht, ob STAT3 in CD3-positiven T-Lymphozyten exprimiert wird. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien konnten wir keine Kolo-kalisation zwischen STAT3- und CD3-positiven Zellen finden [166]. Daher bleibt aktuell die Frage offen, in welchen peripheren Immunzellen, C-MYC und STAT3 exprimiert werden.

4.1.3 Ausblick

Zusammenfassend konnte in diesem Projekt anhand unterschiedlicher MS-Modelle gezeigt werden, dass die untersuchten Gene, *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a*, sowohl in peripheren Immunzellen als auch in Gliazellen exprimiert werden. Werden diese Gene in Gliazellen exprimiert, könnten die häufig beobachteten Varianten dieser Gene zu einer Dysregulation der Gliazellen führen, die der Ursprung der MS-Pathogenese sein könnte. Die Störung der regelhaften Funktion von Gliazellen könnte in einer Aktivierung dieser Zellen resultieren, wie sie auch histopathologisch in den MS-Läsionen zu finden ist. Die Dysregulation und die Störung des regelhaften Milieus im ZNS könnten als Stimulus für die sekundäre Rekrutierung von peripheren Immunzellen in das ZNS fungieren. Diese Annahme stimmt auch mit den Studienergebnissen von Scheld et al. überein, die zeigen konnten, dass gehirnintrinsische Prozesse im ZNS die Rekrutierung von Leukozyten und somit die Bildung von inflammatorischen Läsionen hervorrufen können [31]. Somit wird die ‚Inside-out‘-Hypothese gestützt.

Des Weiteren sollte in zukünftigen Projekten die Funktion dieser Gene untersucht werden, um somit eine bessere Vorstellung davon zu bekommen, welche Prozesse durch die Varianten betroffen sind. Dafür könnte man Knock-out-Mäuse benutzen. Diese Mäuse entstehen durch eine genetische Manipulation in embryonalen Stammzellen. Dadurch werden bestimmte Gene inaktiviert. Durch Vergleich der Knock-out- und der Kontrollmäuse könnten die Unterschiede in der Genexpression und die klinische Symptomatik zwischen den zwei Mäusegruppen untersucht werden. Außerdem könnte man durch spezifische Inhibition der untersuchten Proteine deren Funktion genauer erforschen. Ein Beispiel dafür ist Stattic, ein Molekül, das spezifisch STAT3 inaktivieren kann [175]. Ein weiteres Verfahren zur Erforschung der Proteinfunktion ist die Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden. Diese sind einzelsträngige Nukleinsäuresequenzen, die komplementär zur mRNA des Zielgens sind. Durch eine komplementäre Bindung an die mRNA wird die Expression des Zielgens inhibiert [176].

4.2 Die Astrozyten in der MS-Pathogenese

Astrozyten bilden die größte Gliazellpopulation im ZNS. Ihre Rolle in der MS-Pathogenese ist noch nicht eindeutig geklärt. Sie spielen eine bedeutende Rolle in der Induktion der inflammatorischen Reaktion in den MS-Läsionen. Durch eine Sekretion des Chemokins MCP-1 induzieren sie eine Immunzellrekrutierung [37, 177, 178]. Des Weiteren regulieren sie die Invasion der peripheren Immunzellen in das ZNS, indem sie die Adhäsion dieser Zellen an postkapillären Venolen ermöglichen [179]. Zudem induzieren sie die Zytokinsynthese in den T-Lymphozyten [48].

In den bisherigen Studien wurden sowohl positive als auch negative Auswirkungen einer Astroglie in der Progression von ZNS-Läsionen beschrieben. Die Frage, ob eine Astroglie zur MS-Pathogenese beiträgt oder erst reaktiv nach der Demyelinisierung entsteht, bleibt jedoch noch unbeantwortet. Parratt und Prineas haben Läsionen von Neuromyelitis optica (NMO) - Patienten untersucht. NMO ist eine demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die sich hauptsächlich im Nervus opticus und im Rückenmark manifestiert. Sie konnten anhand von NMO-Läsionen zeigen, dass ein Verlust von Astrozyten vor der Demyelinisierung von Axonen stattfindet [180]. Auch Sharma et al. haben gezeigt, dass eine Dysregulation von Astrozyten einer Demyelinisierung vorausgeht [40]. Weiterhin haben Blakemore et al. gezeigt, dass das Vorhandensein von Astrozyten in einer demyelinisierten Läsion die Remyelinisierung durch Oligodendrozytenvorläuferzellen verhindert [181]. Laut Robinson et al. könnte eine astrozytäre Narbe diese Remyelinisierung verhindern. Aus den Ergebnissen dieser Forschungsgruppe kann abgeleitet werden, dass Astrozyten die axonalen Schäden in MS-Läsionen vorantreiben. Mit der Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies schädigen sie die neuronalen Mitochondrien und verursachen eine Dysregulation des neuronalen Metabolismus [39]. Auch Wang et al. konnten durch die Untersuchung von Läsionen in einem EAE-Modell eine Assoziation zwischen dem Ausmaß von axonalen Schäden und einer reaktiven Astroglie zeigen [182].

Im Gegensatz dazu wird den Astrozyten aber auch eine remyelinisierungsfördernde Funktion zugeschrieben. Laut Faulkner et al. haben Astrozyten eine essenzielle Funktion in der Regeneration des ZNS-Gewebes nach einer Rückenmarksverletzung [183]. Das Fehlen von reaktiven Astrozyten nach einer Rückenmarksverletzung führt zu einer aggravierten inflammatorischen Reaktion, einer verstärkten Demyelinisierung und einer gestörten Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke. Laut Williams et al. sezernieren reaktive Astrozyten in MS-Läsionen Chemokine, mit denen sie Oligodendrozytenvorläuferzellen rekrutieren [43]. Des Weiteren haben Talbott et al. in ihrer Arbeit gezeigt, dass eine Remyelinisierung durch Oligodendrozytenvorläuferzellen nur bei Vorhandensein von Astrozyten möglich ist [184]. Wie in der Übersichtsarbeit von Cregg et al. beschrieben, bilden

Astrozyten nach einer Läsion im ZNS eine Glianarbe, die eine Verbreiterung der Inflammation in das umgebende gesunde Gewebe verhindert, aber gleichzeitig auch die Regeneration des Gewebes erschwert [185]. Das Verständnis der Rolle von Astrozyten in der MS-Pathogenese ist dementsprechend ein wichtiger Parameter für die Entwicklung von Medikamenten, die eine Progression der Erkrankung aufhalten können.

In diesem Projekt wurde die Expression der Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1A* in einer stimulierten Astrozytenkultur untersucht. Es wurde beobachtet, dass *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* in aktivierten Astrozyten im Vergleich zu nichtstimulierten Astrozyten vermehrt exprimiert werden. Bei der *C-Myc*-Expression wurde kein Unterschied zwischen unbehandelten und stimulierten Astrozyten beobachtet.

4.2.1 Die Rolle von STAT3 in der Funktion von Astrozyten

Die Beobachtung, dass *Stat3* in Astrozyten exprimiert wird, stimmt mit den Ergebnissen dieses Projektes im Cuprizone-Modell überein. Durch die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen konnten wir nachweisen, dass STAT3-positive Zellen mit GFAP-positiven Astrozyten kolokalisiert sind. Diese Annahme wird auch durch weitere Forschungsgruppen belegt [186]. In den Experimenten von Gautron et al. und Liu et al. wurde die Induktion der *Stat3*-Expression in Astrozyten nach einer LPS-Stimulation bestätigt [187, 188]. Wie Ceyzeriat et al. in ihrer Übersichtsarbeit beschrieben haben, ist STAT3 ein relevanter Induktor der astrozytären Reaktivität nach einer ZNS-Läsion [189]. Die essenzielle Rolle von STAT3 in Astrozyten haben auch Herrmann et al. in ihren Experimenten dargestellt. Sie zeigten, dass Astrozyten, denen das *Stat3*-Gen fehlt, in ihren Funktionen beeinträchtigt sind. Die Merkmale einer Astroglie, wie die Hypertrophie der Zellen und die Bildung von Glianarben nach einer Rückenmarksverletzung, waren in diesen mutierten Astrozyten nur in eingeschränktem Maße zu sehen [190, 191]. Auch Oliva et al. konnten anhand eines Schädel-Hirn-Trauma-Modells zeigen, dass ein solches Trauma die Aktivierung und Expression von *Stat3* in Astrozyten induziert [192]. Angesichts der Tatsache, dass das Fehlen von *Stat3* eine Astroglie verhindert und diese an der MS-Pathogenese beteiligt sein könnte, könnte eine medikamentöse Inaktivierung von STAT3 protektiv in der MS-Pathogenese wirken [193].

4.2.2 Die Rolle von VCAM1 in der Funktion von Astrozyten

Wie von Blakemore beschrieben, werden Astrozyten in der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung stimuliert [56]. In den aktivierten Astrozyten wird dementsprechend die Expression von Proteinen hochreguliert, die an den Demyelinisierungsprozessen beteiligt sind. Unsere Annahme war, dass VCAM1 auch eines dieser Proteine ist. Wir haben beobachtet, dass die Expression von VCAM1 im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation zunimmt. Des Weiteren ist die Morphologie der VCAM1-positiven Zellen ähnlich zur Morphologie der

Astrozyten. Sowohl VCAM1-positive Zellen als auch Astrozyten haben einen großen, hellen Zellkern und lange Fortsätze. Zudem haben wir anhand der Astrozytenkulturen beobachtet, dass die *Vcam1*-mRNA-Expression nach einer Stimulation der Astrozyten induziert wird. Zusammenfassend weisen all diese Beobachtungen darauf hin, dass VCAM1 in stimulierten Astrozyten exprimiert wird. Forschungsergebnisse weiterer Arbeitsgruppen bestätigen die Annahme, dass VCAM1 von Astrozyten exprimiert wird [168, 194, 195]. Rosenmann et al. haben anhand einer humanen Astrozytenkultur gezeigt, dass durch Zytokine stimulierte Astrozyten VCAM1 exprimieren. Die Induktion von VCAM1 wurde vor allem bei der Stimulation der Astrozyten mittels IFN- γ und TNF- α beobachtet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unseres Projektes haben sie aber keine Induktion der VCAM1-Expression bei der Stimulation der Astrozyten mittels LPS beobachtet [196]. In zukünftigen Projekten sollte die Kolo-kalisation von VCAM1-positiven Zellen und Astrozyten mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen untersucht werden.

Laut Miyamoto et al. wird VCAM1 in Oligodendrozyten exprimiert und ist in den Prozessen der Oligodendrozytendifferenzierung sowie der Myelinisierung beteiligt [197]. Diese Behauptung widerspricht aber auf den ersten Blick der Beobachtung, dass die Expression von VCAM1 im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation zunimmt, während der es zu einer Oligodendrozytenapoptose kommt [55, 198]. Somit würde man erwarten, dass die Expression von VCAM1 auch abnimmt, da die Oligodendrozytenanzahl sinkt. Es ist wiederum bekannt, dass zwischen der dritten und fünften Woche einer Cuprizone-Behandlung die Anzahl der Oligodendrozytenvorläuferzellen zunimmt [55, 60]. Die erhöhte VCAM1-Expression könnte sich daher durch die Zunahme an Oligodendrozytenvorläuferzellen erklären lassen. Des Weiteren ist eine teilweise Remyelinisierung nach sechs Wochen Cuprizone-Intoxikation beschrieben [199]. Wenn VCAM1 im Myelinisierungsprozess beteiligt ist, könnte die Zunahme der VCAM1-Expression ein Zeichen einer Remyelinisierung sein. Diese Hypothese sollte in weiteren Experimenten genauer betrachtet werden. Eine Beteiligung von VCAM1 an den Remyelinisierungsprozessen könnte einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt zur Förderung der Remyelinisierung bei MS-Läsionen darstellen.

4.2.3 Die Rolle von TNFRSF1A in der Funktion von Astrozyten

Da TNFRSF1A-positive Zellen in den immunhistochemischen Färbungen dieses Projektes kein klares zelluläres Färbemuster aufwiesen und sie deswegen nicht eindeutig identifizierbar waren, konnten wir anhand der immunhistochemischen Färbungen keine Schlussfolgerungen bezüglich ihrer Morphologie ziehen. Die Ergebnisse der Astrozytenkulturen haben aber gezeigt, dass TNFRSF1A in aktivierten Astrozyten exprimiert wird. Die Expression von TNFRSF1A in Astrozyten wurde auch durch Studienergebnisse anderer Forschungsgruppen belegt [200, 201]. Gimenez et al. haben in ihren Experimenten gezeigt, dass TNFRSF1A

essenziell für die Expression von VCAM1 in Astrozyten ist und somit die Invasion von peripheren Immunzellen in das ZNS reguliert [194]. Infolgedessen könnte eine Inhibierung dieses Rezeptors die Invasion von peripheren Immunzellen in das ZNS steuern. Das *Tnfrsf1a*-Gen scheint auch eine Rolle bei der MS-Pathogenese zu spielen. Im Rahmen von GWAS wurde festgestellt, dass bei MS-Patienten der Einzelnukleotid-Polymorphismus rs1800693 des *Tnfrsf1a* gehäuft auftritt [27]. Bei diesem Polymorphismus wurde das Fehlen von Exon 6 beschrieben. Die Variante verursacht eine strukturelle Veränderung des TNFRSF1A-Proteins mit einer modifizierten extrazellulären Domäne und fehlenden transmembranären und intrazellulären Domänen. Ohne die intrazelluläre Domäne des Proteins ist die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in den intrazellulären Bereich nicht möglich. Somit können die Funktionen von TNFRSF1A, wie die Induktion einer Apoptose, nicht erfolgen. Stattdessen entsteht durch diesen Polymorphismus nur die lösliche Variante des Proteins, die antagonistisch gegen TNF α wirkt. In früheren Studien wurde untersucht, welche Wirkung ein TNF α -Blocker auf die MS-Pathogenese ausübt. Das Ergebnis dieser Medikation war eine Exazerbation der MS-Schübe. Der Mechanismus des Polymorphismus rs1800693 ähnelt dem des TNF α -Blockers – in beiden Fällen wird TNF α inaktiviert. Diese Beobachtung könnte die Exazerbationen unter dieser Medikation erklären [202]. In Einklang mit diesen Beobachtungen stehen auch die Studienergebnisse von Kassiotis und Kollias, die gezeigt haben, dass TNF α auch eine immunsuppressive Rolle einnimmt und relevant für die Einschränkung der Autoimmunität ist. Somit führt eine Inaktivierung dieses Faktors zu einer aggravierten inflammatorischen Reaktion [203]. In Anbetracht all dessen wäre es deshalb eine mögliche Überlegung, den Rezeptor TNFRSF1A zu inaktivieren und somit die Bindung von TNF α an TNFRSF1A zu hemmen und dadurch eine Dysinhibition von TNF α zu erzielen. Die Dysinhibition von TNF α könnte eine gegensätzliche Wirkung zum TNF α -Blocker aufweisen und demnach die Exazerbationsrate senken. Es wurde auch gezeigt, dass eine Inaktivierung von TNFRSF1A die Entwicklung einer EAE hinauszögert und die Symptomatik reduziert [204, 205]. Das gibt einen zusätzlichen Hinweis darauf, dass die Inaktivierung des TNFRSF1A-Rezeptors mittels eines Blockers protektiv in der MS-Pathogenese wirken könnte.

Die Tatsache, dass *C-Myc* nicht in Astrozyten exprimiert wird, stimmt mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen überein, da dort keine Kollokalisierung zwischen GFAP-positiven Astrozyten und C-MYC-positiven Zellen festgestellt wurde.

4.2.4 Limitationen und zukünftige Projekte

Eine Limitierung der In-vitro-Untersuchungen liegt darin begründet, dass die exprimierten Gene von kultivierten Astrozyten nicht 100%ig mit den exprimierten Genen von In-vivo-Astrozyten übereinstimmen. Die Expression dieser Gene könnte in weiteren Experimenten in In-vivo-Astrozyten untersucht und mit den jetzigen Ergebnissen verglichen werden [195].

Erwähnenswert ist zudem, dass in der primären Astrozytenkultur auch einige Mikroglia enthalten waren. Dementsprechend kann eine Expressionsinduktion von Mikroglia nicht komplett ausgeschlossen werden.

In zukünftigen Projekten sollte die Expression der Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1A* auch in Mikrogliaulturen erforscht werden. Gemäß vorherigen Studienergebnissen werden sowohl STAT3 als auch TNFRSF1A in Mikroglia exprimiert [166, 168]. Mit Hilfe einer Mikrogliakultur könnte man diese Annahme überprüfen. Zudem könnte erforscht werden, ob die Ergebnisse der immunhistochemischen Doppelfärbung gegen C-MYC und IBA1 auch mit den Ergebnissen der Mikrogliakultur übereinstimmen und ob tatsächlich C-MYC in Mikroglia exprimiert wird. Zrzavy et al. haben eine Dysregulation von Mikroglia in aktiven MS-Läsionen beschrieben [206]. Außerdem wurde im Rahmen von GWAS ein verändertes Genexpressionsprofil von Mikroglia in MS-Patienten beschrieben [28]. Sollten die untersuchten Gene in den Mikroglia exprimiert werden, könnten die Varianten dieser Gene eine Erklärung für die Dysregulation der Mikroglia in der MS-Pathogenese sein. Einen ähnlichen Mechanismus haben auch Scott-Hewitt et al. erforscht. Sie haben untersucht, welche Auswirkungen eine heterozygote Deletion des Galactocerebrosidase-Gens (*Galc*) auf die De- und Remyelinisierungsprozesse hat. GALC wurde wie auch C-MYC, STAT, VCAM1 und TNFRSF1A im Rahmen von GWAS als ein MS-assoziiertes Protein beschrieben. Laut Scott-Hewitt et al. führt eine heterozygote *Galc*-Deletion zu einer verzögerten Remyelinisierung und einer veränderten Mikroglia-Morphologie [207].

4.2.5 Fazit

Zusammenfassend konnten wir in diesem Projekt zeigen, dass die Gene *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* in aktivierten Astrozyten verstärkt exprimiert werden. Im Rahmen von GWAS wurde nachgewiesen, dass diese Gene mit der MS-Pathogenese assoziiert sind. Die Tatsache, dass die Expression dieser Gene in den stimulierten Astrozyten induziert wird, weist auf die Beteiligung der Astrozyten in der MS-Pathogenese hin. Die Expression der Gene, die gehäuft bei MS-Patienten Varianten aufweisen, könnte die regelhafte Funktion der Astrozyten in der Regulation des ZNS-Milieus beeinträchtigen. Diese Dysregulation könnte als Stimulus für die Aktivierung des Immunsystems fungieren und sekundär eine periphere Immunzellrekrutierung induzieren.

Nachdem wir zeigen konnten, dass die Gene *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* in stimulierten Astrozyten exprimiert werden, stellt sich als Nächstes die Frage, welche Funktionen diesen Genen in den Astrozyten zukommt. Nur so werden wir verstehen können, welche Mechanismen in der Physiologie der Astrozyten durch diese genetischen Varianten beeinträchtigt werden. Diese Mechanismen könnten als Ansatzpunkt der Forschung für die

MS-Therapie fungieren. Dafür könnte man die Expression dieser Gene herunterregulieren und dabei die veränderten Funktionen der Astrozyten betrachten. Die Expression der Gene könnte mittels der siRNA (engl. short interfering RNA) -Technologie herunterreguliert werden. siRNAs sind RNAs, die an komplementäre mRNAs binden und sie zerstören oder ihre Translation verhindern. Somit wird die Expression des Gens, das zu dieser mRNA transkribiert wird, verhindert [208]. Diese Technologie könnte an Astrozytenkulturen erprobt werden, um damit das Verhalten der Astrozyten unter Abwesenheit der Gene *Stat3*, *Vcam1* oder *Tnfrsf1a* zu untersuchen.

Bis heute sind im Rahmen von GWAS schon über 200 Gene identifiziert worden, die mit der MS-Pathogenese assoziiert sind [26]. In diesem Projekt wurden repräsentativ vier Gene aus dieser Liste untersucht. In zukünftigen Projekten sollte man auch weitere Gene in diesen MS-Modellen untersuchen und deren Funktion weiter erforschen.

Die Untersuchungen dieses Projektes wurden an Gehirnen von Mäusen durchgeführt, bei denen durch unterschiedliche Methoden die MS-Pathologie modelliert wurde. Die bis heute verwendeten MS-Modelle haben aber Grenzen und können nur Teilaspekte der wirklichen MS-Pathologie im murinen ZNS-Gewebe widerspiegeln. Deshalb ist es relevant, die erforschten Ergebnisse auch in humanem ZNS-Gewebe zu überprüfen. Man könnte dafür humanes postmortales Material von MS-Läsionen untersuchen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Klärung der Pathogenese der MS eine große klinische Relevanz aufweist. Zurzeit beruhen die meisten Therapien auf der ‚Outside-in‘-Hypothese und sind deshalb auf das Immunsystem sowie die Bekämpfung von dessen Dysregulation ausgerichtet. Wenn die MS-Pathogenese jedoch primär durch gehirnintrinsische Prozesse erklärbar ist, kann man durch Unterdrückung dieser Prozesse die Progression der Erkrankung aufhalten. Somit würde auch die sekundäre Immunzellrekrutierung verhindert werden.

5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine neuroinflammatorische Erkrankung, die durch demyelinisierte Herde im Zentralnervensystem (ZNS) gekennzeichnet ist. Im Rahmen der Demyelinisierung wird eine periphere Immunzellrekrutierung beobachtet. Erkennbar sind in den betroffenen Gebieten auch ein Absterben von Oligodendrozyten, eine Gliazellaktivierung sowie ein Verlust von Axonen. Bei MS-Patienten äußert sich die Pathologie in einer heterogenen Klinik mit motorischen, sensiblen, vegetativen und neurophysiologischen Störungen.

Die Pathogenese dieser Erkrankung ist noch nicht eindeutig geklärt. Es existieren zwei gegensätzliche Theorien, die versuchen, sie zu erklären. Gemäß der ersten Theorie, der ‚Outside-in‘-Hypothese, handelt es sich bei der MS um eine klassische, primäre Autoimmunerkrankung. Laut dieser Vorstellung führt eine Dysregulation des Immunsystems zur peripheren Immunzellrekrutierung in das ZNS und infolgedessen zur Demyelinisierung. Gemäß der zweiten Theorie, der ‚Inside-out‘-Hypothese, handelt es sich bei der MS um eine primär zytodegenerative Erkrankung, bei der die Pathologie durch das Absterben der Oligodendrozyten hervorgerufen wird. Diese gehirnintrinsischen Prozesse verursachen sekundär eine Immunzellrekrutierung in das ZNS.

Im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien wurde gezeigt, dass bestimmte Genvarianten gehäuft bei MS-Patienten auftreten. Gene, die bei MS-Patienten gehäuft Varianten aufweisen, werden interessanterweise vor allem von Immunzellen exprimiert. Forscher vermuten, dass durch diese Varianten das Immunsystem von MS-Patienten in seiner regelhaften Funktion gestört ist. Gehäufte Varianten in diesen Genen werden als Argument zur Stützung der ‚Outside-in‘-Hypothese herangezogen.

In diesem Projekt wurde im rein zytodegenerativen Cuprizone-Modell untersucht, ob die Gene, die bei MS-Patienten gehäuft Varianten aufzeigen, auch in Gliazellen exprimiert werden. Dafür haben wir die Expression der Gene *C-Myc*, *Stat3*, *Vcam1* und *Tnfrsf1a* untersucht. Wir konnten auf mRNA- und Proteinebene zeigen, dass die Expression dieser Gene induziert wird. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass STAT3 in Astrozyten und C-MYC in Mikroglia exprimiert werden. Anhand des autoimmunem, inflammatorischen Demyelinisierungsmodells, Cup/EAE, haben wir festgestellt, dass C-MYC und STAT3 auch in peripheren Immunzellen exprimiert werden.

Zusammenfassend konnten wir in diesem Projekt zeigen, dass immunrelevante Gene sowohl in peripheren Immunzellen als auch in Gliazellen exprimiert werden. Die Expression dieser Gene in Gliazellen weist darauf hin, dass die Varianten eine Dysregulation der Gliazellen verursachen könnten. Die Störung ihrer regelhaften Funktion könnte zu einer Aktivierung des

Immunsystems mit Immunzellrekrutierung in das ZNS führen. Somit wird die ‚Inside-out‘-Hypothese gestützt.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der MS-Verlaufsformen.	9
Abbildung 2: Schemazeichnung der akuten und chronischen Demyelinisierung nach Cuprizone-Intoxikation (modifiziert nach Matsushima et al. [2]).	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung der chromogenen, immunhistochemischen Färbung.	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung.	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kreuzkontrollen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.	32
Abbildung 7: Darstellung vom Kortex und vom medialen Corpus Callosum an einem Hämatoxylin&Eosin (H&E)-gefärbten Gehirnschnitt auf Höhe des rostralen Hippocampus, Region 265 [1].	41
Abbildung 8: Darstellung der Auswertung von perivaskulären Läsionen. Maßstab 25 µm	41
Abbildung 9: Darstellung der Auswertung einer RT-rtPCR.	42
Abbildung 10: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der C-MYC-Expression im <i>Corpus Callosum</i> .	46
Abbildung 11: Quantifizierung der C-MYC-positiven Zellen im medialen Corpus Callosum von Kontroll- (n = 5), 1-Woche- (n = 5), 3-Wochen- (n = 4) und 5-Wochen- (n = 5) Cuprizone-Mäusen.	47
Abbildung 12: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC im Kortex einer Kontrollmaus (a), einer 1-Woche- (b), einer 3-Wochen- (c) und einer 5-Wochen- (d) Cuprizone-Maus.	47
Abbildung 13: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC im medialen Corpus Callosum (mCC).	47
Abbildung 14: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der STAT3-Expression im Corpus Callosum.	50
Abbildung 15: Quantifizierung der STAT3-positiven Zellen im medialen Corpus Callosum von Kontroll- (n = 5), 1-Woche- (n = 5), 3-Wochen- (n = 4) und 5-Wochen- (n = 5) Cuprizone-Mäusen.	51
Abbildung 16: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3 im Kortex einer Kontrollmaus (a), einer 1-Woche- (b), einer 3-Wochen- (c) und einer 5-Wochen- (d) Cup-Maus.	51
Abbildung 17: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen STAT3 im medialen Corpus Callosum (mCC).	51
Abbildung 18: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der VCAM1-Expression im Corpus Callosum.	54
Abbildung 19: Quantifizierung der VCAM1-positiven Zellen im medialen Corpus Callosum von Kontroll- (n = 5), 1-Woche- (n = 5), 3-Wochen- (n = 4) und 5-Wochen- (n = 5) Cuprizone-Mäusen.	55
Abbildung 20: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1 im Kortex einer Kontrollmaus (a), einer 1-Woche- (b), einer 3-Wochen- (c) und einer 5-Wochen- (d) Cuprizone-Maus.	55
Abbildung 21: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1 im medialen <i>Corpus Callosum</i> (mCC).	55
Abbildung 22: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen VCAM1'. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der VCAM1'-Expression im Corpus Callosum.	56
Abbildung 23: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen TNFRSF1A. Die Cuprizone-Intoxikation verursacht eine Induktion der TNFRSF1A-Expression im Corpus Callosum.	58
Abbildung 24: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen TNFRSF1A im medialen Corpus Callosum (mCC).	58
Abbildung 25: Gel-Elektrophorese der Primer-Etablierung.	59
Abbildung 26: mRNA-Quantifizierung der Haushaltsgene Hprt und Beta-Actin im Kortex (Cx) und im Corpus Callosum (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche- (1W Cup), 3-Wochen- (3W Cup) und 5-Wochen- (5W Cup) Cup-Mäusen.	60
Abbildung 27: C-Myc-mRNA-Quantifizierung im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche- (1W Cup), 3-Wochen- (3W Cup) und 5-Wochen- (5W Cup) Cuprizone-Mäusen.	60
Abbildung 28: Stat3-mRNA-Quantifizierung im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche (1W Cup), 3-Wochen (3W Cup) und 5-Wochen (5W Cup) Cuprizone-Mäusen.	61

Abbildung 29: Vcam1-mRNA-Quantifizierung im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche- (1W Cup), 3-Wochen- (3W Cup) und 5-Wochen- (5W Cup) Cuprizone-Mäusen.	62
Abbildung 30: Tnfrsf1a-mRNA-Quantifizierung im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll- (Ko), 1-Woche- (1W Cup), 3-Wochen- (3W Cup) und 5-Wochen- (5W Cup) Cuprizone-Mäusen.	63
Abbildung 31: Darstellung der Demyelinisierung und der Expressionsinduktion immunrelevanter Proteine im LPC-Modell.	66
Abbildung 32: Quantifizierung der C-MYC- und STAT3- positiven Zellen im <i>medialen Corpus Callosum</i> (mCC) bei Kontroll- (Ko) und LPC-Mäusen (LPC).	67
Abbildung 33: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC und STAT3 im medialen Corpus Callosum (mCC) von LPC-Mäusen.	67
Abbildung 34: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung gegen C-MYC im medialen Corpus Callosum (mCC) von LPC-Mäusen.	68
Abbildung 35: C-MYC wird in IBA1-positiven Mikroglia exprimiert.	70
Abbildung 36: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen C-MYC und Gliazellmarker im Corpus Callosum von 5 Wochen lang mit Cuprizone intoxicierten Mäusen (5W Cup).	71
Abbildung 37: STAT3 wird in GFAP-positiven Astrozyten exprimiert.	72
Abbildung 38: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen STAT3 und den Astrozyten-Marker GFAP an 5-Wochen-Cuprizone-intoxizierten GFAP-EGFP-positiven-Mäusen (5W EGFP-Cup).	73
Abbildung 39: C-MYC- und STAT3-Proteinexpression in peripheren Immunzellen.	75
Abbildung 40: (a–c) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen STAT3 und CD3 an Cuprizone-EAE-behandelten Mäusen (Cup/EAE).	76
Abbildung 41: mRNA-Expression immunrelevanter Gene in stimulierten Astrozyten.	77
Abbildung 42: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung gegen GFAP und IBA1 an einer primären Astrozytenkultur.	78

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Paraffineinbettungsschritte (%-Angaben entsprechen Volumenprozent)	23
Tabelle 2: Kryostatteinbettungsschritte (%-Angaben entsprechen Gewichtsprozent)	23
Tabelle 3: Entparaffinierung durch Xylol und Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (%-Angaben entsprechen Volumenprozent).....	24
Tabelle 4: Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung zum Eindeckeln mit Xylol (%-Angaben entsprechen Volumenprozent)	24
Tabelle 5: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
Tabelle 6: Färbeprotokoll der Luxol-Fast-Blue- und Perjod-Säure-Schiff-Färbung	26
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper (Primär-AK) mit Verdünnung und Demaskierungsmethode bei chromogenen Färbungen	28
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper (Sekundär-AK) mit Verdünnung bei chromogenen Färbungen.....	28
Tabelle 9: Färbeprotokoll der chromogenen immunhistochemischen Färbung	29
Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper (Primär-AK) mit Verdünnung und Demaskierungsmethode bei Immunfluoreszenz-Färbungen.....	31
Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper (Sekundär-AK) mit Verdünnung bei Immunfluoreszenz-Färbungen.	31
Tabelle 12: Färbeprotokoll der Immunfluoreszenz-Färbung.....	32
Tabelle 13: Reagenzien für den „Mastermix“ der Reversen Transkription.....	34
Tabelle 14: Reagenzien für den „Mastermix“ der Kontroll-PCR.....	34
Tabelle 15: Schritte der Kontroll-PCR	35
Tabelle 16: Reagenzien für den „Mastermix“ der Primer-Etablierung.....	35
Tabelle 17: Hybridisierungstemperaturen für die Primer-Etablierung (angegeben in °C).....	35
Tabelle 18: Interne Standardverdünnungsreihe	36
Tabelle 19: Reagenzien für den „Mastermix“ der RT-rtPCR	36
Tabelle 20: Schematische Darstellung der RT-rtPCR-96-Well-Platte. Reihen 1-2: Standard-Verdünnungsreihen und Negativkontrollen (Neg.Ko). Reihen 3-12: Gewebeproben.....	37
Tabelle 21: Schritte der RT-rtPCR. T_A entspricht der Primerhybridisierungstemperatur des jeweiligen Primers. Die Schritte 2-4 wurden 35 Mal wiederholt.....	37
Tabelle 22: Verwendete Primers mit entsprechenden Basensequenzen, Primerhybridisierungstemperaturen (T_A) und Anzahl von Basenpaaren.....	37
Tabelle 23: Herstellung des 1x TAE-Puffers.....	38
Tabelle 24: Schematische Darstellung der Gelelektrophoresetaschen	38
Tabelle 25: 6-Well-Platte: Kontrolle (Ko)	39
Tabelle 26: 6-Well-Platte: Lipopolysaccharid (LPS)-Behandlung.....	39
Tabelle 27: 6-Well-Platte: Interferon- γ (IFN γ)-Behandlung.....	39
Tabelle 28: Schematische Darstellung der 24-Well-Platte: Bestimmung der Zellviabilität	40
Tabelle 29: Primer-Hybridisierungstemperaturen (T_A) der untersuchten Gene.....	Fehler!
Textmarke nicht definiert.	59
Tabelle 30: mRNA-Konzentration der Haushaltsgene im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen.	60
Tabelle 31: C-Myc-mRNA im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen.....	61
Tabelle 32: Stat3-mRNA im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen.....	61
Tabelle 33: Vcam1-mRNA-Konzentration im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen.	62

Tabelle 34: Tnfrsf1a-mRNA-Konzentration im Kortex (Cx) und Corpus Callosum (CC) von Kontroll-, 1-Woche-, 3-Wochen- und 5-Wochen-Cup-Mäusen. 63

V. Literaturverzeichnis

1. Sidman, R.L., B. Kosaras, B. Misra, and S. Senft. *High resolution Mouse Brain Atlas*. 2017 [cited 2019 25.03.2019]; Available from: <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/index.html>.
2. Schmidt, R.M., F.A. Hoffmann, J.H. Faiss, W. Köhler, U.K. Zettl, and V. Urban et Fischer, *Multiple Sklerose*. 7. Auflage ed. 2018, München, Deutschland: Elsevier.
3. 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.
4. Multiple Sclerosis International Federation. *Atlas of MS*. 2008, Updated 2021, cited January 22, 2022]; Number of people with MS/Germany]. Available from: <https://www.atlasofms.org/map/germany/epidemiology/number-of-people-with-ms>.
5. Berger, T., M. Linnebank, and H. Wiendl, *Betaferon® : 25 Jahre Multiple Sklerose Forschung*. 2013, Wien, Österreich: Springer.
6. Bender, A., *Kurzlehrbuch Neurologie*. 2. Auflage ed. 2015, München, Deutschland: Elsevier, Urban & Fischer.
7. Lublin, F.D., S.C. Reingold, J.A. Cohen, G.R. Cutter, P.S. Sørensen, A.J. Thompson, J.S. Wolinsky, L.J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof, et al., *Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions*. *Neurology*, 2014. **83**(3): p. 278-86.
8. von Wyl, V., P. Benkert, A. Moser, J. Lorscheider, B. Décard, P. Hänni, C. Lienert, J. Kuhle, T. Derfuss, L. Kappos, et al., *Disability progression in relapse-free multiple sclerosis patients on fingolimod versus interferon-beta/glatiramer acetate*. *Mult Scler*, 2021. **27**(3): p. 439-448.
9. Kipp, M., S. Nyamoya, T. Hochstrasser, and S. Amor, *Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective*. *Brain Pathol*, 2017. **27**(2): p. 123-137.
10. Sawcer, S., G. Hellenthal, M. Pirinen, C.C. Spencer, N.A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S.E. Hunt, et al., *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. *Nature*, 2011. **476**(7359): p. 214-9.
11. Goris, A., I. Pauwels, and B. Dubois, *Progress in multiple sclerosis genetics*. *Curr Genomics*, 2012. **13**(8): p. 646-63.
12. Pender, M.P., *The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis*. *Neuroscientist*, 2011. **17**(4): p. 351-67.
13. Banwell, B., L. Krupp, J. Kennedy, R. Tellier, S. Tenenbaum, J. Ness, A. Belman, A. Boiko, O. Bykova, E. Waubant, et al., *Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study*. *Lancet Neurol*, 2007. **6**(9): p. 773-81.
14. Sumaya, C.V., L.W. Myers, and G.W. Ellison, *Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis*. *Arch Neurol*, 1980. **37**(2): p. 94-6.
15. Giovannoni, G., G.R. Cutter, J. Lunemann, R. Martin, C. Munz, S. Sriram, I. Steiner, M.R. Hammerschlag, and C.A. Gaydos, *Infectious causes of multiple sclerosis*. *Lancet Neurol*, 2006. **5**(10): p. 887-94.
16. Pender, M.P., *Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(11): p. 584-8.
17. Ghasemi, N., S. Razavi, and E. Nikzad, *Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy*. *Cell J*, 2017. **19**(1): p. 1-10.
18. Hart, P.H. and S. Gorman, *Exposure to UV Wavelengths in Sunlight Suppresses Immunity. To What Extent is UV-induced Vitamin D3 the Mediator Responsible?* *Clin Biochem Rev*, 2013. **34**(1): p. 3-13.
19. Breuer, J., K. Loser, N. Mykicky, H. Wiendl, and N. Schwab, *Does the environment influence multiple sclerosis pathogenesis via UVB light and/or induction of vitamin D?* *J Neuroimmunol*, 2018.

20. Pierrot-Deseilligny, C. and J.-C. Souberbielle, *Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis*. Therapeutic Advances in Neurological Disorders, 2013. **6**(2): p. 81-116.
21. Thompson, A.J., B.L. Banwell, F. Barkhof, W.M. Carroll, T. Coetzee, G. Comi, J. Correale, F. Fazekas, M. Filippi, M.S. Freedman, et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. Lancet Neurol, 2018. **17**(2): p. 162-173.
22. Hemmer B. et al. *Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie*, . 2021 cited 22.01.2022]; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-050LGI_S2e_Diagnose-Therapie-Multiplen-Sklerose-Neuromyelitis-Optica-Spektrum-MOG-IgG-assoziierte_Erkrankungen_2021-05_1.pdf.
23. Greenfield, A.L. and S.L. Hauser, *B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era*. Ann Neurol, 2018. **83**(1): p. 13-26.
24. Stys, P.K., G.W. Zamponi, J. van Minnen, and J.J. Geurts, *Will the real multiple sclerosis please stand up?* Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(7): p. 507-14.
25. Traka, M., J.R. Podojil, D.P. McCarthy, S.D. Miller, and B. Popko, *Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination*. Nat Neurosci, 2016. **19**(1): p. 65-74.
26. Patsopoulos, N.A., *Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(7).
27. Sawcer, S., R.J. Franklin, and M. Ban, *Multiple sclerosis genetics*. Lancet Neurol, 2014. **13**(7): p. 700-9.
28. *Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility*. Science, 2019. **365**(6460).
29. Baranzini, S.E. and J.R. Oksenberg, *The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years*. Trends Genet, 2017. **33**(12): p. 960-970.
30. Barnett, M.H. and J.W. Prineas, *Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion*. Ann Neurol, 2004. **55**(4): p. 458-68.
31. Scheld, M., B.J. Ruther, R. Grosse-Veldmann, K. Ohl, K. Tenbrock, D. Dreytmüller, P. Fallier-Becker, A. Zendedel, C. Beyer, T. Clarner, et al., *Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain*. J Neurosci, 2016. **36**(4): p. 1410-5.
32. Rodriguez, M. and B. Scheithauer, *Ultrastructure of multiple sclerosis*. Ultrastruct Pathol, 1994. **18**(1-2): p. 3-13.
33. Seewann, A., H. Vrenken, P. van der Valk, E.L. Blezer, D.L. Knol, J.A. Castelijns, C.H. Polman, P.J. Pouwels, F. Barkhof, and J.J. Geurts, *Diffusely abnormal white matter in chronic multiple sclerosis: imaging and histopathologic analysis*. Arch Neurol, 2009. **66**(5): p. 601-9.
34. Frischer, J.M., S. Bramow, A. Dal-Bianco, C.F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P.S. Sorensen, and H. Lassmann, *The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains*. Brain, 2009. **132**(5): p. 1175-1189.
35. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. The Lancet, 2008. **372**(9648): p. 1502-1517.
36. Metz, I., C.F. Lucchinetti, H. Openshaw, A. Garcia-Merino, H. Lassmann, M.S. Freedman, H.L. Atkins, B. Azzarelli, O.J. Kolar, and W. Bruck, *Autologous haematopoietic stem cell transplantation fails to stop demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis*. Brain, 2007. **130**(Pt 5): p. 1254-62.
37. Takuma, K., A. Baba, and T. Matsuda, *Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection*. Prog Neurobiol, 2004. **72**(2): p. 111-27.
38. Ludwin, S.K., V. Rao, C.S. Moore, and J.P. Antel, *Astrocytes in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2016. **22**(9): p. 1114-24.
39. Robinson, R.R., A.K. Dietz, A.M. Maroof, R. Asmis, and T.G. Forsthuber, *The role of glial-neuronal metabolic cooperation in modulating progression of multiple sclerosis and neuropathic pain*. Immunotherapy, 2019. **11**(2): p. 129-147.

40. Sharma, R., M.T. Fischer, J. Bauer, P.A. Felts, K.J. Smith, T. Misu, K. Fujihara, M. Bradl, and H. Lassmann, *Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination*. *Acta Neuropathol*, 2010. **120**(2): p. 223-36.
41. Liddelow, S. and D. Hoyer, *Astrocytes: Adhesion Molecules and Immunomodulation*. *Curr Drug Targets*, 2016. **17**(16): p. 1871-1881.
42. Farina, C., M. Krumbholz, T. Giese, G. Hartmann, F. Aloisi, and E. Meinl, *Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes*. *J Neuroimmunol*, 2005. **159**(1-2): p. 12-9.
43. Williams, A., G. Piaton, and C. Lubetzki, *Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis?* *Glia*, 2007. **55**(13): p. 1300-12.
44. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(1): p. 7-35.
45. Cramer, S.P., H. Simonsen, J.L. Frederiksen, E. Rostrup, and H.B. Larsson, *Abnormal blood-brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI*. *Neuroimage Clin*, 2014. **4**: p. 182-9.
46. 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).
47. Hiremath, M.M., Y. Saito, G.W. Knapp, J.P. Ting, K. Suzuki, and G.K. Matsushima, *Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice*. *J Neuroimmunol*, 1998. **92**(1-2): p. 38-49.
48. Miljkovic, D., M. Momcilovic, I. Stojanovic, S. Stosic-Grujicic, Z. Ramic, and M. Mostarica-Stojkovic, *Astrocytes stimulate interleukin-17 and interferon-gamma production in vitro*. *J Neurosci Res*, 2007. **85**(16): p. 3598-606.
49. Skripuletz, T., D. Hackstette, K. Bauer, V. Gudi, R. Pul, E. Voss, K. Berger, M. Kipp, W. Baumgartner, and M. Stangel, *Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination*. *Brain*, 2013. **136**(Pt 1): p. 147-67.
50. Messori, L., A. Casini, C. Gabbiani, L. Sorace, M. Muniz-Miranda, and P. Zatta, *Unravelling the chemical nature of copper cuprizone*. *Dalton Trans*, 2007(21): p. 2112-4.
51. Venturini, G., *Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo*. *J Neurochem*, 1973. **21**(5): p. 1147-51.
52. Praet, J., C. Guglielmetti, Z. Berneman, A. Van der Linden, and P. Ponsaerts, *Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014. **47**: p. 485-505.
53. Suzuki, K. and Y. Kikkawa, *Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone)*. *Am J Pathol*, 1969. **54**(2): p. 307-25.
54. Acs, P. and S. Komoly, *Selective ultrastructural vulnerability in the cuprizone-induced experimental demyelination*. *Ideggyogy Sz*, 2012. **65**(7-8): p. 266-70.
55. Kipp, M., T. Clarner, J. Dang, S. Copray, and C. Beyer, *The cuprizone animal model: new insights into an old story*. *Acta Neuropathol*, 2009. **118**(6): p. 723-36.
56. Blakemore, W.F., *Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone*. *J Neurol Sci*, 1973. **20**(1): p. 63-72.
57. Bakker, D.A. and S.K. Ludwin, *Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases*. *J Neurol Sci*, 1987. **78**(2): p. 125-37.
58. Morell, P., C.V. Barrett, J.L. Mason, A.D. Toews, J.D. Hostettler, G.W. Knapp, and G.K. Matsushima, *Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination*. *Mol Cell Neurosci*, 1998. **12**(4-5): p. 220-7.
59. Ludwin, S.K., *Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity*. *Lab Invest*, 1978. **39**(6): p. 597-612.

60. Armstrong, R.C., T.Q. Le, N.C. Flint, A.C. Vana, and Y.X. Zhou, *Endogenous cell repair of chronic demyelination*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(3): p. 245-56.
61. Robinson, A.P., C.T. Harp, A. Noronha, and S.D. Miller, *The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment*. Handbook of clinical neurology, 2014. **122**: p. 173-189.
62. Ruther, B.J., M. Scheld, D. Drey Mueller, T. Clarner, E. Kress, L.O. Brandenburg, T. Swartenbroekx, C. Hoornaert, P. Ponsaerts, P. Fallier-Becker, et al., *Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression*. Glia, 2017. **65**(12): p. 1900-1913.
63. Olitsky, P.K. and R.H. Yager, *EXPERIMENTAL DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN WHITE MICE*. The Journal of Experimental Medicine, 1949. **90**(3): p. 213-224.
64. Levy, H., Y. Assaf, and D. Frenkel, *Characterization of brain lesions in a mouse model of progressive multiple sclerosis*. Exp Neurol, 2010. **226**(1): p. 148-58.
65. Maggi, P., S.M. Macri, M.I. Gaitan, E. Leibovitch, J.E. Wholer, H.L. Knight, M. Ellis, T. Wu, A.C. Silva, L. Massacesi, et al., *The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter*. Ann Neurol, 2014. **76**(4): p. 594-608.
66. Waxman, S.G., J.D. Kocsis, and K.C. Nitta, *Lysophosphatidyl choline-induced focal demyelination in the rabbit corpus callosum. Light-microscopic observations*. J Neurol Sci, 1979. **44**(1): p. 45-53.
67. Kougiyas, P., H. Chai, P.H. Lin, A.B. Lumsden, Q. Yao, and C. Chen, *Lysophosphatidylcholine and secretory phospholipase A2 in vascular disease: mediators of endothelial dysfunction and atherosclerosis*. Med Sci Monit, 2006. **12**(1): p. Ra5-16.
68. Rassow, J., *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage ed. 2016, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG
69. Christen, P., *Biochemie und Molekularbiologie : eine Einführung in 40 Lerneinheiten*. 2016, Berlin [u.a.]: Springer Spektrum.
70. Lasch, J., *Interaction of detergents with lipid vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 269-92.
71. Plemel, J.R., N.J. Michaels, N. Weishaupt, A.V. Caprariello, M.B. Keough, J.A. Rogers, A. Yukseloglu, J. Lim, V.V. Patel, K.S. Rawji, et al., *Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: A primary lipid disrupting myelinopathy*. Glia, 2018. **66**(2): p. 327-347.
72. Koizumi, S., S. Yamamoto, T. Hayasaka, Y. Konishi, M. Yamaguchi-Okada, N. Goto-Inoue, Y. Sugiura, M. Setou, and H. Namba, *Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain*. Neuroscience, 2010. **168**(1): p. 219-25.
73. Hanrieder, J. and A.G. Ewing, *Spatial elucidation of spinal cord lipid- and metabolite-regulations in amyotrophic lateral sclerosis*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 5266.
74. Hanada, M., Y. Sugiura, R. Shinjo, N. Masaki, S. Imagama, N. Ishiguro, Y. Matsuyama, and M. Setou, *Spatiotemporal alteration of phospholipids and prostaglandins in a rat model of spinal cord injury*. Anal Bioanal Chem, 2012. **403**(7): p. 1873-84.
75. Park, J.Y., S.H. Lee, M.J. Shin, and G.S. Hwang, *Alteration in metabolic signature and lipid metabolism in patients with angina pectoris and myocardial infarction*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135228.
76. Pieragostino, D., M. D'Alessandro, M. di Iorio, C. Rossi, M. Zucchelli, A. Urbani, C. Di Ilio, A. Lugaresi, P. Sacchetta, and P. Del Boccio, *An integrated metabolomics approach for the research of new cerebrospinal fluid biomarkers of multiple sclerosis*. Mol Biosyst, 2015. **11**(6): p. 1563-72.
77. Hall, S.M., *The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord*. J Cell Sci, 1972. **10**(2): p. 535-46.
78. Ousman, S.S. and S. David, *Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord*. Glia, 2000. **30**(1): p. 92-104.

79. Hoflich, K.M., C. Beyer, T. Clarner, C. Schmitz, S. Nyamoya, M. Kipp, and T. Hochstrasser, *Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach*. Brain Res, 2016. **1650**: p. 125-133.
80. Vereyken, E.J., D.M. Fluitsma, M.J. Bolijn, C.D. Dijkstra, and C.E. Teunissen, *An in vitro model for de- and remyelination using lysophosphatidyl choline in rodent whole brain spheroid cultures*. Glia, 2009. **57**(12): p. 1326-40.
81. de Alboran, I.M., R.C. O'Hagan, F. Gärtner, B. Malynn, L. Davidson, R. Rickert, K. Rajewsky, R.A. DePinho, and F.W. Alt, *Analysis of C-MYC Function in Normal Cells via Conditional Gene-Targeted Mutation*. Immunity. **14**(1): p. 45-55.
82. Alitalo, K., G. Ramsay, J.M. Bishop, S.O. Pfeifer, W.W. Colby, and A.D. Levinson, *Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes*. Nature, 1983. **306**(5940): p. 274-7.
83. Battey, J., C. Moulding, R. Taub, W. Murphy, T. Stewart, H. Potter, G. Lenoir, and P. Leder, *The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma*. Cell, 1983. **34**(3): p. 779-87.
84. Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R.C. Gallo, and C.M. Croce, *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7824-7.
85. Dang, C.V., L.M. Resar, E. Emison, S. Kim, Q. Li, J.E. Prescott, D. Wonsey, and K. Zeller, *Function of the c-Myc oncogenic transcription factor*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 63-77.
86. Luscher, B. and J. Vervoorts, *Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC*. Gene, 2012. **494**(2): p. 145-60.
87. Dang, C.V., *c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 1-11.
88. Gnanaprakasam, J.N.R. and R. Wang, *MYC in Regulating Immunity: Metabolism and Beyond*. Genes, 2017. **8**(3): p. 88.
89. Campisi, J., H.E. Gray, A.B. Pardee, M. Dean, and G.E. Sonenshein, *Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation*. Cell, 1984. **36**(2): p. 241-7.
90. Mateyak, M.K., A.J. Obaya, S. Adachi, and J.M. Sedivy, *Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(10): p. 1039-48.
91. Davis, A.C., M. Wims, G.D. Spotts, S.R. Hann, and A. Bradley, *A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice*. Genes Dev, 1993. **7**(4): p. 671-82.
92. National Center for Biotechnology Information. *STAT3 signal transducer and activator of transcription 3 [Homo sapiens (human)]*. 2019 [cited 2019 25.03.2019]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6774>.
93. Akira, S., *Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2607-11.
94. Avalle, L. and V. Poli, *Nucleus, Mitochondrion, or Reticulum? STAT3 a La Carte*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
95. Turkson, J. and R. Jove, *STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery*. Oncogene, 2000. **19**(56): p. 6613-26.
96. Akira, S., *IL-6-regulated transcription factors*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(12): p. 1401-18.
97. Yu, H., H. Lee, A. Herrmann, R. Buettner, and R. Jove, *Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(11): p. 736-46.
98. Egwuagu, C.E., *STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases*. Cytokine, 2009. **47**(3): p. 149-56.

99. Alonzi, T., D. Maritano, B. Gorgoni, G. Rizzuto, C. Libert, and V. Poli, *Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(5): p. 1621-32.
100. Fornek, J.L., L.T. Tygrett, T.J. Waldschmidt, V. Poli, R.C. Rickert, and G.S. Kansas, *Critical role for Stat3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells*. *Blood*, 2006. **107**(3): p. 1085-91.
101. Stritesky, G.L., R. Muthukrishnan, S. Sehra, R. Goswami, D. Pham, J. Travers, E.T. Nguyen, D.E. Levy, and M.H. Kaplan, *The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development*. *Immunity*, 2011. **34**(1): p. 39-49.
102. Takeda, K., B.E. Clausen, T. Kaisho, T. Tsujimura, N. Terada, I. Forster, and S. Akira, *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. *Immunity*, 1999. **10**(1): p. 39-49.
103. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(11): p. 798-809.
104. Avalle, L., A. Camporeale, A. Camperi, and V. Poli, *STAT3 in cancer: A double edged sword*. *Cytokine*, 2017. **98**: p. 42-50.
105. National Center for Biotechnology Information. *VCAM1 vascular cell adhesion molecule 1 [Homo sapiens (human)]*. 2019 [cited 2019 25.03.2019]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7412>.
106. Cook-Mills, J.M., M.E. Marchese, and H. Abdala-Valencia, *Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants*. *Antioxidants & redox signaling*, 2011. **15**(6): p. 1607-1638.
107. Alon, R., P.D. Kassner, M.W. Carr, E.B. Finger, M.E. Hemler, and T.A. Springer, *The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1*. *J Cell Biol*, 1995. **128**(6): p. 1243-53.
108. Pober, J.S., M.S. Kluger, and J.S. Schechner, *Human endothelial cell presentation of antigen and the homing of memory/effector T cells to skin*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **941**: p. 12-25.
109. Min, J.K., Y.M. Kim, S.W. Kim, M.C. Kwon, Y.Y. Kong, I.K. Hwang, M.H. Won, J. Rho, and Y.G. Kwon, *TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(1): p. 531-40.
110. Kim, S.R., Y.H. Bae, S.K. Bae, K.S. Choi, K.H. Yoon, T.H. Koo, H.O. Jang, I. Yun, K.W. Kim, Y.G. Kwon, et al., *Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(5): p. 886-95.
111. Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, and R. Lobb, *Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes*. *Cell*, 1989. **59**(6): p. 1203-11.
112. Cybulsky, M.I., K. Iiyama, H. Li, S. Zhu, M. Chen, M. Iiyama, V. Davis, J.C. Gutierrez-Ramos, P.W. Connelly, and D.S. Milstone, *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(10): p. 1255-62.
113. Cook-Mills, J.M., *VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species*. *Molecular immunology*, 2002. **39**(9): p. 499-508.
114. Chin, J.E., C.A. Hatfield, G.E. Winterrowd, J.R. Brashler, S.L. Vonderfecht, S.F. Fidler, R.L. Griffin, K.P. Kolbasa, R.F. Krzesicki, L.M. Sly, et al., *Airway recruitment of leukocytes in mice is dependent on alpha4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(2 Pt 1): p. L219-29.
115. Chen, Q., X.H. Zhang, and J. Massague, *Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(4): p. 538-49.
116. Ding, Y.B., G.Y. Chen, J.G. Xia, X.W. Zang, H.Y. Yang, and L. Yang, *Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma*. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(7): p. 1409-14.

117. Hutchinson, M., *Natalizumab: A new treatment for relapsing remitting multiple sclerosis*. Therapeutics and clinical risk management, 2007. **3**(2): p. 259-268.
118. Kent, S.J., S.J. Karlik, C. Cannon, D.K. Hines, T.A. Yednock, L.C. Fritz, and H.C. Horner, *A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 1995. **58**(1): p. 1-10.
119. MacEwan, D.J., *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences*. Cell Signal, 2002. **14**(6): p. 477-92.
120. National Center for Biotechnology Information. *TNFRSF1A TNF receptor superfamily member 1A [Homo sapiens (human)]*. 2019 [cited 2019 25.03.2019]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7132>.
121. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
122. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
123. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
124. Wallach, D., E.E. Varfolomeev, N.L. Malinin, Y.V. Goltsev, A.V. Kovalenko, and M.P. Boldin, *Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 331-67.
125. Finsen, B., J. Antel, and T. Owens, *TNFalpha: kill or cure for demyelinating disease?* Mol Psychiatry, 2002. **7**(8): p. 820-1.
126. Stojanov, S. and M.F. McDermott, *The tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: current concepts*. Expert Rev Mol Med, 2005. **7**(22): p. 1-18.
127. McFarland, H.F. and R. Martin, *Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity*. Nature Immunology, 2007. **8**: p. 913.
128. Krauspe, B.M., W. Dreher, C. Beyer, W. Baumgartner, B. Denecke, K. Janssen, C.D. Langhans, T. Clarner, and M. Kipp, *Short-term cuprizone feeding verifies N-acetylaspartate quantification as a marker of neurodegeneration*. J Mol Neurosci, 2015. **55**(3): p. 733-48.
129. Nyamoya, S., P. Leopold, B. Becker, C. Beyer, F. Hustadt, C. Schmitz, A. Michel, and M. Kipp, *G-Protein-Coupled Receptor Gpr17 Expression in Two Multiple Sclerosis Remyelination Models*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(2): p. 1109-1123.
130. Jacque, C.M., C. Vinner, M. Kujas, M. Raoul, J. Racadot, and N.A. Baumann, *Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors*. J Neurol Sci, 1978. **35**(1): p. 147-55.
131. Nolte, C., M. Matyash, T. Pivneva, C.G. Schipke, C. Ohlemeyer, U.K. Hanisch, F. Kirchhoff, and H. Kettenmann, *GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue*. Glia, 2001. **33**(1): p. 72-86.
132. Garcez, M.E., C. dos Santos Branco, L.V. Lara, F.F. Pasqualotto, and M. Salvador, *Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen*. Fertil Steril, 2010. **94**(6): p. 2118-21.
133. Zamanian, J.L., L. Xu, L.C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R.G. Giffard, and B.A. Barres, *Genomic analysis of reactive astrogliosis*. J Neurosci, 2012. **32**(18): p. 6391-410.
134. Kipp, M., S. Karakaya, S. Johann, E. Kampmann, J. Mey, and C. Beyer, *Oestrogen and progesterone reduce lipopolysaccharide-induced expression of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-18 in midbrain astrocytes*. J Neuroendocrinol, 2007. **19**(10): p. 819-22.
135. Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume, *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
136. Goldberg, J., T. Clarner, C. Beyer, and M. Kipp, *Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice*. J Mol Neurosci, 2015. **57**(2): p. 166-75.

137. Ohsawa, K., Y. Imai, Y. Sasaki, and S. Kohsaka, *Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity*. J Neurochem, 2004. **88**(4): p. 844-56.
138. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 421-43.
139. Wegener, A., C. Deboux, C. Bachelin, M. Frah, C. Kerninon, D. Seilhean, M. Weider, M. Wegner, and B. Nait-Oumesmar, *Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination*. Brain, 2015. **138**(Pt 1): p. 120-35.
140. Trepel, M., *Neuroanatomie : Struktur und Funktion*. 7. Auflage ed. 2017, München, Deutschland: Elsevier.
141. Trapp, B.D., L. Bo, S. Mork, and A. Chang, *Pathogenesis of tissue injury in MS lesions*. J Neuroimmunol, 1999. **98**(1): p. 49-56.
142. Chaudhuri, A. and P.O. Behan, *Multiple sclerosis: looking beyond autoimmunity*. J R Soc Med, 2005. **98**(7): p. 303-6.
143. Steinman, L., R. Martin, C. Bernard, P. Conlon, and J.R. Oksenberg, *Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy*. Annu Rev Neurosci, 2002. **25**: p. 491-505.
144. Witte, M.E., D.J. Mahad, H. Lassmann, and J. van Horssen, *Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis*. Trends Mol Med, 2014. **20**(3): p. 179-87.
145. Smets, I., L. Van Deun, C. Bohyn, V. van Pesch, L. Vanopdenbosch, D. Dive, V. Bissay, and B. Dubois, *Corticosteroids in the management of acute multiple sclerosis exacerbations*. Acta Neurol Belg, 2017. **117**(3): p. 623-633.
146. Dargahi, N., M. Katsara, T. Tselios, M.E. Androutsou, M. de Courten, J. Matsoukas, and V. Apostolopoulos, *Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update*. Brain Sci, 2017. **7**(7).
147. Hauser, S.L. and B.A.C. Cree, *Treatment of Multiple Sclerosis: A Review*. Am J Med, 2020. **133**(12): p. 1380-1390.e2.
148. Molyneux, P.D., L. Kappos, C. Polman, C. Pozzilli, F. Barkhof, M. Filippi, T. Yousry, D. Hahn, K. Wagner, M. Ghazi, et al., *The effect of interferon beta-1b treatment on MRI measures of cerebral atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. European Study Group on Interferon beta-1b in secondary progressive multiple sclerosis*. Brain, 2000. **123** (Pt 11): p. 2256-63.
149. Coles, A.J., M.G. Wing, P. Molyneux, A. Paolillo, C.M. Davie, G. Hale, D. Miller, H. Waldmann, and A. Compston, *Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 1999. **46**(3): p. 296-304.
150. Kappos, L., A. Bar-Or, B.A.C. Cree, R.J. Fox, G. Giovannoni, R. Gold, P. Vermersch, D.L. Arnold, S. Arnould, T. Scherz, et al., *Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study*. Lancet, 2018. **391**(10127): p. 1263-1273.
151. Mahad, D.H., B.D. Trapp, and H. Lassmann, *Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2015. **14**(2): p. 183-93.
152. Hemmer, B., M. Kerschensteiner, and T. Korn, *Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2015. **14**(4): p. 406-19.
153. Henderson, A.P., M.H. Barnett, J.D. Parratt, and J.W. Prineas, *Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions*. Ann Neurol, 2009. **66**(6): p. 739-53.
154. Casanova, B., I. Jarque, F. Gascon, J.C. Hernandez-Boluda, F. Perez-Miralles, J. de la Rubia, C. Alcalá, J. Sanz, J. Mallada, A. Cervello, et al., *Autologous hematopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: comparison with secondary progressive multiple sclerosis*. Neurol Sci, 2017. **38**(7): p. 1213-1221.

155. Scott, L.J., *Siponimod: A Review in Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. CNS Drugs, 2020. **34**(11): p. 1191-1200.
156. Roggeri, A., M. Schepers, A. Tiane, B. Rombaut, L. van Veggel, N. Hellings, J. Prickaerts, A. Pittaluga, and T. Vanmierlo, *Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulators and Oligodendroglial Cells: Beyond Immunomodulation*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
157. Chun, J., G. Giovannoni, and S.F. Hunter, *Sphingosine 1-phosphate Receptor Modulator Therapy for Multiple Sclerosis: Differential Downstream Receptor Signalling and Clinical Profile Effects*. Drugs, 2021. **81**(2): p. 207-231.
158. Kipp, M., *Does Siponimod Exert Direct Effects in the Central Nervous System?* Cells, 2020. **9**(8).
159. Gentile, A., A. Musella, S. Bullitta, D. Fresegna, F. De Vito, R. Fantozzi, E. Piras, F. Gargano, G. Borsellino, L. Battistini, et al., *Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis*. J Neuroinflammation, 2016. **13**(1): p. 207.
160. Jackson, S.J., G. Giovannoni, and D. Baker, *Fingolimod modulates microglial activation to augment markers of remyelination*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 76.
161. Mannioui, A., Q. Vauzanges, J.B. Fini, E. Henriët, S. Sekizar, L. Azoyan, J.L. Thomas, D.D. Pasquier, C. Giovannangeli, B. Demeneix, et al., *The Xenopus tadpole: An in vivo model to screen drugs favoring remyelination*. Mult Scler, 2018. **24**(11): p. 1421-1432.
162. Colombo, E., C. Bassani, A. De Angelis, F. Ruffini, L. Ottoboni, G. Comi, G. Martino, and C. Farina, *Siponimod (BAF312) Activates Nrf2 While Hampering NFκB in Human Astrocytes, and Protects From Astrocyte-Induced Neurodegeneration*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 635.
163. Hiremath, M.M., V.S. Chen, K. Suzuki, J.P. Ting, and G.K. Matsushima, *MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells*. J Neuroimmunol, 2008. **203**(1): p. 23-32.
164. Lim, C.P. and X. Cao, *Structure, function, and regulation of STAT proteins*. Mol Biosyst, 2006. **2**(11): p. 536-50.
165. Ben-Ari, Y., Y. Brody, N. Kinor, A. Mor, T. Tsukamoto, D.L. Spector, R.H. Singer, and Y. Shav-Tal, *The life of an mRNA in space and time*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 10): p. 1761-74.
166. Lu, J.Q., C. Power, G. Blevins, F. Giuliani, and V.W. Yong, *The regulation of reactive changes around multiple sclerosis lesions by phosphorylated signal transducer and activator of transcription*. J Neuropathol Exp Neurol, 2013. **72**(12): p. 1135-44.
167. Nobuta, H., C.A. Ghiani, P.M. Paez, V. Spreuer, H. Dong, R.A. Korsak, A. Manukyan, J. Li, H.V. Vinters, E.J. Huang, et al., *STAT3-mediated astrogliosis protects myelin development in neonatal brain injury*. Ann Neurol, 2012. **72**(5): p. 750-65.
168. Zhang, Y., K. Chen, S.A. Sloan, M.L. Bennett, A.R. Scholze, S. O'Keefe, H.P. Phatnani, P. Guarnieri, C. Caneda, N. Ruderisch, et al., *An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex*. J Neurosci, 2014. **34**(36): p. 11929-47.
169. Bennett, M.L., F.C. Bennett, S.A. Liddelow, B. Ajami, J.L. Zamanian, N.B. Fernhoff, S.B. Mulinyawe, C.J. Bohlen, A. Adil, A. Tucker, et al., *New tools for studying microglia in the mouse and human CNS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(12): p. E1738-46.
170. Magri, L., M. Gacias, M. Wu, V.A. Swiss, W.G. Janssen, and P. Casaccia, *c-Myc-dependent transcriptional regulation of cell cycle and nucleosomal histones during oligodendrocyte differentiation*. Neuroscience, 2014. **276**: p. 72-86.
171. Xing, Y.L., P.T. Roth, J.A. Stratton, B.H. Chuang, J. Danne, S.L. Ellis, S.W. Ng, T.J. Kilpatrick, and T.D. Merson, *Adult neural precursor cells from the subventricular zone contribute significantly to oligodendrocyte regeneration and remyelination*. J Neurosci, 2014. **34**(42): p. 14128-46.
172. Baxi, E.G., J. DeBruin, J. Jin, H.J. Strasburger, M.D. Smith, J.L. Orthmann-Murphy, J.T. Schott, A.N. Fairchild, D.E. Bergles, and P.A. Calabresi, *Lineage tracing reveals dynamic changes in*

- oligodendrocyte precursor cells following cuprizone-induced demyelination*. *Glia*, 2017. **65**(12): p. 2087-2098.
173. Ligon, K.L., J.A. Alberta, A.T. Kho, J. Weiss, M.R. Kwaan, C.L. Nutt, D.N. Louis, C.D. Stiles, and D.H. Rowitch, *The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. **63**(5): p. 499-509.
 174. Verdine, G.L. and G.J. Hilinski, *Stapled peptides for intracellular drug targets*. *Methods Enzymol*, 2012. **503**: p. 3-33.
 175. Schust, J., B. Sperl, A. Hollis, T.U. Mayer, and T. Berg, *Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization*. *Chem Biol*, 2006. **13**(11): p. 1235-42.
 176. Chi, X., P. Gatti, and T. Papoian, *Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics*. *Drug Discov Today*, 2017. **22**(5): p. 823-833.
 177. Van Der Voorn, P., J. Tekstra, R.H. Beelen, C.P. Tensen, P. Van Der Valk, and C.J. De Groot, *Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(1): p. 45-51.
 178. Ransohoff, R.M., T.A. Hamilton, M. Tani, M.H. Stoler, H.E. Shick, J.A. Major, M.L. Estes, D.M. Thomas, and V.K. Tuohy, *Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Faseb j*, 1993. **7**(6): p. 592-600.
 179. Hurwitz, A.A., W.D. Lyman, M.P. Guida, T.M. Calderon, and J.W. Berman, *Tumor necrosis factor alpha induces adhesion molecule expression on human fetal astrocytes*. *J Exp Med*, 1992. **176**(6): p. 1631-6.
 180. Parratt, J.D. and J.W. Prineas, *Neuromyelitis optica: a demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes*. *Mult Scler*, 2010. **16**(10): p. 1156-72.
 181. Blakemore, W.F., J.M. Gilson, and A.J. Crang, *The presence of astrocytes in areas of demyelination influences remyelination following transplantation of oligodendrocyte progenitors*. *Exp Neurol*, 2003. **184**(2): p. 955-63.
 182. Wang, D., M.M. Ayers, D.V. Catmull, L.J. Hazelwood, C.C. Bernard, and J.M. Orian, *Astrocyte-associated axonal damage in pre-onset stages of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Glia*, 2005. **51**(3): p. 235-40.
 183. Faulkner, J.R., J.E. Herrmann, M.J. Woo, K.E. Tansey, N.B. Doan, and M.V. Sofroniew, *Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury*. *J Neurosci*, 2004. **24**(9): p. 2143-55.
 184. Talbott, J.F., D.N. Loy, Y. Liu, M.S. Qiu, M.B. Bunge, M.S. Rao, and S.R. Whitemore, *Endogenous Nkx2.2+/Olig2+ oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes*. *Exp Neurol*, 2005. **192**(1): p. 11-24.
 185. Cregg, J.M., M.A. DePaul, A.R. Filous, B.T. Lang, A. Tran, and J. Silver, *Functional regeneration beyond the glial scar*. *Exp Neurol*, 2014. **253**: p. 197-207.
 186. Ben Haim, L., K. Ceyzeriat, M.A. Carrillo-de Sauvage, F. Aubry, G. Auregan, M. Guillermier, M. Ruiz, F. Petit, D. Houitte, E. Faivre, et al., *The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases*. *J Neurosci*, 2015. **35**(6): p. 2817-29.
 187. Liu, X., Y. Tian, N. Lu, T. Gin, C.H. Cheng, and M.T. Chan, *Stat3 inhibition attenuates mechanical allodynia through transcriptional regulation of chemokine expression in spinal astrocytes*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e75804.
 188. Gautron, L., P. Lafon, M. Chaigniau, G. Tramu, and S. Laye, *Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge*. *Neuroscience*, 2002. **112**(3): p. 717-29.
 189. Ceyzeriat, K., L. Abjean, M.A. Carrillo-de Sauvage, L. Ben Haim, and C. Escartin, *The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway?* *Neuroscience*, 2016. **330**: p. 205-18.

190. Wanner, I.B., M.A. Anderson, B. Song, J. Levine, A. Fernandez, Z. Gray-Thompson, Y. Ao, and M.V. Sofroniew, *Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury*. J Neurosci, 2013. **33**(31): p. 12870-86.
191. Herrmann, J.E., T. Imura, B. Song, J. Qi, Y. Ao, T.K. Nguyen, R.A. Korsak, K. Takeda, S. Akira, and M.V. Sofroniew, *STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury*. J Neurosci, 2008. **28**(28): p. 7231-43.
192. Oliva, A.A., Jr., Y. Kang, J. Sanchez-Molano, C. Furones, and C.M. Atkins, *STAT3 signaling after traumatic brain injury*. J Neurochem, 2012. **120**(5): p. 710-20.
193. Hristova, M., E. Rocha-Ferreira, X. Fontana, L. Thei, R. Buckle, M. Christou, S. Hompoonsup, N. Gostelow, G. Raivich, and D. Peebles, *Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) reduces neonatal hypoxic-ischaemic brain damage*. J Neurochem, 2016. **136**(5): p. 981-94.
194. Gimenez, M.A., J.E. Sim, and J.H. Russell, *TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation*. J Neuroimmunol, 2004. **151**(1-2): p. 116-25.
195. Cahoy, J.D., B. Emery, A. Kaushal, L.C. Foo, J.L. Zamanian, K.S. Christopherson, Y. Xing, J.L. Lubischer, P.A. Krieg, S.A. Krupenko, 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.
196. Rosenman, S.J., P. Shrikant, L. Dubb, E.N. Benveniste, and R.M. Ransohoff, *Cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by astrocytes and astrocytoma cell lines*. J Immunol, 1995. **154**(4): p. 1888-99.
197. Miyamoto, Y., T. Torii, A. Tanoue, and J. Yamauchi, *VCAM1 acts in parallel with CD69 and is required for the initiation of oligodendrocyte myelination*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13478.
198. Tansey, F.A., H. Zhang, and W. Cammer, *Expression of carbonic anhydrase II mRNA and protein in oligodendrocytes during toxic demyelination in the young adult mouse*. Neurochem Res, 1996. **21**(4): p. 411-6.
199. Mason, J.L., C. Langaman, P. Morell, K. Suzuki, and G.K. Matsushima, *Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2001. **27**(1): p. 50-8.
200. Habbas, S., M. Santello, D. Becker, H. Stubbe, G. Zappia, N. Liaudet, F.R. Klaus, G. Kollias, A. Fontana, C.R. Pryce, et al., *Neuroinflammatory TNFalpha Impairs Memory via Astrocyte Signaling*. Cell, 2015. **163**(7): p. 1730-41.
201. Brambilla, L., G. Guidotti, F. Martorana, A.M. Iyer, E. Aronica, C.F. Valori, and D. Rossi, *Disruption of the astrocytic TNFR1-GDNF axis accelerates motor neuron degeneration and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(14): p. 3080-3095.
202. Gregory, A.P., C.A. Dendrou, K.E. Atfield, A. Haghikia, D.K. Xifara, F. Butter, G. Poschmann, G. Kaur, L. Lambert, O.A. Leach, et al., *TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis*. Nature, 2012. **488**(7412): p. 508-511.
203. Kassiotis, G. and G. Kollias, *Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination*. J Exp Med, 2001. **193**(4): p. 427-34.
204. Steeland, S., S. Van Ryckeghem, G. Van Imschoot, R. De Rycke, W. Toussaint, L. Vanhoutte, C. Vanhove, F. De Vos, R.E. Vandenbroucke, and C. Libert, *TNFR1 inhibition with a Nanobody protects against EAE development in mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 13646.
205. Williams, S.K., O. Maier, R. Fischer, R. Fairless, S. Hochmeister, A. Stojic, L. Pick, D. Haar, S. Musiol, M.K. Storch, et al., *Antibody-mediated inhibition of TNFR1 attenuates disease in a mouse model of multiple sclerosis*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e90117.

206. Zrzavy, T., S. Hametner, I. Wimmer, O. Butovsky, H.L. Weiner, and H. Lassmann, *Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis*. *Brain*, 2017. **140**(7): p. 1900-1913.
207. Scott-Hewitt, N.J., C.J. Folts, J.M. Hogestyn, G. Piester, M. Mayer-Proschel, and M.D. Noble, *Heterozygote galactocerebrosidase (GALC) mutants have reduced remyelination and impaired myelin debris clearance following demyelinating injury*. *Hum Mol Genet*, 2017. **26**(15): p. 2825-2837.
208. Jinek, M. and J.A. Doudna, *A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference*. *Nature*, 2009. **457**(7228): p. 405-12.

VI. Anhang: Materialienliste

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Agarose Standard	Roth, Deutschland	3810.3
Arbeitsplatz-Homogenisator, Minilys	VWR International, USA	4320274
Atipamezol (Antisedan)	Orion Corporation, Finnland	
Becherglas	VWR, Deutschland	213-1111
Bienenwachs	Roth, Deutschland	5830.1
Biscyclohexanonoxaldehydhydrazon	Sigma-Aldrich, Deutschland	C9012
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deutschland	A2153
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega, USA	G8080
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Deutschland	15307
Chloralhydrat (für Nukleinsäureanalytik)	Roth, Deutschland	K318.1
Chloroform CHCl ₃	Roth, Deutschland	3313.1
Cold water fish skin Gelatin (CWFS)	Sigma-Aldrich, Deutschland	G7041
DAB Substrat Puffer	DAKO, Deutschland	K3468
DAB Chromogen [13]	DAKO, Deutschland	K3468
bisBenzimide H33258	Sigma-Aldrich, Deutschland	14530
DePeX	Serva, Deutschland	18243.01
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies, USA	41966
dNTP Mix 10 mM	Bioline, UK	BIO-39044
Doppelt destilliertes Wasser (Für Cuprizone)	Thermo Fischer, Deutschland	10977035
DPBS	Gibco Life Technologies, USA	14190169
DTT 0.1 M (Kit)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	280-021
Easy Ladder I, 100 Lanes	Bioline, UK	BIO-33062
EDTA	Sigma-Aldrich, Deutschland	03685
Einbettkästchen mit Deckel	Medite, Deutschland	47-1150-00
Einstreu Abedd Espe Classic; 2,5mm 190g/L	Abedd, Österreich	LTE E-001
Eisessig	Merck KGaA, Deutschland	1.00063.1000
Elite ABC-HRP-Kit	Vector Laboratories, USA	PK6100 RRID AB 2336819
EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	DAKO, Deutschland	K4003
Eosin	Merck KGaA, Deutschland	15935
Eppendorf Pipetten Research plus	Eppendorf AG, Deutschland	3120000909
Eppendorf Spitzen 0,1-20µl	Eppendorf AG, Deutschland	022492012
Eppendorf Spitzen 2-200µl	Eppendorf AG, Deutschland	0030000870
Eppendorf Spitzen 50-1000µl	Eppendorf AG, Deutschland	0030000919
Eppendorf Tubes (Eppi's) 1,5 ml	Eppendorf AG, Deutschland	0030120.086
Eppendorf Tubes (Eppi's) 2,0 ml	Eppendorf AG, Deutschland	0030120.094
Eselserum	Sigma-Aldrich, Deutschland	D9663
Ethanol	CLN, Deutschland	1006.9025
Ethanol ROTIUPURAN ≥ 99.8%, p.a.	Roth, Deutschland	9065.4
Falcon Rörchen	Roth, Deutschland	N463.1
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco Life Technologies, USA	10500064
Filterpapier	Schleicher&Schuell, Deutschland	549 1/2
Formaldehyd 37%	Roth, Deutschland	P733.2
Glykogen (für Molekularbiologie)	Roth, Deutschland	10901393001
Haltungsfutter (Pellets)	Ssniff, Deutschland	V1534-300

Hämatoxylin bzw. Hämalaun	Sigma-Aldrich, Deutschland	H3136-25G
Horizontalschüttler	SunLab®, Deutschland	SU1020
Inkubator 26°C	Heraeus, Deutschland	50042293
Interferon-γ aus der Maus, rekombinant	Sigma-Aldrich, Deutschland	14777
Isopentan	VWR International, USA	2487229
Käfig mit Haube und Gitter	Tecniplast, Italien	IVC-1285L
Kaliumaluminiumsulfat/dodecahydrat	Merck KGaA, Deutschland	1042.1000
Ketamin (Nimatek, zur LPC-Injektion)	Eurovet Animal Health B.V.	N01AX03
Kryo-Mikrotom (Cryostat)	Leica Biosystems, Deutschland	CM1950
Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich, Deutschland	L-4391
Lithium-Carbonat	Merck KGaA, Deutschland	5671
Luxol-Fast-Blue MBS	Chroma, USA	1328-51-4
Lysophosphatidylcholin	Sigma-Aldrich, Deutschland	9008-30-4
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Deutschland	
Mausfutter ssniff® M-Z Extrudat	ssniff, Deutschland	V1126-000
Medetomidin (Domitor)	Orion Corporation, Finnland	
Midori Green Advance	Biozym, Deutschland	617004
Mikrowelle	Exquisit, Deutschland	MW WP700j17B-2
Mixer für Cuprizone	WMF Group, Deutschland	04 1636 0011
M-MLV RT (Kit)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	28025-021
Muse Count/Viability Assay Kit	Merck Millipore, Deutschland	MCH100102
Nadeln	Terumo, Deutschland	NN-2719R
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Merck Millipore, Deutschland	106349
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	Merck-Millipore, Deutschland	106345
NanoDrop System	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	732-2848
NaOH	Sigma-Aldrich, Deutschland	041284
NaOH zur pH Einstellung	Merck KGaA, Deutschland	1.09137.1000
Natriumjodat	Merck KGaA, Deutschland	6525
Nestlets	Zoonlab, Deutschland	3097055
Objektträger für Cryostat (Menzel-Gläser Superfrost®)	VWR International, USA	631-1310
Paraffin	VWR International, USA	1.07158
PBS Dulbecco Pulver ohne Ca/Mg	Biochrom, Merck KGaA, Deutschland	L182-50
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Gibco Life Technologies, USA	15140-122
peqGold TriFast	Peqlab, Deutschland	30-2020
Perjodlösung	Chroma, USA	1.00524
pH Meter	Xylem Analytics, Deutschland	103642
Poly-D-Lysine	Sigma-Aldrich, Deutschland	P6407
Primers	Sigma-Aldrich, Deutschland	
Propanol-2 ROTIUPURAN ≥ 99.8%, p.a. ACS, ISO	Roth, Deutschland	6752.4
Random Primer	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	48190-011
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deutschland	A2153
Ringer-Lösung	B.Braun, Deutschland	PZN-01471405
Safety Multifly Kanüle	Sarstedt, Deutschland	85.1637.235
Salzsäure	Merck KGaA, Deutschland	1.09060.1000
Schiff'sches Reagenz	Sigma-Aldrich, Deutschland	3952016
Schlittenmikrotoms	Leica Biosystems, Deutschland	SM 2000R
Schottflaschen 1000ml/ 2000ml	VWR, Deutschland	215-1557/-1558
SensiMix™ SYBR ® & Fluorescin KIT	Bioline, UK	QT615-05

Shandon Immu-mount	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	9990402
Spritze 20ml	Braun, Deutschland	4616200V
Spritze 50ml	Braun, Deutschland	4616502F
Sucrose	Merck KGaA, Deutschland	1.07687
Superfrost-plus-Objektträger	VWR International, USA	631-0108
Taq Polymerase: Biotaq	Bioline, UK	21040
Thriller-Thermoinkubationsmischer, peqlab	Biotechnologie GmbH, Deutschland	
Tierhäuschen	Plexx, Holland	
Tierkäfig	Tecniplast, Italien	1284L00SUV
TissueTek O.C.T. Compound	Sakura Finetek # 4583, Holland	25608-930
Trichter	VWR, Deutschland	221-1730
Trinkflasche Sorte C	Tecniplast, Italien	
TRIS	PUFFERAN, Roth, Deutschland	A-1086
Triton x100	Sigma-Aldrich, Deutschland	T8787, 9002-93-1
TrypLE Express	Gibco Life Technologies, USA	12604013
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deutschland	P1379
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (up-H ₂ O)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	10977
Vibratom (Vibration Microtom HM650V mit Kühleinheit)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	
Vortex groß VF2	IKA Labortechnik, Deutschland	
Vortex klein MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Deutschland	
Wärmeschrank (Thermo Electron Corporation)	Heraeus, Deutschland	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Roth, Deutschland	8070.4
Xylol	Merck KGaA, Deutschland	28975.462
Ziegenserum	Vector Laboratories, USA	S 1000
Zitronensäure	Roth, Deutschland	X863.2
Zitronensäure Monohydrat	Merck KGaA, Deutschland	1.00244.0500
5x DNA loading Buffer Red	Bioline, UK	BIO-37068
5X First Strand Buffer (Kit)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	28025-021
10X PCR Buffer, minus Mg	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	Y02028
50 mM MgCl ₂ mM	Bioline, UK	BIO-37026

VII. Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Gantenbein, Katherina Vicky

Name, Vorname

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

« Expression immunrelevanter Gene in murinen Multiple Sklerose-Modellen »

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.

Zürich, 05.06.22

Ort, Datum

Katherina Vicky Gantenbein

Unterschrift Doktorandin

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr.med. Dr.rer. nat. Markus Kipp bedanken, der diese Arbeit ermöglicht hat. Durch seine Ideen, Ratschläge und konstruktive Kritik hat er mir die wissenschaftliche Arbeitsweise beigebracht. Er stand mir bei Fragen oder Problemen immer zur Seite. Ich möchte mich zudem bedanken, dass er mir die Teilnahme an einem wissenschaftlichen Kongress ermöglicht hat. Ein großer Dank auch für seine Geduld während der Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Schmitz danke ich, dass ich meine Dissertation am Lehrstuhl für Neuroanatomie durchführen durfte.

Ich möchte mich auch bei Frau Dr. Tanja Hochstrasser für die Betreuung und Unterstützung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für die Einarbeitung und geduldige Hilfestellung während der Durchführung der Experimente bedanken. Genauer gesagt möchte ich mich bei Astrid Baltruschat, Beate Aschauer, Sabine Tost und Sarah Wübbel bedanken.

Ich möchte mich auch bei meinen Kommilitonen und Mitdoktoranden, den "Kipplingen" für die gemeinsame Zeit und Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank geht natürlich an meine Familie, die mir das Studium ermöglicht hat. Ich danke meinen Eltern und meinem Bruder für ihre unendliche Unterstützung und Liebe. Ich möchte mich auch herzlich an meinen Freunden bedanken, die mich während der gesamten Zeit emotional unterstützt haben. Ein großer Dank gebührt auch Evan, der mich immer ermutigen konnte und mir zur Seite stand. Danke, dass ihr Alle immer hinter mir steht und für mich da seid!