

*Aus der Anatomischen Anstalt
Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie
Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Christoph Schmitz*

**Untersuchung des Zusammenspiels metabolischer und
autoimmuner Oligodendroglipathie im kombinatorischen
Mausmodell der Multiplen Sklerose**

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

vorgelegt von
Vladislav Yakimov

aus
Vidin, Bulgarien

2023

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus
Kipp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Edgar Meinel
PD Dr. Markus Krumbholz
PD Dr. Astrid Blaschek

Mitbetreuung durch den
promovierten Betreuer: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2023

Für meine Familie und Freunde

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. <i>Epidemiologie und Risikofaktoren der Multiplen Sklerose</i>	6
1.2. <i>Klinischer Verlauf, Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose</i>	8
1.3. <i>Pathologie und Pathophysiologie der Multiplen Sklerose</i>	14
1.4. <i>Mausmodelle der Multiplen Sklerose</i>	19
1.5. <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	23
2. Material und Methoden:	24
2.1. <i>Versuchstiere:</i>	24
2.2. <i>Cuprizone-Intoxikation:</i>	24
2.3. <i>MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung und Evaluation klinischer Defizite:</i>	25
2.4. <i>Versuchsaufbau:</i>	28
2.5. <i>Gewebepräparation und Paraffineinbettung:</i>	29
2.6. <i>Histologische Färbungen:</i>	32
2.6.1. <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E):</i>	32
2.6.2. <i>Luxol-Fast-Blue/Periodsäure-Schiff (LFB/PAS) Färbung:</i>	34
2.6.3. <i>Immunhistochemische Färbungen und Naphtol AS-D Chloracetat Kit</i>	35
2.7. <i>Auswertung histologischer Parameter:</i>	40
2.8. <i>Statistische Auswertung:</i>	43
3. Ergebnisse:	44
3.1. <i>Adäquate anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort in C57BL/6-Mäusen trotz synchroner Cuprizone-Gabe:</i>	44
3.2. <i>Milde Cuprizone-induzierte Oligodendroglieopathie führt zur peripheren Immuneinvasion in die Vorderhirne MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse</i>	47
3.3. <i>Plexus-choroideus-Stroma als Invasionsroute für periphere Immunzellen:</i>	49

3.4. <i>Cup+EAE Vorderhirnläsionen teilen histopathologische Merkmale mit Typ III MS-Läsionen:</i>	53
4. Diskussion:	59
4.1. <i>Anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort in C57BL/6 Mäusen bei kontinuierlicher Cuprizon-Intoxikation</i>	59
4.2. <i>Cup+EAE Vorderhirnläsionen im Kontext des „inside-out“ Ätiopathogenesemodells der MS</i>	60
4.3. <i>Die Rolle des Plexus choroideus bei der Immunezellinvasion</i>	63
4.4. <i>Cup+EAE Vorderhirnläsionen als Modell zur Untersuchung der Typ III MS-Läsionen</i>	66
5. Zusammenfassung:	70
6. Abkürzungsverzeichnis:	72
7. Abbildungsverzeichnis:	74
8. Tabellenverzeichnis:	75
9. Literaturverzeichnis:	76
10. Eidesstattliche Versicherung	84
11. Danksagung	85
12. Curriculum vitae	86

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündlich-degenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) mit einer Prävalenz von 50 - 300 pro 100 000 Personen, die schätzungsweise 2,3 Millionen Menschen weltweit betrifft. Die schubförmige MS („relapsing remitting multiple sclerosis“ oder RRMS) wird durchschnittlich zwischen dem 25. und 29. Lebensjahr diagnostiziert und geht zwischen dem 40. und 49. Lebensjahr oft in die sekundär progrediente MS („secondary progressive multiple sclerosis“, SPMS) über [3]. Die primär progrediente MS („primary progressive multiple sclerosis“, PPMS) tritt i.d.R. erst später auf (zwischen dem 39. und 41. Lebensjahr). Frauen sind von der Erkrankung bis zu 3-mal häufiger als Männer betroffen [4], wobei die PPMS bei beiden Geschlechtern ähnlich häufig vorkommt [5].

Die genaue Ätiologie der MS ist nach wie vor unzureichend geklärt. Man geht davon aus, dass genetische, epigenetische und Umweltfaktoren miteinander interagieren (Abbildung 1) und gemeinsam zur Entstehung und Progression der Erkrankung beitragen [6]. Eine epidemiologische Studie mit Daten aus dem dänischen MS-Register konnte zeigen, dass das Erkrankungsrisiko bei Verwandten 1. Grades von Betroffenen ca. siebenmal höher ist im Vergleich zum Risiko der restlichen Bevölkerung [7]. In Übereinstimmung mit diesen epidemiologischen Daten haben neuere internationale genomweite Assoziationsstudien bis heute insgesamt über 230 genetischen Risikovarianten und über 400 putativen Risikovarianten identifiziert, die gemeinsam ~48% der geschätzten Heritabilität der MS erklären können. Obwohl die genauen Funktionen der meisten Risikogenen noch unklar sind, ist ein Großteil dieser Gene in peripheren Immunzellen wie B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) überrepräsentiert [8]. Obgleich die Mehrheit der Risikogene von peripheren Immunzellen exprimiert werden und in immunologischen Prozessen involviert sind, weisen Daten aus genomweiten Assoziationsstudien und experimentellen Studien sehr klar auf die Beteiligung der Gliazellen an der MS-Pathogenese hin [8].

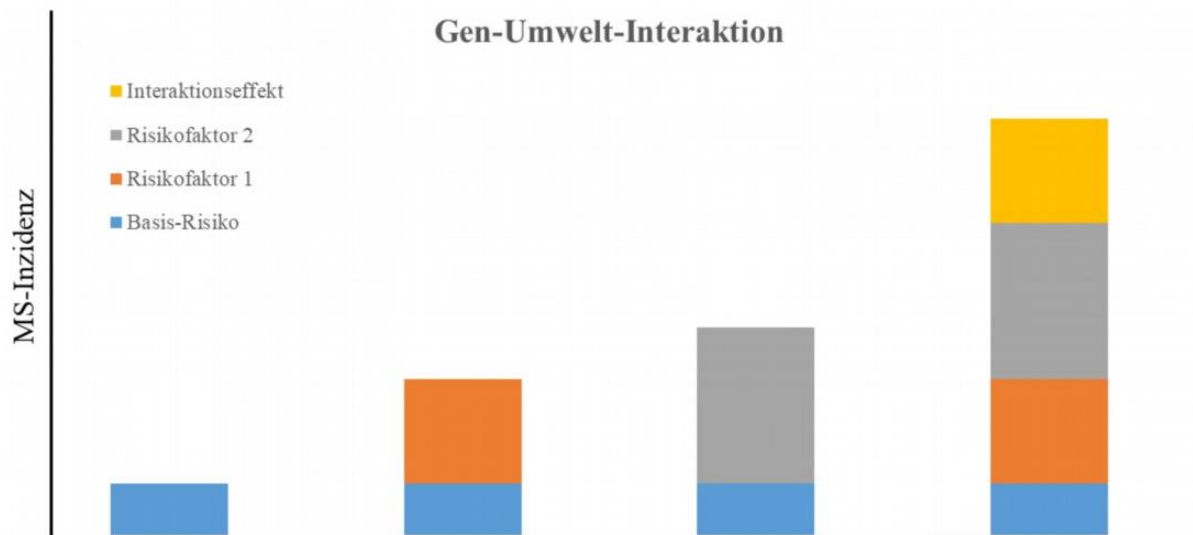


Abbildung 1: Prinzip der Interaktionseffekte zwischen Risikofaktoren – adaptiert aus [9]: die MS-Inzidenz steigt bei doppelt-exponierten Personen stärker an als durch die Summe der absoluten Effekte durch die einzelnen Risikofaktoren (orange, grau) zu erwarten wäre. Diese zusätzliche Risikoerhöhung ist auf den Interaktionseffekt zwischen beiden Risikofaktoren zurückzuführen (gelb).

Umweltfaktoren, die das Risiko für Erkrankung an MS erhöhen, sind Vitamin D-Mangel (v.a. durch reduzierte UV-Exposition), Nikotinabusus, Adipositas in der Adoleszenz [10] sowie einer durchlaufenen Infektionen mit Epstein-Bar-Virus oder Varizella-Zoster-Virus [11, 12]. Der hohe Stellenwert der Umweltfaktoren bei der Entstehung der Erkrankung lässt sich u.a. durch Migrationsstudien gut nachweisen. So zeigen diese, dass das Erkrankungsrisiko bei Personen, die vor der Adoleszenz aus einem Land mit niedriger MS-Prävalenz in eines mit hoher MS-Prävalenz migrierten, vergleichbar ist mit Personen, die in einem Land mit hoher MS-Prävalenz geboren und dort dauerhaft wohnhaft sind [13].

Die aktuelle Evidenzbasis unterstützt zudem eine starke Assoziation zwischen der Epstein-Barr Virus (EBV)-Seroprävalenz und einer MS Erkrankung. Zum einen zeigt sich bei 83-90% der Erwachsenen auf der westlichen Hemisphäre ein serologischer Nachweis des EBV [14], zum anderen ist die Seroprävalenz bei MS-Patienten signifikant erhöht und liegt bei fast 100% [15]. Weiterhin beträgt das relative Risiko (RR) für die Erkrankung an MS nach früherer infektiöser Mononukleose ~2,17 [16]. Das relative Risiko potenziert sich durch das zusätzliche Vorhandensein des Risikoallels *HLA-DRB1*15:01* auf ~7 [17]. Es gibt nur begrenzte Evidenz dafür, dass EBV-infizierte Zellen im Gehirn von MS-Patienten vorhanden sind, weswegen das Thema nach wie vor kontrovers diskutiert wird [18]. Trotz der zahlreichen Assoziationen bleibt die Frage offen, ob EBV eine kausale Rolle bei der Entstehung der MS spielt. So könnte beispielsweise die stärkere humorale Antwort auf EBV bei MS-Patienten Folge einer

genetischen Prädisposition für die demyelinisierende Erkrankung sein und kein ätiologischer Faktor [9]. Ein starkes Argument für die kausale Rolle der EBV-Infektion bei der Entwicklung der MS bringt eine neulich publizierte Studie. Diese zeigte, dass die Infektion mit EBV mit einem relativen Risiko von ~32 für die Entwicklung von MS einhergeht. Zudem führte die EBV-Serokonversion zu einem Anstieg des Serumspiegels der Neurofilament-Leichtketten, ein unspezifischer Biomarker für Neurodegeneration [19].

1.2. Klinischer Verlauf, Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose

Das MS-Phänotypenspektrum wird in vier Subtypen unterteilt: klinisch isoliertes Syndrom („clinically isolated syndrome“, CIS), schubförmig-remittierende MS, sekundär progrediente MS und primär progrediente MS [20]. Als klinisch isoliertes Syndrom (Abbildung 2A) wird die erste klinische Attacke einer mutmaßlich entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung bezeichnet. Die diagnostischen MS Kriterien nach McDonald (Tabelle 1) sind dabei nicht erfüllt, weshalb die Diagnose der MS (noch) nicht gestellt werden kann [21]. Das CIS ist somit ein Risiko- bzw. Frühstadium der manifesten Multiplen Sklerose. Die schubförmig-remittierende Form macht etwa 85-90% der MS-Erstmanifestationen aus. Sie ist durch das Auftreten von rezidivierenden klinischen Attacken (Schüben, Exazerbationen) gekennzeichnet (Abbildung 2A), die sich (un-)vollständig zurückbilden können [22]. Definitionsgemäß besteht zwischen den Schüben eine nur minimale Behinderungszunahme, wobei nur ein sehr kleiner Teil der akuten Schübe zu dauerhafter Behinderung führt [23]. Ca. 10-20 Jahre nach dem Beginn der Erkrankung geht eine RRMS meistens in die SPMS über (Abbildung 2A) [25]. Charakteristisch für die SPMS ist eine progrediente Behinderungszunahme mit oder ohne aufgesetzte Schübe, inkomplette Remissionen und Plateaus [20]. Die Behinderung resultiert aus den sich zunehmend verschlechternden heterogenen Symptomen (Abbildung 3) und wird systematisch z.B. mittels der „expanded disability status scale“ (EDSS) erfasst [26]. Etwa 10% der neu diagnostizierten MS-Fälle präsentieren sich als PPMS [27]. Dieser Phänotyp wird durch eine progrediente Behinderungszunahme mit Diagnosebeginn mit gelegentlichen Plateaus, nur kleinen Besserungen und seltenen akuten Schüben charakterisiert (Abbildung 2B) [20].

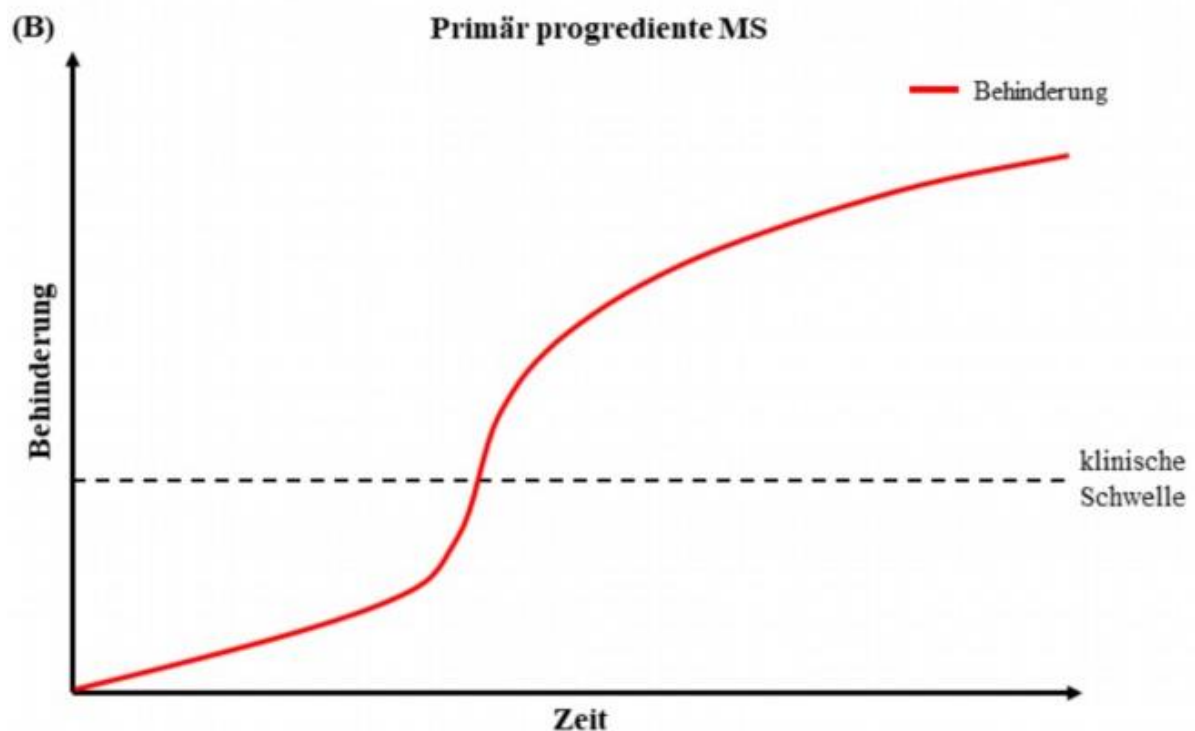
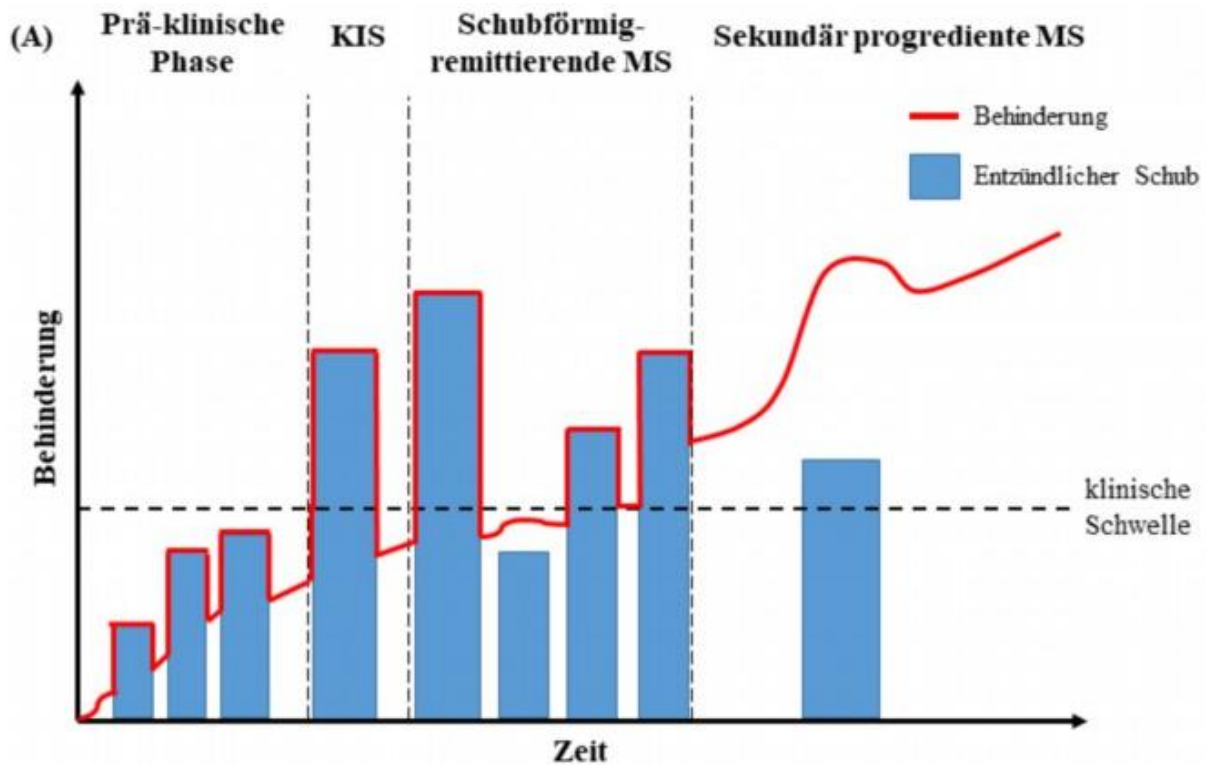


Abbildung 2: Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose – adaptiert aus [28]: (A) zeigt verschiedene Verlaufsformen der MS – (1) präklinische Phase, bei der die entzündlichen Schübe klinisch stumm verlaufen; (2) klinisch isoliertes Syndrom (KIS/CIS), bei dem es sich um die erste klinische Manifestation eines akuten demyelinisierenden Prozesses handelt. Dabei sind die Diagnosekriterien der MS (noch) nicht erfüllt. (3) Die schubförmig remittierende MS wird durch das Vorkommen neurologischer Defizite im Rahmen von Schüben gekennzeichnet, die sich (in)komplett zurückbilden können. (4) Etwa 10-20 Jahre nach Beginn der Erkrankung gehen die meisten Formen der schubförmig-

remittierenden MS in sekundär progressive MS über [25], die sich durch progrediente Behinderungszunahme kennzeichnet. (B) illustriert den Verlauf der primär progredienten MS, bei der die progrediente Behinderungszunahme seit dem Beginn der Erkrankung vorhanden ist und i.d.R. ohne aufgesetzte akute Schübe verläuft.

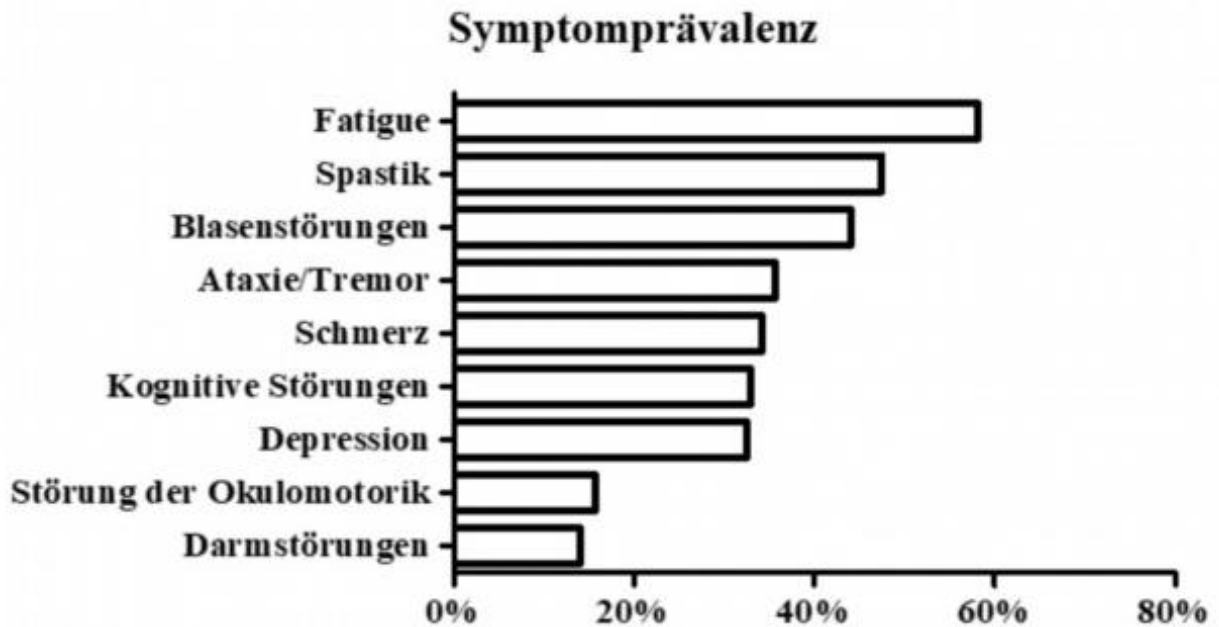


Abbildung 3: Prozentuale Häufigkeit der klinischen Manifestationen der MS – modifiziert aus [1].

MS ist eine primär klinische Diagnose – sie wird erst dann gestellt, wenn (1) die 2017 McDonald Kriterien (Tabelle 1) erfüllt sind und (2) es keine bessere Erklärung für die klinische Präsentation als eine MS gibt. Zwei Kernvoraussetzungen der Diagnosekriterien sind die örtliche und zeitliche Dissemination von entzündlich-demyelinisierenden Läsionen innerhalb des ZNS. Die örtliche Dissemination impliziert einen multifokalen ZNS-Prozess und ist durch Läsionsentstehung in mindestens zwei der vier MS-typischen anatomischen Lokalisationen (periventrikulär, kortikal bzw. juxtakortikal, infratentoriell, spinal) definiert. Für die zeitliche Dissemination ist die Entstehung von neuen Läsionen über die Zeit erforderlich [29]. Für deren Nachweis können sowohl objektive Befunde von der körperlichen Untersuchung als auch laborchemische, neurophysiologische und bildgebende Verfahren zur Anwendung kommen. Die anamnestischen Angaben zu einer mutmaßlichen klinischen Attacke müssen also durch objektive klinische Evidenz gestützt werden (Tabelle 1).

Klinische Angriffe(n)	Anzahl der Läsionen mit objektiver klinischer Evidenz	Zusätzliche Daten, die für die MS- Diagnose notwendig sind
≥ 2 klinische Angriffe	≥ 2	Keine
≥ 2 klinische Angriffe	1 (und eindeutige anamnestische Angaben über eine weitere vorausgegangene Attacke i.R. einer Läsion an einem anderen anatomischen Ort)	Keine
≥ 2 klinische Angriffe	1	Örtliche Dissemination, demonstriert durch eine weitere klinische Attacke i.R. einer Läsion an einem anderen anatomischen Ort oder durch MRT
1 klinische Attacke	≥ 2	Zeitliche Dissemination, demonstriert durch eine weitere klinische Attacke oder durch MRT ODER Nachweis von Liquor- spezifischen oligoklonalen Bändern
1 klinische Attacke	1	Örtliche Dissemination, demonstriert durch eine weitere klinische Attacke i.R. einer Läsion an einem anderen anatomischen Ort oder durch MRT UND Zeitliche Dissemination, demonstriert durch eine weitere klinische Attacke oder durch MRT ODER Nachweis von Liquor- spezifischen oligoklonalen Bändern

Tabelle 1: Die 2017 McDonald Kriterien für die Diagnose einer MS bei Patienten mit klinischer Attacke – adaptiert aus [29] - die McDonald Kriterien haben nur dann einen diagnostischen Stellenwert, wenn es einen klinischen Verdacht auf MS besteht und die klinische Präsentation durch eine andere Erkrankung nicht zu erklären ist.

Die MS-Behandlung umfasst drei Therapiesäulen – die Schubtherapie, die verlaufsmodifizierende Therapie und die symptomatische Therapie. Das Ziel der Schubtherapie ist eine rasche Rückbildung der akuten, funktionseinschränkenden Symptome, die Langzeitprognose, sowie die Schubfrequenz werden hingegen nicht beeinflusst [30]. Als Mittel der ersten Wahl im akuten Schub gilt die anti-inflammatorische Methylprednisolon-Hochdosistherapie [31]. Die Ziele der verlaufsmodifizierenden Therapie sind die Reduktion der Schubhäufigkeit, die Verringerung der Krankheitsaktivität und die Verzögerung der Krankheitsprogression. Die meisten verlaufsmodifizierenden Medikamente (Tabelle 2) wurden für Patienten mit RRMS und CIS entwickelt, wirken primär immunmodulierend und zeigen nur indirekte Effekte auf die ZNS-intrinsischen degenerativen Prozesse [6]. Diese ZNS-

intrinsischen zytodegenerativen Kaskaden spielen wahrscheinlich bei der Behinderungszunahme im Rahmen der progressiven Phasen der Erkrankung eine zentrale Rolle, weswegen die zurzeit verfügbaren Therapieoptionen bei Patienten mit PPMS und SPMS nur begrenzt wirksam sind (Tabelle 2) [2]. Es ist bemerkenswert, dass bisher nur wenige zugelassene Medikamente zur Verfügung stehen, die eine direkte oligodendroglia- bzw. neuroprotektive Wirkung im ZNS entfalten und/oder die Remyelinisierung demyelinisierter Axone fördern. Eine mögliche Erklärung dafür sind die kargen Kenntnisse über Mechanismen, die die Oligodendrozyten-De- und Regeneration im Rahmen der MS fördern und vorantreiben [32].

Wirkstoff	Wirkmechanismen	Relative Reduktion der Schubfrequenz	Indikation	Quellen
Interferon β -1a	Reduziert die Antigenpräsentation, die T-Zell-Proliferation, die Expression proinflammatorischer Zytokine, fördert ein antiinflammatorisches Milieu	33%	CIS, RRMS, aktive SPMS	[33, 34]
Interferon β -1b	Reduziert die Antigenpräsentation, die T-Zell-Proliferation, die Expression proinflammatorischer Zytokine, fördert ein antiinflammatorisches Milieu	34%	CIS, RRMS, aktive SPMS	[33]
Glatirameracetat	Kompetitive Hemmung der MHC-Moleküle der APZ, fördert die Proliferation der antiinflammatorischen Th2-Zellen	29%	CIS, RRMS, aktive SPMS	[35]
Dimethylfumarat	Reduziert die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und aktiviert antioxidative Signaltransduktionswege (Nrf2)	51%	CIS, RRMS, aktive SPMS	[36]
Teriflunomid	Hemmt die Proliferation autoreaktiver B- und T-Zellen sowie die	31%	CIS, RRMS,	[37]

	Interaktion zwischen T-Zellen und APZ		aktive SPMS	
Fingolimod	Modulator der S1P-Rezeptoren, der die Migration von Lymphozyten aus den Lymphknoten und deren Rezirkulation inhibiert	52%	CIS, RRMS, aktive SPMS	[38]
Siponimod	Selektiver Modulator der S1P1- und S1P5-Rezeptoren, der die Migration von Lymphozyten aus den Lymphknoten und deren Rezirkulation inhibiert	21%§	CIS, RRMS, aktive SPMS	[39]
Ozanimod	Selektiver Modulator der S1P1- und S1P5-Rezeptoren, der die Migration von Lymphozyten aus den Lymphknoten und deren Rezirkulation inhibiert	38%*	CIS, RRMS, aktive SPMS	[40]
Natalizumab	Humanisierter monoklonaler Antikörper, der α -4 Integrin blockiert und somit die Lymphozytenmigration durch die Blut-Hirn-Schranke verhindert	68%	CIS, RRMS, aktive SPMS	[41]
Cladribin	Synthetischer Purin-Antimetabolit, der zur Depletion der CD4 ⁺ T-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen führt	58%	RRMS, aktive SPMS	[42]
Alemtuzumab	Humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CD52 ⁺ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten	60%*	RRMS, aktive SPMS	[43]
Ocrelizumab	Humanisierter monoklonaler Antikörper gegen B-Zellen-Oberflächenantigen CD20	47%*; 15%§	CIS, RRMS, aktive SPMS, PPMS	[44, 45]
Ofatumumab	Monoklonaler Antikörper gegen B-Zellen-Oberflächenantigen CD20	55%†	CIS, RRMS, aktive SPMS,	[46]

Tabelle 2: *Verlaufsmodifizierende Therapie der Multiplen Sklerose – in Anlehnung an [6]: APZ – antigenpräsentierende Zellen, SIP – Sphingosin-1-Phosphat. Die Ergebnisse zur Medikamentenwirksamkeit stammen aus unterschiedlichen, unabhängigen Studien. Die Wirkstoffe wurden im Rahmen der Studien entweder mit Placebo oder mit einem anderen Wirkstoff (*Interferon β , †Teriflunomid) verglichen. §Relative Risikoreduktion für bestätigte Behinderungszunahme [39].*

1.3.Pathologie und Pathophysiologie der Multiplen Sklerose

MS ist eine chronische Erkrankung des ZNS, die durch fokale entzündlich-demyelinisierende Läsionen (Plaques) gekennzeichnet ist. Diese disseminierten Plaques können sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz des ZNS auftreten und sind das pathologische Korrelat neurologischer Defizite [47]. Auf histopathologischer Ebene ist die MS durch massive Oligodendrozyten-Degeneration mit fokaler sowie diffuser Demyelinisierung und ggf. Remyelinisierung charakterisiert. Diese Oligodendrogliopathie wird zudem durch Mikrogliose, Astrozytose, Neurodegeneration und Infiltration peripherer Immunzellen begleitet [48]. Diese Merkmale treten sowohl bei der schubförmigen als auch bei den progredienten Formen der MS auf, wenngleich sie phasenabhängig und interindividuell quantitativ und qualitativ stark variieren [49]. Obwohl die akuten entzündlichen Läsionen viele Gemeinsamkeiten teilen, gibt es auch relevante Unterschiede, die wahrscheinlich die Heterogenität zugrundeliegender Pathomechanismen widerspiegeln [50]. Lucchinetti et al. haben die akuten MS-Läsionen vor mehr als 20 Jahren im Rahmen einer groß-angelegten histopathologischen Studie genau beschrieben und in vier Subtypen unterteilt (Tabelle 3).

Die Typ I- („pattern I“) Läsionen kamen bei 15% der biopsierten Patienten vor und waren durch perivaskuläre Demyelinisierung, entzündliche Infiltrate, bestehend aus T-Zellen, Makrophagen und Mikroglia, gekennzeichnet. Die Typ II- („pattern II“) Läsionen waren mit 58% die häufigste Form unter den MS-Biopsaten. Sie waren ähnlich wie die Typ I Läsionen durch perivenöse Demyelinisierung, assoziiert mit T-Lymphozyten und Makrophagen, gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu waren nur die Typ II-Läsionen durch Immunoglobulin- und Komplementfaktorablagerungen auf dem Myelin charakterisiert. In 26% der MS-Biopsate traten die sogenannten Typ III- („pattern III“) Läsionen auf, die sich deutlich von allen anderen Subtypen unterschieden. Die Demyelinisierungsherde waren nicht nur mit entzündlichen Infiltraten, sondern auch mit apoptotischen Oligodendrozyten assoziiert. Bei diesem Läsionssubtyp schien die Demyelinisierung sowohl durch immun-vermittelte (T-Zellen, Makrophagen) als auch durch metabolische (u.a. mitochondriale Dysfunktion, reaktive Sauerstoff-/Stickstoffspezies) Oligodendrozyten-Degeneration angetrieben zu werden [48]. Die Typ IV- („pattern IV“) Läsionen kamen bei nur 1% der MS-Biopsaten vor und waren durch

eine massive nicht-apoptotische Oligodendrozyten-Degeneration charakterisiert. Während bei Typ I und II Läsionen die Remyelinisierung ein häufiges Phänomen war, kam es bei den beiden anderen Läsionssubtypen (III und IV) kaum zur Rekrutierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und zur Remyelinisierung. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die unterschiedlichen Mechanismen der Oligodendrozyten-Degeneration in den verschiedenen Subpopulationen sein [48]. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten Ergebnisse aus einer *in vitro* Studie zeigen, dass eine Hemmung des Komplex IV der Atmungskette die Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen inhibiert [51]. Trotz der interindividuellen Heterogenität zeigt sich bei den meisten MS Patienten eine intraindividuelle Homogenität der aktiven Läsionstypen – es scheint, dass bei einem bestimmten Patienten ein führender immunopathologischer Muster über die Zeit dominiert [52].

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV
T-Zellen	+	+	+	+
Makrophagen	+	+	+	++
C9neo	-	++	-	-
Immunoglobuline	-	++	-	
Perivenöse Demyelinisierung	+	+	-	±
Oligodendrozyten-Apoptose	-	-	+	-
Remyelinisierung	++	++	-	-

Table 3: Histopathologische Merkmale der MS-Läsion-Subtypen – in Anlehnung an [50]: C9neo – Komplementfaktor C9; Während die Läsionsentstehung und -progression der ersten 2 Läsionstypen vermutlich durch immun-vermittelte Oligodendroglipathie angetrieben wird, spielen bei der Entstehung und Progression der Typ III Läsionen zusätzliche metabolische Faktoren, die eine Oligodendrozyten-Apoptose auslösen.

Der Oligodendrozyten-Verlust scheint eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Progression der entzündlichen Läsionen sowie der Pathogenese der Multiplen Sklerose zu spielen. Die genauen Mechanismen, die zur Läsionsbildung im ZNS führen, sind jedoch trotz intensiver Forschung bis heute nur ansatzweise verstanden. Die ursprüngliche und am weitesten akzeptierte Hypothese für die Entstehung der MS ist die sogenannte „outside-in“ Hypothese (Abbildung 4). Diese besagt, dass autoreaktive Lymphozyten gegen (noch) unbekannte Myelinantigene von zentraler Bedeutung für die Krankheitsentstehung sind. Diese setzen eine Immunkaskade in Gang und führen letztendlich zu Demyelinisierung und axonaler Schädigung [53]. Der entzündliche Charakter der Erkrankung lässt sich u.a. durch die für eine Entzündung typischen laborchemischen und radiologischen Veränderungen bei MS Patienten (Tabelle 1) sowie Daten aus histopathologischen Studien und genomweiten Assoziationsstudien gut dokumentieren [8, 50]. Weiterhin greifen alle zurzeit verfügbaren Medikamente über diverse

Mechanismen in die Funktionsweise der Immunzellen ein (Tabelle 2). Obwohl die Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese der Erkrankung unstrittig ist, bestehen einige Widersprüchlichkeiten, die gegen eine primäre autoimmune Genese und für die sog. „inside-out“ Hypothese (Abbildung 4) sprechen. Ein Beispiel dafür ist die begrenzte Wirksamkeit der verlaufsmodifizierenden Pharmakotherapie gegen die Behinderungszunahme [54]. Obwohl die immunmodulierenden Medikamente hochwirksam hinsichtlich der Reduktion der Schubfrequenz und der Neuroinflammation bei der RRMS sind, ist deren Wirksamkeit bei den progredienten Formen der Erkrankung nur gering bis mäßig (Tabelle 2) [5]. Diese klinische Beobachtung deutet auf zusätzliche Faktoren, die zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen und kaum durch die zurzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsoptionen beeinflusst werden können.

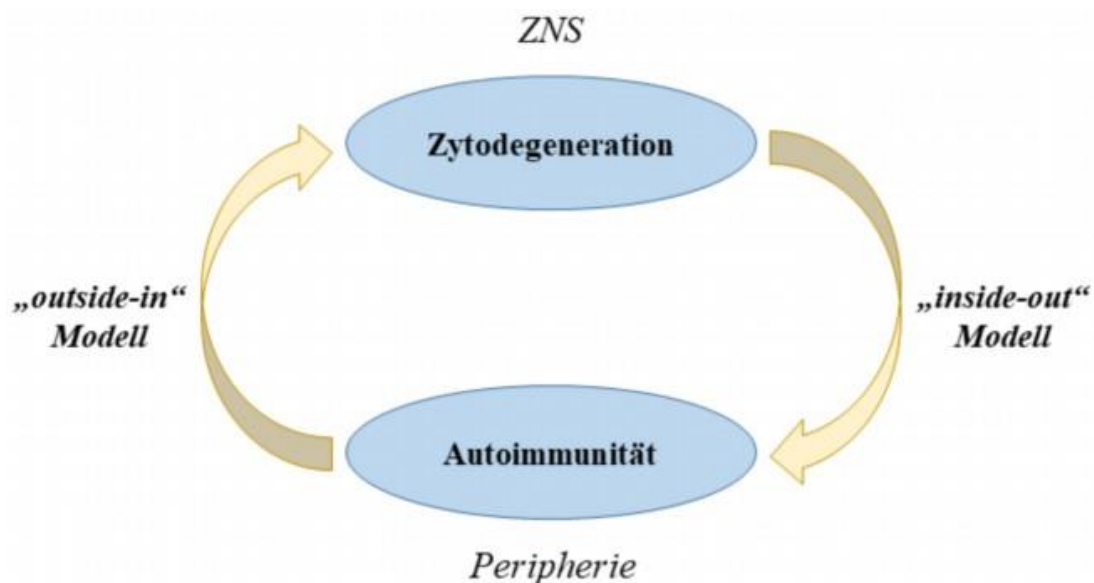


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Erklärungsmodelle für die Entstehung der MS – in Anlehnung an [54]: Laut dem „outside-in“ Modell löst eine primäre autoimmune Antwort eine sekundäre zytodegenerative Kaskade im zuvor intakten ZNS aus. Das „inside-out“ Modell besagt, dass eine primäre ZNS-intrinsische zytodegenerative Kaskade zu einer sekundären Immunantwort im ZNS von Personen mit autoimmuner Veranlagung führt.

Das „inside-out“ Modell besagt, dass zu Beginn der Erkrankung, der nicht mit der ersten klinischen Manifestation zu verwechseln ist, ZNS-intrinsische zytodegenerative Prozesse stattfinden. Diese lösen eine **sekundäre** Immunantwort bei Personen mit autoimmuner Diathese aus [54]. Die initialen zytodegenerativen Kaskaden könnten die Oligodendrozyten und deren Biomembran betreffen und eine große Menge an Antigenen mit hohem immunogenem Potential (z.B. basisches Myelinprotein, Myelinlipide) freisetzen [55]. Die direkt oder indirekt durch Autoantigene rekrutierten autoreaktiven Immunzellen lösen eine neuroinflammatorische Kaskade aus. Diese verstärkt wiederum die initiale Oligodendrozyten- und ggf.

Neurodegeneration. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten Rodriguez et al. in einer Pionierarbeit Hirnbiopsate von MS-Patienten in Frühstadien ultrastrukturell untersuchen und Evidenz für eine sog. „dying-back“ Oligodendrogliopathie sammeln [56]. Bei dieser Art der Oligodendrozyten-Degeneration sind morphologische Abnormalitäten (Erweiterung und Akkumulation von Organellen) nur am distalen Ende der Oligodendrozytenfortsätze (innerste Myelinscheide) nachweisbar. Das proximale Segment der Myelinscheide sowie das Axon sind dabei (noch) intakt. Bei einer immun-vermittelten Oligodendrogliopathie würde man im Gegensatz dazu erwarten, dass zuerst die äußerste Myelinscheide geschädigt wäre. Außerdem tritt die „dying-back“ Oligodendrogliopathie häufig außerhalb von Entzündungsherden auf und spricht somit für eine nicht inflammatorische Genese des Oligodendrozytenuntergangs. Ein ähnliches Phänomen wird auch bei einer Intoxikation mit dem Kupferchelator Cuprizone beobachtet [57]. Neuere histopathologische Studien lieferten weitere Evidenz für das „inside-out“ Modell der Läsionsbildung. Barnett und Prineas konnten das ZNS von Patienten mit fulminant verlaufender MS und somit sehr frühen aktiven Läsionen (Stunden – Tage) untersuchen. In diesen perakuten Läsionen konnte man apoptotische Oligodendrozyten und aktivierte Mikrogliazellen mit ganz wenigen Lymphozyten oder Myelin-Phagozyten nachweisen. Sowohl die Myelinscheiden als auch die Neurone erschienen in diesen Läsionen intakt [58]. Andere Autoren haben jedoch vorgeschlagen, dass die Patienten, die Barnett und Prineas in ihrer Studie beschrieben haben, an Neuromyelitis-optica-Spektrum-Störungen und nicht an MS gelitten haben [48]. Unabhängig davon konnten Daten von anderen Laboren eindeutig zeigen, dass die demyelinisierende Kaskade bei MS-Patienten prinzipiell mit Oligodendrozyten-Degeneration und gleichzeitiger Mikroglia-Aktivierung beginnen kann [59]. Trotz uneinheitlicher Nomenklatur handelt es sich bei den beschriebenen Läsionen („präaktive“/„langsam expandierende“/„schwelende“ Läsionen) wahrscheinlich um gleiche histopathologische Entitäten [60, 61]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Henderson et al., die in frühen, prä-phagozytären Läsionen Oligodendrozyten-Verlust, -Apoptose und fokale Mikrogliose mit nur wenigen peripheren Immunzellen finden konnten [62]. Im Einklang mit diesen Daten konnten unsere und andere Arbeitsgruppen kürzlich zeigen, dass Oligodendrozyten-Degeneration und Mikrogliose im Prinzip eine sekundäre periphere Immunzellinvasion unter bestimmten experimentellen Bedingungen auslösen können [63, 64]. Andere Autoren haben sogar vorgeschlagen, dass die Formierung dieser frühen Läsionen mit metabolischem Oligodendrozyten-Stress (z.B. durch mitochondriale Dysfunktion, freigesetzte Hitzeschockproteine, reaktive Stickstoffspezies) beginnt [60, 65]. Das kann insbesondere bei

Typ III Läsionen (Tabelle 3) der Fall sein, bei denen Oligodendrozyten-Apoptose ein zentrales histopathologisches Merkmal ist. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten Veto, Acs et al. zeigen, dass mitochondriale Schädigung, die u.a. durch die Aktivierung der poly(ADP-Ribose)-Polymerase vermittelt wird, entscheidend für die Oligodendrozyten-Apoptose in MS Läsionen ist [66].

Unabhängig davon, ob der Oligodendrozytenuntergang das initiale Ereignis ist, führen die in die Peripherie freigesetzten immunogenen Myelinbestandteile höchstwahrscheinlich zur Rekrutierung peripherer Leukozyten, wie Monozyten, Granulozyten, T-Zellen und B-Zellen. Diese wandern über die gestörte Blut-Hirn-Schranke ins ZNS und führen zur Läsionsprogression [67].

Eine weitere (noch) nicht so gut etablierte Route zur Leukozytenmigration ist über das Plexus-choroideus-Stroma [68]. Der Plexus choroideus ist ein vaskuläres Konvolut in den Hirnventrikeln, das aus Epithelzellen (sog. Ependymzellen), fenestrierten Blutgefäßen und Stroma besteht [69]. Zu dessen Hauptfunktionen zählen die Produktion von Liquor cerebrospinalis und die Formierung der Blut-Liquor-Schranke. Neulich gewonnene Erkenntnisse weisen auf eine zentrale Rolle des Plexus choroideus bei der Immunüberwachung im ZNS [70]. Außerdem korreliert die Anzahl und der Subtyp der Immunzellen im Liquor cerebrospinalis mit der Anzahl der ZNS-Läsionen und der Krankheitsprogression bei MS Patienten [71]. Leukozyten können i.d.R. aus der Blutbahn über fenestrierte Kapillaren ins Plexus-choroideus-Stroma gelangen [72]. Dort interagieren sie mit den ansässigen MHC-II-exprimierenden dendritischen Zellen und Makrophagen und werden durch diese wahrscheinlich moduliert [73]. Zunehmende Evidenz deutet darauf hin, dass im Rahmen der Neuroinflammation die Chemokinexpression (z.B. CCL20, IL-13, IL-10) der Plexus-Epithelzellen induziert wird. Diese Chemokine schaffen ein pro-inflammatorisches Milieu, das vermutlich die transepitheliale Leukozytenmigration (z.B. CCR6⁺CD4⁺T-Zellen) über den Liquor cerebrospinalis ins ZNS erleichtert [68, 74]. Obwohl dieser Migrationsweg in der Literatur weniger beachtet ist, spielt der Plexus choroideus vermutlich eine Rolle bei der Immunzellinvasion ins ZNS im Rahmen der Multiplen Sklerose.

Unabhängig von der Migrationsroute ist die Infiltration des ZNS durch Immunzellen ein typisches histopathologisches Merkmal der MS Läsionen. Im Rahmen der Läsionsentstehung und -progression nehmen wir ein intensives Zusammenspiel nicht nur zwischen Gliazellen, sondern auch zwischen den Gliazellen und den rekrutierten Immunzellen an [75]. Dies kann insbesondere auf die Typ III Läsionen zutreffen, bei denen sowohl apoptotische

Oligodendrozyten als auch Immunzellinfiltrate vorkommen (Tabelle 3). Der hohe Energieumsatz sowie der geringe Anteil an anti-oxidativen Enzymen der Oligodendrozyten machen sie für oxidativen Stress besonders anfällig. So können beispielsweise pro-inflammatorische Zytokine (Lymphotoxin, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$) die u.a. durch aktivierte Mikrogliazellen sezerniert werden, pro-apoptotische Signalwege bei den Oligodendrozyten in Gang setzen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Oligodendrozyten sowie deren Vorläuferzellen nicht nur Opfer, sondern auch zentrale Regulatoren der Neuroinflammation im Rahmen der MS sind [75]. Kirby et al. konnten in einem MS-Mausmodell zeigen, dass das durch Astrozyten freigesetzte $IFN\gamma$ ein bestimmtes Expressionsprofil (Immunoproteasom, MHC-I) bei den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen induziert, das mit Antigenprozessierung und -präsentation assoziiert ist [76]. Das führt zu einer Interaktion zwischen den MHC-I-exprimierenden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und den $CD8^+$ T-Zellen im Sinne von Antigenpräsentation, die letztendlich in Degeneration der präsentierenden Zellen mündet und die Remyelinisierung dadurch verhindert. Weitere präklinische Studien haben gezeigt, dass gestresste Oligodendrozyten (z.B. durch metabolische Störungen, oxidativen Stress, Inflammation) zur Neuroinflammation beitragen, indem sie beispielsweise Mikrogliazellen aktivieren und rekrutieren [77]. Obwohl die rekrutierten Mikrogliazellen zur Oligodendrozyten-Degeneration und Demyelinisierung beitragen können, sind sie auch in der Lage die Remyelinisierung zu fördern [75]. Die Phagozytose der Myelinbestandteile nach Demyelinisierung durch die Mikroglia ist eine Voraussetzung für die Rekrutierung und Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen [78]. Zusammenfassend weisen zahlreiche präklinische und histopathologische Studien auf ein intensives und komplexes Zusammenspiel zwischen gestressten Oligodendrozyten und den restlichen Hirnzellen sowie peripheren Immunzellen auf, die zur Entstehung demyelinisierender Läsionen beitragen. Die Mechanismen, über die die gestressten Oligodendrozyten mit peripheren Immunzellen im ZNS interagieren, sind nicht so gut verstanden wie die Interaktionssignalwege bei den Immunzellen. Diese Tatsache spiegelt sich auch im MS-Behandlungsarmamentarium eindeutig wider (Tabelle 2), das vor allem die Immunzellensignalwege beeinflusst. Dies könnte zum Beispiel durch Mangel an geeigneten präklinischen Modellen erklärt werden.

1.4.Mausmodelle der Multiplen Sklerose

MS ist eine Erkrankung, die nur bei Menschen vorkommt, weswegen kein singuläres Tiermodell die Komplexität der Erkrankung widerspiegeln kann. Trotzdem sind präklinische Modelle ein unverzichtbares Werkzeug zur Untersuchung einzelner pathophysiologischer

Aspekte der MS. Weiterhin erlauben uns präklinischen Modelle die Testung neuer Behandlungsansätze *in vivo* – ein unerlässlicher Schritt vor der Translation in die klinische Praxis [79].

Die am häufigsten verwendeten Tiermodelle im Bereich der MS-Forschung sind die Modelle, die unter dem Begriff der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zusammengefasst sind. Im Rahmen der EAE lösen autoreaktive T-Zellen eine inflammatorische Kaskade aus, die in Neurodegeneration und Demyelinisierung im Bereich des Rückenmarks, des Kleinhirns und des optischen Nervs mündet [80]. Das Vorderhirn ist dabei weniger stark betroffen [81]. Die EAE gilt deswegen als ein Modell, das die autoimmunen Aspekte der Multiplen Sklerose gut widerspiegelt. Klinisch imponieren i.d.R. eine von kaudal nach rostral progrediente Parese bis zur Plegie sowie progrediente Ataxie. Zur Induktion einer aktiven EAE werden die Tiere (oft C57BL/6 Mäuse) mit einem Myelinantigen (z.B. Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein₃₅₋₅₅ oder MOG₃₅₋₅₅), das mit komplettem Freund-Adjuvans (CFA) emulgiert wurde, subkutan immunisiert [59]. Eine anschließende Injektion mit Pertussis-Toxin (PTX) sorgt für eine Potenzierung der Krankheitsschwere [79]. Abhängig vom verwendeten Myelinantigen und von der Tierart bzw. dem Mausstamm entwickeln die Tiere eine monophasisch-akute, monophasisch-chronische, schubförmige oder sekundär progrediente EAE [82]. Auf zellulärer Ebene werden die Myelinantigene nach der Immunisierung durch lokale Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen, prozessiert und Teile davon auf die MHC-II Rezeptoren präsentiert. Die Antigen-präsentierenden Zellen wandern dann zu sekundären lymphatischen Organen, wo sie mit naiven CD4⁺ T-Zellen interagieren und diese zu enzephalitogenen Th1- und Th17-Zellen differenzieren [59]. Diese autoreaktiven T-Zellen infiltrieren dann das ZNS über die Blut-Hirn-Schranke bzw. die Blut-Liquor-Schranke und werden durch ZNS-Antigen-präsentierende Zellen reaktiviert. Im Anschluss setzen sie durch die Produktion zahlreicher Zytokine (IFN γ , IL-17, IL-21, IL-22) eine entzündliche Kaskade in Gang, die über die Rekrutierung weiterer peripherer und ansässiger Immunzellen zur Neurodegeneration und zur Demyelinisierung führen [83]. Insgesamt hat sich die EAE als ein exzellentes Werkzeug zur Untersuchung der Rolle des adaptiven Immunsystems bei der Oligodendrogliepathie und der Formierung von MS Läsionen bewiesen. Die ZNS-intrinsischen zytodegenerativen Mechanismen, die zur Läsionsentstehung beitragen und möglicherweise für die Behinderungszunahme zuständig sind, können mittels der EAE nur bedingt untersucht werden. Diese Tatsache hat zur Etablierung weiterer *in vivo* Modelle geführt, die durch MS-Forscher verwendet werden.

Ein weiteres gebräuchliches MS-Tiermodell ist das toxische Demyelinisierungsmodell „Cuprizone“. Eine Intoxikation mit dem Kupferchelator Cuprizone [Bis-(cyclohexanon)-oxaldihydrazone] induziert stufenweise selektiven Oligodendrozyten-Stress, Oligodendrozyten-Apoptose und Demyelinisierung in der weißen und grauen Substanz des Gehirns [84, 85]. Im Gegensatz zur EAE entstehen die Läsionen beim Cuprizone-Modell in verschiedenen Bereichen des Vorderhirns, darunter dem Corpus callosum (CC). Das Rückenmark bleibt dabei zum großen Teil intakt [86]. Obwohl die neurotoxischen Eigenschaften des Kupferchelators Cuprizone schon seit den 1970er bekannt sind, sind die genauen Mechanismen, die zur Oligodendrozyten-Degeneration führen, nach wie vor unklar [87]. Frühere morphologische Studien von Cuprizone-intoxikierten Mäusen konnten u.a. eine Vergrößerung der Mitochondrien der Oligodendrozyten feststellen [88]. Aufgrund dieser Beobachtung und der chelatbildenden Eigenschaften von Cuprizone entstand die Hypothese, dass die Oligodendrogliopathie durch Störungen der Atmungskette bedingt und somit metabolischer Genese ist [87]. Im Einklang mit dieser Hypothese konnten Acs et al. zeigen, dass kupferhaltige Enzyme wie der mitochondriale Komplex IV und die Superoxiddismutase eine veränderte Aktivität nach Cuprizone-Intoxikation nachweisen [89]. Ein reiner Kupfermangel kann jedoch weder die morphologischen noch die biochemischen Veränderungen replizieren, die durch Cuprizone-Intoxikation herbeigeführt werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Kupfermangel-Hypothese allein die mitochondriale Dysfunktion, die zur Oligodendrogliopathie führt, nicht erklären kann. Neuere Studien zeigen, dass weitere Faktoren wie pro-inflammatorische Zytokine, Stress des endoplasmatischen Retikulums und oxidativer Stress zur Oligodendrozyten-Degeneration beim Cuprizone-Modell beitragen [90-92]. So erscheinen die ersten apoptotischen Oligodendrozyten im Corpus callosum (CC) schon wenige Tage nach Beginn der Intoxikation mit 0,25% Cuprizone (Abbildung 5). Der Oligodendrozyten-Stress bzw. -Apoptose werden i.d.R. durch Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten begleitet [59]. Die metabolische Oligodendrozyten-Degeneration schreitet bei fortlaufender Cuprizone-Gabe fort bis die ersten Zeichen der Demyelinisierung und der axonalen Schädigung gegen Ende der 3. Woche in Erscheinung treten. Außerdem werden die begleitenden Mikrogliose und Astrozytose prominenter und bewirken zusammen mit der beginnenden Demyelinisierung die Aktivierung und Rekrutierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die die geschädigten Oligodendrozyten ersetzen. Am Ende der 5. Wochen nach Initiierung der Cuprizone-Intoxikation ist die akute Demyelinisierung vollendet. Diese wird durch komplette Demyelinisierung des Corpus callosum, axonale

Schädigung, Mikrogliose, Astrozytose und Aktivierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen gekennzeichnet [2]. Bei der Formierung der demyelinisierenden Läsionen im Rahmen des Cuprizone-Modells spielt das erworbene Immunsystem nur eine untergeordnete Rolle. Diese Eigenschaften machen das Tiermodell zu einem exzellenten Werkzeug zur Untersuchung der Folgen einer primären metabolischen Oligodendrozyten-Degeneration *in vivo*.

Zur Überprüfung der „inside-out“ Hypothese und Untersuchung der Folgen der metabolisch-induzierten Demyelinisierung auf das Immunsystem wurde das sogenannte Cup/EAE-Modell entwickelt, das eine zeitversetzte Kombination aus dem toxischen Demyelinisierungsmodell Cuprizone und dem autoimmun-vermittelten Modell EAE darstellt [81]. Im Rahmen dieses Protokolls wurden zur Induktion einer Demyelinisierung der Vorderhirne C57BL/6 Mäuse zuerst 3 Wochen lang mit 0,25% Cuprizone intoxiciert. Im Anschluss daran erhielten die Tiere 2 Wochen lang normales Futter ohne Cuprizone und wurden zum Beginn der 6. Woche aktiv mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Diese Immunisierung hatte die Generierung von Myelin-autoreaktiven T-Zellen zum Zweck [93]. Man konnte zahlreiche entzündliche Läsionen in den durch Cuprizone demyelinisierten Vorderhirnen der MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäuse finden. Diese Läsionen wurden u.a. durch Unterbrechung der perivaskulären Glia limitans, Immunzellinvasion, fokale Demyelinisierung und axonale Schädigung gekennzeichnet [64]. Das Cup/EAE-Modell ist somit ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung der Mechanismen zur Rekrutierung von peripheren Immunzellen ins ZNS nach etablierter schwerer Demyelinisierung. Die oben genannten frühen MS Läsionen („präaktiv/langsam expandierend/schwelend/prä-phagozytär“) zeigen jedoch auf histopathologischer Ebene kaum Demyelinisierung, sondern bloß Oligodendrozyten-Degeneration und Mikroglia-Aktivierung [59]. Man könnte spekulieren, dass die Interaktionskaskaden zwischen diesen (prä-)apoptotischen Oligodendrozyten und den Immunzellen von zentraler Bedeutung für die Läsionsentstehung und -progression bei der MS sind. Ein wesentlicher Nachteil dieses seriellen Cup/EAE-Protokolls ist somit die Tatsache, dass man solche Interaktionen nicht unmittelbar untersuchen kann.

Histopathologische Merkmale der Cuprizone-Läsionen

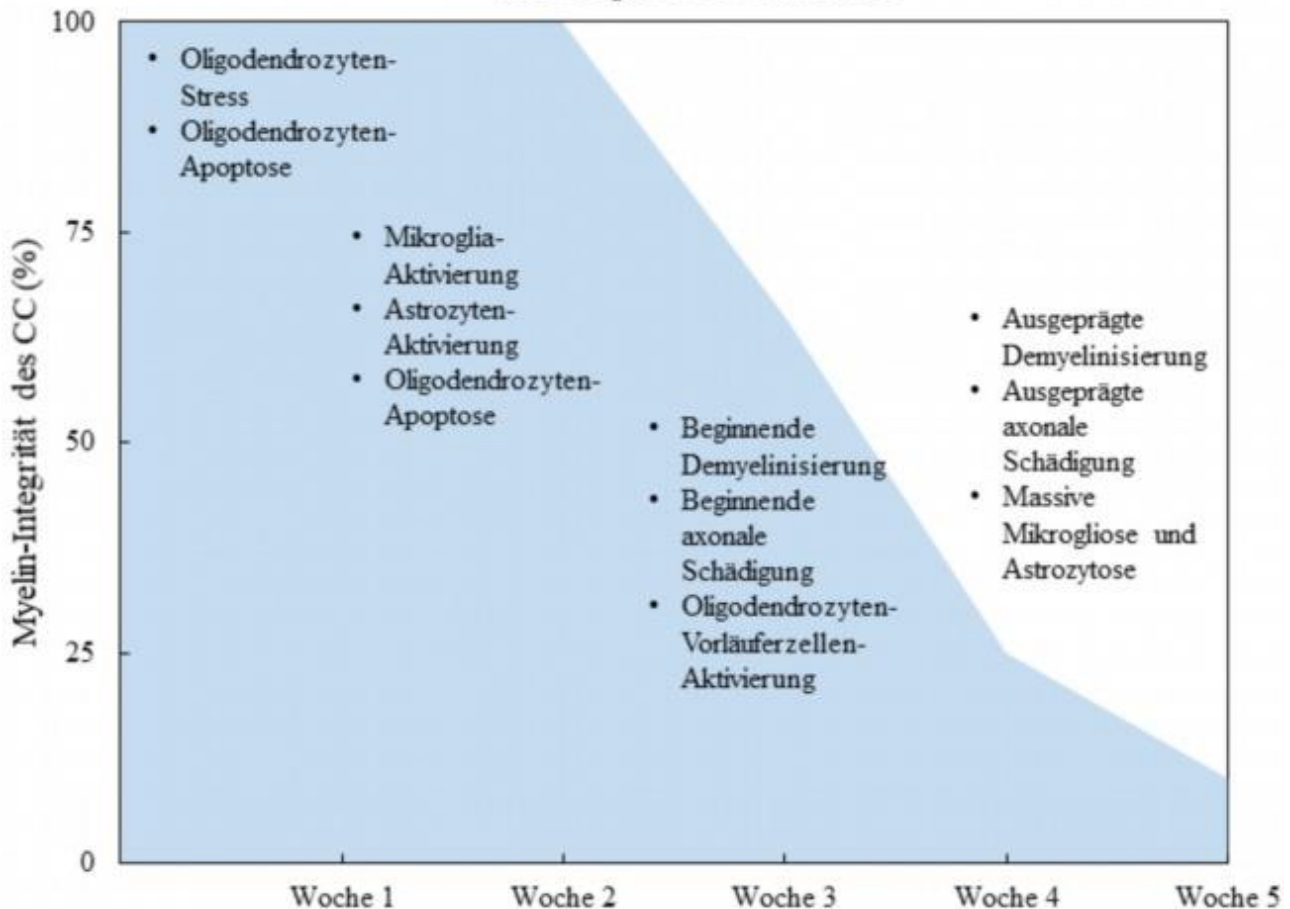


Abbildung 5: Schematische Abbildung der histopathologischen Merkmale der Cuprizone-induzierten ZNS-Läsionen - in Anlehnung an [2]. Die x-Achse zeigt die Dauer der Cuprizone-Gabe. Die y-Achse bzw. die blaue Fläche stellt die Myelin-Integrität des Corpus callosum in % dar. Der initiale Cuprizone-bedingte metabolische Oligodendrozyten-Stress löst eine Oligodendrozyten-Apoptose aus, die innerhalb von Wochen in schwere Demyelinisierung übergeht. Begleitend treten Mikrogliose, Astrozytose und axonale Schädigung in Erscheinung.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Oligodendrozyten-Degeneration ist ein zentrales histopathologisches Merkmal der Multiplen Sklerose und spielt höchstwahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Ätiopathogenese der Erkrankung [94]. Für den Oligodendrozyten-Untergang sind u.a. zwei führende Mechanismen zuständig – die ZNS-intrinsischen metabolischen zytodegenerativen Kaskaden und Schädigungen durch autoreaktive, periphere Immunzellen. Ein besseres Verständnis des Zusammenspiels dieser zwei Mechanismen ist für das Aufhalten der Krankheitsprogression von großer Bedeutung. Geeignete Tiermodelle, die die genaue Untersuchung dieser Kaskaden ermöglichen, werden deswegen dringend gebraucht. Meine Studie hat daher zum Ziel, anhand eines neu etablierten Tiermodells die folgenden Hypothesen zu untersuchen:

- Eine gleichzeitige Cuprizone-Intoxikation ermöglicht eine adäquate anti-MOG₃₅₋₅₅-Immunantwort in C57BL/6 Mäusen.
- Milde Cuprizone-induzierte Oligodendroglieopathie führt zur peripheren Immuneinvasion in die Vorderhirne MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse.
- Cup+EAE Vorderhirnläsionen teilen histopathologische Merkmale mit Typ III MS-Läsionen.
- Das Plexus-choroideus-Stroma fungiert als Invasionsroute für periphere Immunzellen.

2. Material und Methoden:

2.1. Versuchstiere:

Für die hier beschriebenen Versuche wurden 10-Wochen-alte weibliche C57BL/6 Mäuse (N=16) von „Janvier-Labs“, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich verwendet. Es wurden maximal 4 Tiere pro Käfig (Fläche: 435 cm²) mit *ad libitum* Futter und Wasser in einer keimfreien Umgebung gehalten. Die Tiere wurden nur einmal pro Woche umgesetzt, damit sie keinem zusätzlichen Stress ausgesetzt wurden. Mikrobiologische Überwachungen wurden gemäß den Empfehlungen der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)“ durchgeführt. In der Tierhaltung wurden die folgenden Bedingungen gewährleistet: Tag/Nacht Zyklus (12h/12h), Temperatur von 22°C ± 2°C, eine regelmäßige Luftzirkulation und eine standardisierte Luftfeuchtigkeit von 50% ± 10%. Die Durchführung der Tierversuche wurde von Regierung Oberbayern (Referenznummer: 55.2-154-2532-73-15; Deutschland) nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt.

2.2. Cuprizone-Intoxikation:

Um eine gezielte Degeneration von Oligodendrozyten im Vorderhirn zu induzieren, wurden die Mäuse mit 0,25% Cuprizone [Bis-(cyclohexanon)-oxaldihydrazone] gefüttert, wie von unserer Arbeitsgruppe schon beschrieben [95]. Die Cuprizone-Intoxikation wurde erst nach Erreichen eines Zielkörpergewichts von 18-20 g begonnen.

Zur Vorbereitung der 0,25% Cuprizone-Mischung wurden zunächst je 7 Cuprizone-Ansätze (jeweils 0,8 g) für eine Woche mithilfe von Präzisionswaagen gemessen, in sterile 50 ml - Zentrifugenröhrchen (VWR, Deutschland; 525-0402) eingeschüttet und im Kühlschrank bei Temperatur von 4°C bis zum Tag der Fütterung gelagert. Dabei durfte der Cuprizone-Pulver

nicht mit Metall in Kontakt kommen. Anschließend wurden 7 Plastikbehälter mit je 320 g gemahlenem Standardfutter gefüllt und trocken gelagert. Der Futteransatz (320 g) wurde täglich mit dem Kupferchelator (0,8 g) mithilfe eines kommerziell verfügbaren Standmixers (WMF Kult X Küchenmaschine, 1000 W, 2 l) homogenisiert (1 min.; Stufe 2). Während des Mischvorgangs wurde das Gerät zusätzlich manuell geschüttelt, damit das Futter optimal durchmischt werden konnte. Die 0,25% Cuprizone-Futter-Mischung wurde im Anschluss in Petrischalen (Roth, Deutschland; EN16.1) auf die Käfige gleich verteilt (80 g auf 2 Petrischalen pro Käfig, 20 g pro Tier).

2.3.MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung und Evaluation klinischer Defizite:

Um die Formierung enzephalitogener T-Zellen in peripheren Lymphorganen zu induzieren, wurde eine aktive EAE bei den Mäusen durchgeführt. Für eine erfolgreiche EAE-Induktion ist es entscheidend, dass man bei allen Immunisierungsschritten den Stress, dem die Mäuse ausgesetzt werden, minimiert. Nach Lieferung wurden die Tiere deswegen in den Tierstall gebracht, wo sie sich eine Woche akklimatisierten. Die aktive Immunisierung erfolgte mit einem einsatzbereiten Kit (Hooke KitTM MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion PTX; EK-2110; PTX Lot: 1006) von „Hooke Laboratories“. Alle Komponenten vom Kit wurden vor der Applikation gekühlt aufbewahrt. Für die Zubereitung des Pertussis-Toxins (PTX) wurde dieses am Tag der Immunisierung in „Phosphate-Buffered Saline“-Puffer (PBS) gelöst. Die Konzentration des im PBS gelösten PTX betrug 2 ng/µl und die Gesamtdosis pro Applikation 200 ng in 100 µl PTX/PBS-Mischung.

Die Immunisierung erstreckte sich über 2 Tage. Am ersten Tag der Immunisierung oder „Tag 0 *post* Immunisierung“ (p.i.) wurden die Mäuse unter flacher bis mitteltiefer Narkose mit Isofluran subkutan (s.c.) in den zervikalen Bereich sowie in den lumbalen Bereich dorsal mit jeweils 0,1 ml MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion (insgesamt 0,2 ml) immunisiert. Nach ca. 30 Minuten erfolgte ohne Narkose eine intraperitoneale (i.p.) Applikation von 100 µl PTX/PBS-Lösung. Die gleiche PTX-Dosis wurde 24 Stunden später (Tag 1 p.i.) wiederholt i.p. verabreicht.

Das erstmalige Auftreten und die Progression motorischer Defizite können als klinische Surrogatparameter für die Entzündungsaktivität im Rückenmark von EAE-Tieren genutzt werden [96]. Deswegen wurde in unserer Studie der Grad der motorischen Behinderung bei den Mäusen täglich ab dem 5. Tag p.i. nach einem etablierten Scoring-Protokoll durch einen erfahrenen Gutachter (Tabelle 4) bestimmt.

Score	Klinische Beobachtung
0,0	<p>Keine offensichtlichen Veränderungen der motorischen Funktionen im Vergleich zu nicht immunisierten Mäusen.</p> <p>Wenn die Maus an der Schwanzwurzel gehoben wird, ist der Schwanz aufrecht und der Schwanzmuskeltonus normal. Die hinteren Extremitäten werden i.d.R. gespreizt gehalten. Das Gangbild und die Kopfhaltung sind unauffällig.</p>
0,5	<p>Die Schwanzspitze ist schlaff.</p> <p>Wenn die Maus an der Schwanzwurzel gehoben wird, ist der Schwanzmuskeltonus der Schwanzspitze erniedrigt. Die Schwanzbasis bewegt sich weiterhin.</p>
1,0	<p>Der komplette Schwanz ist schlaff.</p> <p>Wenn die Maus an der Schwanzwurzel gehoben wird, fehlt der Schwanzmuskeltonus und der Schwanz wird nicht mehr bewegt. Die hinteren Extremitäten werden i.d.R. gespreizt gehalten.</p>
1,5	<p>Der komplette Schwanz ist schlaff und die hinteren Extremitäten in der Bewegung eingeschränkt.</p> <p>Wenn die Maus an der Schwanzwurzel gehoben wird, fehlt der Schwanzmuskeltonus und der Schwanz wird nicht mehr bewegt. Wenn die Maus auf ein Gitter gesetzt wird, fällt mindestens eine Hintergliedmaße ständig durch. Das Gangbild ist leicht wackelig.</p>
2,0	<p>Schlaffer Schwanz und Parese der hinteren Extremitäten.</p> <p>Wenn die Maus an der Schwanzwurzel gehoben wird, werden die hinteren Extremitäten nicht mehr gespreizt, sondern eng nebeneinander gehalten. Das Gangbild ist eindeutig wackelig, die Zehen einer Pfote werden schleppend hinterhergezogen, während die andere Gliedmaße motorisch unauffällig bleibt.</p> <p>ODER</p> <p>Die Maus hat einen Score von 0, aber der Kopf neigt stark zu einer Seite und das Gleichgewicht ist gestört.</p>
2,5	<p>Schlaffer Schwanz und Schleppen der hinteren Extremitäten.</p> <p>Beide Hintergliedmaßen werden schleppend hinterhergezogen, können sich aber noch bewegen.</p> <p>ODER</p> <p>Monoplegie einer Hintergliedmaße, die andere bewegt sich weiterhin.</p> <p>ODER</p> <p>Der Schweregrad der Erkrankung scheint mild zu sein, wenn die Maus gehoben wird (Score: 0,0 – 1,5), aber der Kopf neigt stark zu einer Seite und die Maus fällt gelegentlich um.</p>

3,0	<p>Schlaffer Schwanz und Paraplegie der hinteren Extremitäten (am häufigsten).</p> <p>ODER</p> <p>Schlaffer Schwanz und fast vollständige Lähmung der hinteren Extremitäten. Eine oder beide Hintergliedmaße(n) können sich noch bewegen, aber nicht mehr vor die Hüfte.</p> <p>ODER</p> <p>Schlaffer Schwanz und vollständige Lähmung einer hinteren und einer vorderen Extremität.</p> <p>ODER</p> <p>Alle aufgelisteten:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Massive Kopfneigung zu einer Seite, - Gehen nur entlang der Ränder des Käfigs, - Die Maus drückt sich gegen die Wand des Käfigs, - Die Maus dreht sich, wenn sie an der Schwanzwurzel gehoben wird.
3,5	<p>Schlaffer Schwanz und Paraplegie der hinteren Extremitäten. Zusätzlich:</p> <p>Die Maus bewegt sich im Käfig umher, kann sich aber nicht mehr umdrehen, wenn sie auf den Rücken gelegt wird. Die hinteren Extremitäten werden eng nebeneinander auf einer Seite des Körpers gehalten.</p>
4,0	<p>Schlaffer Schwanz, Paraplegie der hinteren und Parese der vorderen Extremitäten.</p> <p>Die Maus bewegt sich minimal im Käfig, wirkt aber wach und ernährt sich noch.</p> <p>Oft wird eine Euthanasie empfohlen, falls die Maus einen Score von 4,0 für 2 Tage bekommt. Im Fall von Euthanasie wird der Maus einen Score von 5,0 bis zum Ende des Experiments gegeben.</p>
4,5	<p>Paraplegie der hinteren und Paraparese der vorderen Extremitäten, keine Bewegung im Käfig. Die Maus wirkt nicht mehr wach.</p> <p>Eine Euthanasie wird empfohlen.</p>
5,0	<p>Die Maus rollt sich spontan im Käfig (Euthanasie wird empfohlen).</p> <p>ODER</p> <p>Die Maus wird tot durch Lähmung aufgefunden.</p> <p>ODER</p> <p>Die Maus wird wegen schwerer Lähmung euthanasiert.</p>

Table 4: *Evaluierungsprotokoll für EAE-Mäuse nach „Hooke Laboratories“*

Bei der Progression motorischer Behinderung besteht die Gefahr, dass sich der Zustand der Mäuse rasch durch Exsikkose und Unterernährung verschlechtert. Deswegen erhielt jede Maus in unserer Studie eine subkutane Injektion mit 1,0 ml Ringer-Lösung, sobald sie einen Score von 2,5 erreicht hat.

Der Parameter „maximaler klinischer Score“ wurde als der höchste Score definiert, den jede einzelne Maus zu einem beliebigen Zeitpunkt des Experiments erreicht hat. Die Summe (Σ) aller klinischen Scores bei jeder einzelnen Maus wurde berechnet und als „kumulativer klinischer Score“ festgelegt.

Eine genaue Auflistung von Materialien und Chemikalien, die im Tierstall verwendet wurden, wird in Tabelle 5 angegeben.

Materialien/Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Becherglas	VWR, Deutschland	213-1111
Cuprizone [Bis-(cyclohexanon)-oxaldihydrazone]	Sigma-Aldrich, Deutschland	C9012
Kanüle, 27G x 3/4, 0,40 x 20 mm	Praxisdienst, Deutschland	131410
Küchenmaschine, Kult X, 1000 W, 2 l	WMF, Deutschland	-
Labortiereinstreu	Abedd, Deutschland	LTE E-001
Maushäuschen, Polycarbonat	Tecniplast, Deutschland	-
MOG ₃₅₋₅₅ /CFA Emulsion PTX	Hooke Laboratories, USA	EK-2110
Nestlets, 5 x 5 cm	Zoonlab, Deutschland	3097055
Petrischale	Roth, Deutschland	EN 16.1
Ringer-Lösung DAB 7	Serag Wiessner,	E04025
Standardfutter, Maus-Zucht Extrudat	Ssniff, Soest, Deutschland	-
Trinkflasche, Polysulfon, 300 ml	Tecniplasti, Deutschland	ACBT0262SU
Tuberkulinspritze, 1 ml	Praxisdienst, Deutschland	401112
Versuchskäfig, Blue Line – SEALS SAFE	Tecniplast, Deutschland	IVC-1285L
Wägeschale, 46 x 46 x 8	VWR, Deutschland	611-9178
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	VWR, Deutschland	525-0402

Tabelle 5: Auflistung von Materialien und Chemikalien, die bei der Durchführung von Tierversuchen verwendet wurden.

2.4. Versuchsaufbau:

Ziel dieser Arbeit war es, die Folgen der simultanen metabolischen und immun-vermittelten Oligodendrozytendegeneration *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck haben wir das Cuprizone-Modell mit der EAE gleichzeitig kombiniert (Cup+EAE). Hierfür wurden die Mäuse 2 Tage mit 0,25% Cuprizone intoxikiert. Am 3. Tag wurden sie mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert und die Cuprizone-Intoxikation wurde bis zum Ende des Experiments fortgesetzt. Eine weitere Kohorte (EAE) wurde zu demselben Zeitpunkt mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert und mit Standardfutter (keine Cuprizone-Gabe) gefüttert (Abbildung 6). Sie diente als Vergleichsgruppe. Auf dem Höhepunkt der Krankheitsaktivität (Tag 18) wurden die Tiere finalisiert.

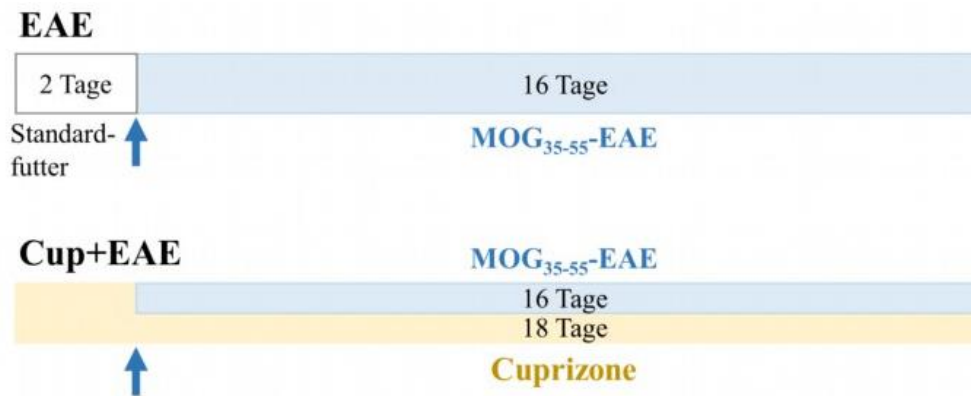


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die blauen Pfeile zeigen den Zeitpunkt der MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung an. Modifiziert nach [94].

2.5. Gewebepräparation und Paraffineinbettung:

Am Ende des Experiments wurden die Mäuse tief mit Ketamin (100 mg·kg⁻¹ i.p.) und Xylazin (10 mg·kg⁻¹ i.p.) anästhesiert und präpariert. Die Präparationsdurchführung wurde erst dann begonnen, wenn das Bewusstsein der Maus erloschen war (*id est*, tiefe Narkose). Als Surrogatmarker dafür dienten die erloschenen Schutzreflexe. Sie wurden von kaudal nach kranial geprüft, indem man mit der Pinzette verschiedene Körperteile (Schwanzwurzel, untere, obere Gliedmaßen) kräftig einklemmte. Daraufhin wurde der Kornealreflex zuerst mechanisch (Pinzette), und dann chemisch (70% Ethanol) geprüft.

Bei fehlender Antwort und nach dem Einsetzen einer typischen Schnappatmung (unregelmäßige Atemzüge) wurde die Maus mithilfe von Stecknadeln bei den Pfoten im Wachsbecken fixiert. Im Anschluss wurden die Bauchdecke und den Thorax mit einer feinen Schere eröffnet und es wurde einen kleinen Schnitt im rechten Herzvorhof gemacht. Durch den geöffneten Vorhof konnte das Blut während der transkardialen Perfusion austreten. In einem nächsten Schritt wurde der linke Herzventrikel mit einer Perfusionskanüle (Tabelle 8) punktiert und den Kreislauf mit 20 ml eiskaltem 1x PBS (pH = 7,40; Tabelle 6) gespült. Um eine optimale Fixation des Nervengewebes (durch Quervernetzung der Proteine) zu gewährleisten, wurden dann die Mauskörper mit 2 x 50 ml eiskalter Perfusionslösung (pH = 7,40; Tabelle 6) durchgespült.

Lösungen	Ansetzen von Lösungen	
PBS (10x Stocklösung)	477,75 g 5 l	PBS-Pulver ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ destilliertes Wasser
PBS (1x Stocklösung)	500 ml 4500 ml	10x PBS destilliertes Wasser
Perfusionslösung (1 l)	100 ml 900 ml 4,6 g 8,0	Formaldehydlösung destilliertes Wasser NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 1 mol/l NaOH zum Einstellen von pH (Zielwert = 7,40)
EDTA, 20%	80 g 400 ml	EDTA destilliertes Wasser 40% NaOH zum Einstellen von pH (Zielwert = 7,40)

Tabelle 6: Herstellung von Lösungen, die bei der transkardialen Perfusion verwendet wurden.

Anschließend wurde der Kopf vom Rumpf abgetrennt und die Schädelkalotte eröffnet, damit die Formalinslösung (Perfusionslösung) besser zum Gehirn gelangen konnte. Die Wirbelsäule mit dem Rückenmark wurde grob vom Rumpf herauspräpariert. Jedes Präparat wurde dann in je ein 50 ml – Falcon Röhrchen verpackt und dieses mit Perfusionslösung aufgefüllt. Sie wurden für 24 h bei 4°C postfixiert.

Schritt	Materialien/Chemikalien	Dauer
1	Leitungswasser, fließend	6 h
2	50% Ethanol	über Nacht
3	70% Ethanol	40 min
4	70% Ethanol	40 min
5	96% Ethanol	40 min
6	96% Ethanol	40 min
7	96% Ethanol	40 min
8	100% Ethanol	40 min
9	100% Ethanol	60 min
10	100% Ethanol	60 min
11	Xylol	40 min
12	Xylol	40 min
13	Xylol	40 min
14	Paraffin	60 min
15	Paraffin	60 min
16	Paraffin	2 Tage

Tabelle 7: Schritte bei Paraffineinbettung der Proben.

Nach der Postfixation wurde das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel herausgenommen, in Gewebekassetten verpackt und mindestens 6 h in Leitungswasser gewässert, damit die restlichen Formaldehydreste komplett entfernt werden konnten. Anschließend wurden die Gehirnpräparate mit Ethanol und Xylol (Tabelle 7) dehydriert und mithilfe eines Einbettautomaten (Leica ASP 200S; Leica Mikrosystem, Deutschland; 39602012) in Paraffinblöcke (VWR, Deutschland; 1.07158) eingebettet (Tabelle 7).

Die Rückenmarkpräparate wurden am Tag nach der Postfixation fein präpariert, indem anliegende Rückenmuskulatur und Rippen mechanisch entfernt wurden. Als Nächstes wurden sie mindestens 6 h in Leitungswasser gespült und für 48 h in 20% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bei 37°C entkalkt. Daraufhin wurden die Proben wiederholt in fließendem Leitungswasser ausgespült (mindestens 12 h) und dehydriert. Jedes Rückenmark wurde in drei gleich große Teile geschnitten und diese in je einen Paraffinblock eingebettet (Tabelle 7).

Die Paraffinblöcke wurden dann in ein Schlittenmikrotom (Leica SM2000 R; Leica Mikrosystem, Deutschland) eingespannt und 5µm dicke Paraffinschnitte mit Mikrotomklingen (S35; pfm medical, Deutschland; 207500000) angefertigt. Die Paraffinschnitten wurden anschließend in ein bei 45°C vorerhitztes Wasserbad (Leica Biosystems, HI1210; Leica Mikrosystem, Deutschland) geglättet. Daraufhin wurden jeweils zwei Paraffinschnitte (2x1 Hirnschnitte bzw. 2x3 Rückenmarkschnitte) auf einen Objektträger (Tabelle 8) platziert (Abbildung 7). Zum Schluss wurden die Schnitte zuerst bei Raumtemperatur und danach bei 48°C über Nacht getrocknet, bevor sie weiter (immun-) histochemisch oder immunfluoreszent gefärbt werden konnten.

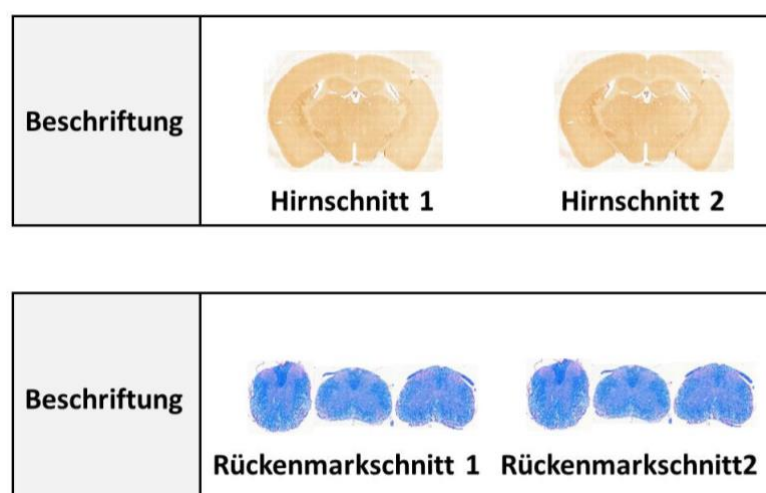


Abbildung 7: Platzierung der Hirnschnitte bzw. Rückenmarkschnitte auf den Objektträgern.

Materialien/Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Bienenwachs, gelb	Roth, Deutschland	5830.2
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	Merck Millipore, Deutschland	106580
Einbettkassette, ohne Deckel	VWR, Deutschland	720-2243
Einmalspritze, 20 ml	Hartenstein, Deutschland	S23
Einmalspritze, 50 ml	Hartenstein, Deutschland	S24
Einweg-Wägeschale, 46 x 46 x 8 mm	VWR, Deutschland	611-9178
Ethanol	CLN, Deutschland	1006.9025
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deutschland	03685
Formaldehydlösung, min. 37%, säurefrei	Merck Millipore, Deutschland	1039991000
Laborflasche, 1000 ml	VWR, Deutschland	215-1557
Laborflasche, 2000 ml	VWR, Deutschland	215-1558
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	Merck Millipore, Deutschland	106349
Natriumhydroxid (NaOH), 1 mol/l	Roth, Deutschland	K02.1
Natriumhydroxid (NaOH), 40%	Roth, Deutschland	4347.1
Objektträger, Super Frost Plus	VWR, Deutschland	631-0108
PBS-Pulver ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , 5l	Merck Millipore, Deutschland	L 1825-50
Trichter, Ø 150 mm	VWR, Deutschland	221-0182
Vasulfo Perfusionsbesteck, G21, 0,8 x 19 mm	Praxisdienst, Deutschland	602531
Xylol	VWR, Deutschland	28975.462

Tabelle 8: Materialien/Chemikalien, die bei der Gewebepräparation und Paraffineinbettung verwendet wurden.

2.6. Histologische Färbungen:

2.6.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E):

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist ein histochemisches Standardverfahren zur Darstellung von Gewebemorphologie und pathologischen Veränderungen. In unserer Studie haben wir diese Methode verwendet, um die Gehirne der Mäuse auf (1) apoptotische Oligodendrozyten und (2) entzündlichen Immunzellinfiltrate zu untersuchen.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blutholzbaum. Sein Derivat Alaunhämatoxylin bzw. „Hämalaun“ färbt basophile Strukturen wie die DNA in den Zellkernen und die Ribosomen blau an. Bei Eosin handelt es sich um einen synthetischen sauren Farbstoff. Durch seine chemischen Eigenschaften färbt er eosinophile Zell- und Gewebeanteile wie Mitochondrien und Kollagen rot an. Zur Herstellung der Hämalaun- und Eosinlösung siehe Tabelle 9.

Lösungen	Ansetzen von Lösungen
Mayers Hämalaunlösung	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, Deutschland; H3136-25G) in 1000 ml destilliertes Wasser lösen • 200 g Natriumiodat (Merck, Deutschland; 106525) und 50 g Kalumaluminiumsulfat Dodecahydrat (Kalialaun) (Merck, Deutschland; 101042) unter Schütteln zugeben (Farbton: blauviolett) • 50 g Chloralhydrat als Stabilisator (Sigma-Aldrich, Deutschland, 15307) und 1 g Zitronensäure Monohydrat (Merck, Deutschland, 1.00244.0500) zugeben (Farbton: rotviolett)
Eosinlösung, 0,1%	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g Eosin G (Merck, Deutschland, 115935) in 100 g destilliertes Wasser lösen, dann 1:10 verdünnen (Eosin 0,1%) und pro 100 ml 1 Tropfen Eisessig (Merck, Deutschland, 1.00063.1000) zugeben

Tabelle 9: Ansetzen von Hämalaun- und Eosinlösung.

Zur Färbung wurden die Schnitte zuerst entparaffiniert, rehydriert (Tabelle 10) und dann für 7 min in Mayers Hämalaunlösung inkubiert. Im Anschluss wurden sie kurz (4 - 5 s) in destilliertes Wasser gespült und unter fließendem Leitungswasser für 10 min gebläut. Dann wurden die Hirnschnitte wieder kurz in destilliertes Wasser gespült und 5 min in 0,1% Eosinlösung gefärbt. Zum Schluss erfolgte eine Dehydrierung (Tabelle 10) und Eindeckung der Schnitte mit DePeX Medium (Serva, Deutschland, 18243.01).

Entparaffinierung	Entwässerung vor Eindeckung
<ol style="list-style-type: none"> 1) Xylol I - 10 min (Merck, Deutschland, 1.08681.1000) 2) Xylol II – 10 min 3) Xylol III – 10 min 4) 50/50% Xylol/Ethanol-Gemisch – 5 min 5) 100% Ethanol - 3 min (CLN, Deutschland, 1006.9025) 6) 100% Ethanol - 3 min 7) 96% Ethanol – 3 min 8) 96% Ethanol – 3 min 9) 70% Ethanol – 3min 10) 50% Ethanol – 3 min 11) Destilliertes Wasser – 3 min 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Destilliertes Wasser – 4–5 s 2) 70% Ethanol – 4-5 s 3) 80% Ethanol – 4-5 s 4) 96% Ethanol – 1 min 5) 100% Ethanol – 2 min 6) 100% Ethanol – 2 min 7) 50/50% Xylol/Ethanol-Gemisch – 5 min 8) Xylol I – 10 min 9) Xylol II – 10 min

Tabelle 10: Schritte bei Entparaffinierung und Entwässerung vor Eindeckung bei H&E Färbung.

2.6.2. Luxol-Fast-Blue/Periodsäure-Schiff (LFB/PAS) Färbung:

Die LFB/PAS – Färbung ist eine häufig verwendete histochemische Methode zur Darstellung von Myelinscheiden im ZNS. In unserer Studie haben wir dieses Verfahren zur Untersuchung von (1) Demyelinisierungsschaden im Großhirn und (2) Immunzellinfiltration in die weiße Substanz vom Rückenmark benutzt.

Zuerst wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert (Tabelle 10, nur bis zum Schritt 8) und über Nacht in 0,1% Luxol-Fast-Blue-Lösung (Tabelle 11) inkubiert. Luxol-Fast-Blue ist ein basischer, Alkohol-löslicher Kupfer-Phtalocyanin-Farbstoff, der an das Neurokeratin der Markscheiden über die Cholinbausteine der Phospholipide bindet. Er ist wegen der Bildung von großen Polymerisationsaggregaten mit dem Gewebe nur schwer zu lösen.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte in 0,025% oder 0,005% Lithiumcarbonat (Tabelle 11) differenziert (d.h. das Gewebe verliert ein Teil der Farbintensität zur besseren Darstellung der weißen Substanz). Hierfür wurden die Schnitte zuerst kurz in 96% Ethanol und dann kurz in destilliertes Wasser gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte für 10 s in 0,025% Lithiumcarbonat-Lösung gehalten und dann für mindestens 10 min in 70% Ethanol weiterdifferenziert. Danach wurden die Schnitte zur Unterbrechung der Differenzierung kurz in destilliertes Wasser gespült und der Differenzierungsgrad wurde bei jedem Schnitt mithilfe eines Mikroskops kontrolliert. Eine optimale Differenzierung liegt i.d.R. vor, wenn die graue Substanz (z.B. der Kortex) farblos/grau ist und die weiße Substanz (z.B. der Corpus callosum) – blau/türkis. Die Schnitte, die weiter differenziert werden mussten, wurden zu der 0,005% Lithiumcarbonat-Lösung für 10 s gegeben und anschließend mikroskopisch kontrolliert. Nach der kompletten Differenzierung aller Schnitte wurden sie kurz in destilliertes Wasser gespült und 2 min in 0,5% Periodsäure oxidiert.

Die PAS („periodic acid-Schiff stain“)-Reaktion ist mit anderen Färbungen wie die LFB-Färbung kombinierbar und färbt Kohlenhydrate wie Polysaccharide und Glykoproteine (insbesondere in der grauen Substanz) rosa. Die Schnitte wurden nach der Oxidation kurz in destilliertes Wasser gespült und im Schiffs Reagenz inkubiert (45 s – 10 min, je nach Frische des Reagenzes). Nach der Inkubation wurden sie 5 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte ca. 20 s in Mayers Hämalaunlösung (Tabelle 9) inkubiert, 5 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Zum Schluss wurden sie kurz in destilliertes Wasser gespült, dehydriert (Tabelle 10) und mit DePeX Medium eingedeckt.

Lösungen	Ansetzen von Lösungen
0,1% Luxol-Fast-Blue-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 g Luxol-Fast-Blue MBS (Chroma, Deutschland, H3136-25G) in 100 ml 96% Ethanol lösen • 0,5 ml 100% Essigsäure (Merck, Deutschland, 1.00063.1000) zugeben
0,05% Lithiumcarbonat-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05 g Lithiumcarbonat (Merck, Deutschland, 5671.0250) in 100 ml destilliertes Wasser lösen und dann weiter 1:5 (0,025%) und 1:10 (0,005%) verdünnen
0,5% Periodsäure-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g Periodsäure (Merck, Deutschland, 524) in 200 ml destilliertes Wasser lösen
Schiffs Reagenz (Frische-Probe)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml 37% Formaldehydlösung in ein Glas einschütten und einige Tropfen des Schiff-Reagenzes (Sigma-Aldrich, Deutschland, 3952016) dazu geben: ein frisches Reagenz schlägt schnell zu einer rot-purpur Farbe um, ein altes reagiert nur langsam und schlägt zu einer blau-purpur Farbe um

Table 11: Ansetzen der Lösungen für die LFB/PAS Färbung.

2.6.3. Immunhistochemische Färbungen und Naphtol AS-D Chloracetat Kit

Bei der Immunhistochemie (IHC) handelt es sich um ein Standardverfahren in der biomedizinischen Forschung, bei der Antigene (z.B. Proteine) in Zellen oder im Gewebe selektiv detektiert und dargestellt werden. In der Grundlagenforschung wird diese Methode oft zur Untersuchung von Verteilung und Lokalisation von Proteinen, die in unterschiedlichen Geweben bzw. Zellen differenziert exprimiert werden. Bei diesem Verfahren werden die Eigenschaften der Antikörper, an Antigene spezifisch zu binden, zu Nutze gemacht. Eine Antikörper-Antigen-Interaktion kann entweder enzymatisch (z.B. durch Peroxidase, siehe Abbildung 8) oder durch Fluorophore (z.B. Fluorescein, siehe Abbildung 9) visualisiert werden. In unserer Studie haben wir die indirekte IHC verwendet, da diese Methode sensitiver beim Nachweis von Antigenen ist.

Im Allgemeinen läuft die indirekte chromogene IHC (Abbildung 8) folgendermaßen ab: (1) der unmarkierte Primärantikörper bindet an das Epitop des Zielantigens im Gewebe; (2) der biotinylierte Sekundärantikörper bindet dann an das Fc-Fragment des Primärantikörpers; (3) Avidin bildet einen Komplex zusammen mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und der Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“ oder HRP); (4) die Meerrettichperoxidase katalysiert die Reduktion vom Wasserstoffperoxid, der dann Diaminobenzidin (DAB) oxidiert; (5) das oxidierte DAB bildet wasser- und alkoholunlösliche braune Präzipitate, die unter Lichtmikroskop visualisiert werden können und somit die Antigen-Antikörper-Interaktion nachweisen.

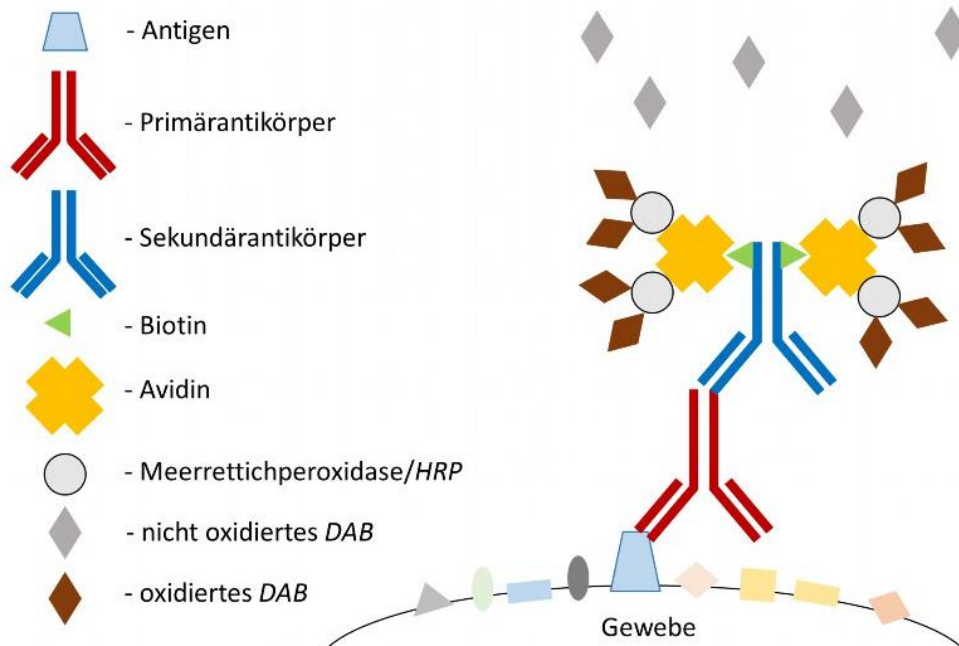


Abbildung 8: Schematische Darstellung der indirekten chromogenen immunhistochemischen Methode.

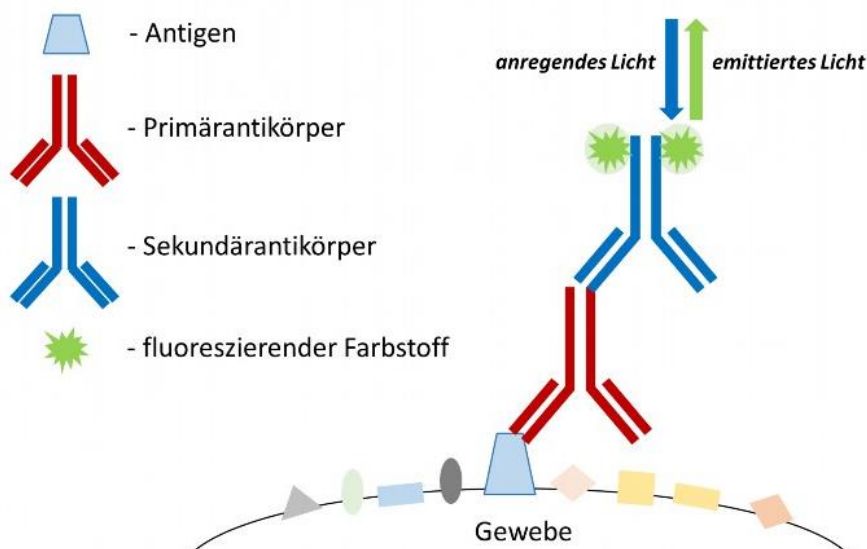


Abbildung 9: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz (IF) (Abbildung 9) ist der Sekundärantikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Der Fluoreszenzfarbstoff absorbiert UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge, und wird dadurch angeregt. Dieser gibt dann UV-Licht höherer Wellenlänge ab, das durch Fluoreszenzmikroskop detektiert wird.

Vor der Färbung wurden die Schnitte zuerst entparaffiniert (Tabelle 12) und rehydriert. Damit der Primärantikörper an das Antigen binden kann, wurde die durch Formaldehyd verursachte Quervernetzung der Proteine im Gewebe rückgängig gemacht („antigen retrieval“). Zu diesem Zweck wurden die Schnitte in Tris/EDTA Puffer (pH=9,0; Tabelle 13) gegeben, in Mikrowelle

für 10-20 min erhitzt („heat induced epitope retrieval“; HIER), dann für ca. 20 min abgekühlt und in 1x PBS-Lösung (3 x 5 min; Tabelle 13) gewaschen.

Entparaffinierung	Entwässerung vor Eindeckung
1) Xylol I - 10 min 2) Xylol II – 10 min 3) Xylol III – 10 min 4) 50/50% Xylol/Ethanol-Gemisch – 5 min 5) 100% Ethanol - 3 min 6) 100% Ethanol - 3 min 7) 96% Ethanol – 3 min 8) 96% Ethanol – 3 min 9) 70% Ethanol – 3min 10) 50% Ethanol – 3 min 11) Destilliertes Wasser – 3 min	1) Destilliertes Wasser – 3 min 2) 50% Ethanol – 3 min 3) 70% Ethanol – 3 min 4) 96% Ethanol – 3 min 5) 96% Ethanol – 3 min 6) 100% Ethanol – 3 min 7) 100% Ethanol – 3 min 8) 50/50% Xylol/Ethanol-Gemisch – 5 min 9) Xylol I – 10 min 10) Xylol II – 10 min 11) Xylol III – 10 min

Tabelle 12: Schritte bei Entparaffinierung und Entwässerung vor Eindeckung bei IHC/IF.

Lösungen	Ansetzen von Lösungen
Tris-EDTA Puffer	<ul style="list-style-type: none"> 6,05 g Tris (Pufferan; Roth, Deutschland, 4855.2) mit 1,85 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland, 03685) in 5 l destilliertes Wasser lösen (pH auf 9,0 einstellen)
PBS (10x Stocklösung)	<ul style="list-style-type: none"> 477,75 g PBS-Pulver ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Merck, Deutschland, L182-50) in 5 l destilliertes Wasser lösen
PBS (1x Fertiglösung)	<ul style="list-style-type: none"> 500 ml PBS (10x Stocklösung) in 4500 ml destilliertes Wasser lösen (pH auf 7,4 einstellen)
5% normal goat serum (Ziege Serum)	<ul style="list-style-type: none"> 2,5 ml normal goat serum (Linears GmbH, Deutschland, S1000) in 47,5 ml PBS (1x) lösen
5% normal donkey serum (Esel Serum)	<ul style="list-style-type: none"> 2,5 ml normal donkey serum (Sigma-Aldrich, Deutschland, D9663) in 47,5 ml PBS (1x) lösen
2% normal donkey serum/CWF/Tween/BSA/ PBS	<ul style="list-style-type: none"> 1 ml donkey serum mit 0,05 g „cold water fish skin gelatin“ (CWF; Sigma-Aldrich, Deutschland, G7041), 0,5 g bovines Serumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Deutschland, A2153), 250 µl 10% Tween 20 in 48,75 ml PBS (1x) lösen
10% Tween 20 (nichtionische Detergenz)	<ul style="list-style-type: none"> 10 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich, Deutschland, P1379) in 90 ml PBS (1x) lösen
0,3% Peroxidase-Block-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> 1 ml Wasserstoffperoxid (30% H₂O₂; Roth, Deutschland, 8070.4) in 99 ml PBS (1x) lösen
ABC-System (Vector Laboratories, PK 6100) für 1000 µl	<ul style="list-style-type: none"> 20 µl Lösung A mit 20 µl Lösung B in 960 ml PBS (1x) lösen

3,3'Diaminobenzidin (DAB; Dako, K3468) für 1000 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 20 µl DAB-Stock in 980 µl DAB-Substrat lösen
DAPI-Lösung für 1000 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Stock A: 10 mg Bisbenzimid – DAPI (Sigma-Aldrich, Deutschland, 14530) in 1 ml destilliertes Wasser lösen • Stock B: 10 µl DAPI Stock A in 1 ml destilliertes Wasser lösen • DAPI-Lösung: 100 µl DAPI Stock B in 900 µl destilliertes Wasser lösen

Tabelle 13: Ansetzen der Lösungen für die IHC/IF.

Eine große Herausforderung bei der IHC und IF ist die Gewährleistung der Spezifität der Färbung. Unspezifisches Hintergrundsignal kommt u.a. durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern und verschiedenen Proteinen im Gewebe vor und verhindert die Interpretation der Ergebnisse. Diese unspezifischen Wechselwirkungen können i.d.R. mit Normalserum (Serum einer Tierspezies, aus dem der Sekundärantikörper stammt) blockiert werden. Nach dem „HIER“-Schritt wurden die Schnitte deswegen für 1 h mit Normalserum (Tabelle 14; 100 µl pro Objektträger - gilt für alle Inkubationslösungen bei der IHC/IF) bei Raumtemperatur (26°C) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit den primären Antikörpern bei 4°C über Nacht. Zur Prüfung der Spezifität der jeweiligen Färbung wurden entsprechende Negativkontrollen angesetzt, wie (1) die Auslassung des Primärantikörpers, (2) die Inkubation mit Isotyp-Kontrolle-Antikörper oder mit (3) dem „falschen“ Sekundärantikörper im Fall der OLIG2/DDIT3 Doppelfärbung. Die Kontrollschnitte wurden bei den Spülungs- (PBS 1x) und Inkubationsschritten (Primär-, Sekundärantikörper, ABC, DAB) immer einzeln inkubiert, damit eine „Kontamination“ mit den primären Antikörpern verhindert werden konnte.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte in 1x PBS-Lösung (3 x 5 min) gewaschen und mit 0,3% Peroxidase-Block-Lösung für 30 min inkubiert. Die Peroxidase-Block-Lösung blockiert die endogenen Peroxidasen in den Gewebeschnitten, die das DAB antikörperunabhängig oxidieren können, und verhindert somit eine unspezifische Färbung. Bei der IF-Färbungen wurde dieser Schritt übersprungen, da die Visualisierung der Antikörper DAB-unabhängig verlief. Danach wurden die Schnitten in PBS gewaschen und mit den sekundären Antikörpern (Tabelle 14) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Erhalt eines starken Fluoreszenzsignals wurden die mit fluoreszierenden Antikörpern inkubierten Schnitten vor UV-Licht geschützt. Bei dem chromogenen Verfahren wurden die Schnitte anschließend in PBS gespült und für 1 h mit Peroxidase-gekoppeltem Avidin-Biotin-Komplex (ABC-System, Tabelle 13) inkubiert. Die Visualisierung der Antigene erfolgte nach der PBS-Spülung durch eine 10-minütigen

Inkubation der Schnitte mit der DAB-Lösung. Im Anschluss wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser und dann für 5 min in destilliertes Wasser gespült.

Antigen	Hersteller	Bestellungsnummer	Wirt	Verdünnung	Methode	RRID
Primäre Antikörper						
APPA4	Merck-Millipore	MAB348	Maus	1:2000	IF	AB_94882
CD3	Abcam	Ab16669	Kaninchen	1:1000	IHC	AB_443425
DDIT3 (GADD153)	Santa-Cruz	sc-575	Kaninchen	1:100	IF	AB_631365
IBA1	Wako	019-19741	Kaninchen	1:5000	IHC	AB_839504
OLIG2	Merck-Milipore	MABN50	Maus	1:100	IF	AB_10807410
Biotinylierte sekundäre Antikörper						
Goat anti-Rabbit IgG	Vector	BA-1000	Ziege	1:200	IHC	AB_2313606
Fluoreszierende sekundäre Antikörper						
Alexa Fluor™ 488	Invitrogen/Life Technologies	A21202	Esel anti-Maus	1:1000	IF	AB_141607
Alexa Fluor™ 594	Invitrogen/Life Technologies	A21207	Esel anti-Maus	1:500	IF	AB_141637
Isotypkontrolle	Hersteller	Bestellungsnummer	Konzentration	Verdünnung	Primärantikörper	RRID
IgG	Abcam	Ab172730	1,775 mg/ml	1:35000	Anti-CD3	AB_2687931

Tabelle 14: Liste mit verwendeten Antikörpern. RRID (Research Resource Identifiers) [97]

Um die Zellkerne zu visualisieren, wurden die Schnitte für ca. 30 s mit Hämalaun (Tabelle 9) gegengefärbt und für weitere 10 min mit fließendem Leitungswasser „gebläut“. Bei der IF wurden die Schnitte mit DAPI-Lösung (Tabelle 13) gegengefärbt. Bei der OLIG2/DDIT3 – Doppelfärbung wurden die Schnitte am 2. Tag mit dem 2. Primärantikörper inkubiert. Am 3. Tag erfolgte die Inkubation mit der 2. Sekundärantikörper (1 h bei Raumtemperatur), und anschließend mit der DAPI-Lösung (10 min bei Raumtemperatur).

Zum Schluss wurden die IHC-Schnitte wie aus Tabelle 12 ersichtlich dehydriert und mit DePeX eingedeckt. Die IF-Schnitte wurden nach der DAPI-Inkubation 2 x 5 min in destilliertes Wasser gespült und mit dem wässrigen Medium Immu-Mount™ (IF; Fisher Scientific, Deutschland, 10662815) eingedeckt. Diese wurden dann bei 4°C gelagert.

Zur Visualisierung von neutrophilen Granulozyten wurde ein Naphtol AS-D Chloracetat Kit (Sigma-Aldrich, Deutschland, 91C) verwendet. Die Färbung basiert auf der enzymatischen Hydrolyse vom Naphtol AS-D Chloracetat durch „spezifische Esterase“, die v.a. von Neutrophilen exprimiert wird. Das freigesetzte Naphtol verbindet sich mit einem

Diazoniumsalz und bildet einen rosa Niederschlag am Ort der Enzymaktivität. Dieser Niederschlag ist dann unter dem Lichtmikroskop sichtbar.

Vor der Färbung wurden die Schnitte zuerst entparaffiniert (Tabelle 12). Die Gewebeschnitte wurden dann mit einer Heißklebepistole umrandet, damit die pipettierten Lösungen auf dem Gewebeschnitt bleiben. Diese wurden anschließend mit der angesetzten Lösung (Tabelle 15) für 2 h bei 37°C inkubiert und danach mit fließendem destilliertem Wasser gespült. Die Kleber wurden vorsichtig entfernt und die Schnitte mit Hämalaun-Färbung (Tabelle 9) gegengefärbt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Deutschland, 109242) eingedeckt.

Chemikalien	Menge pro Objektträger
<ul style="list-style-type: none"> • Fast Red Violet LB (15 mg/ml Fast Red Violet in 0,4 mol/l Salzsäure) • Natriumnitritlösung (0,1 mol/l Natriumnitrit) • TRIZMAL (1 mol/l Trizma™ Maleat; pH=6,3±0,15) • Naphtol AS-D Chloracetat (8 mg/ml Naphtol AS-D Chloracetat) • Destilliertes Wasser 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 µl • 5 µl • 25 µl • 5 µl • 200 µl
Gesamtvolumen	= 240 µl

Tabelle 15: Ansetzen der Neutrophilen Kit-Lösung.

Materialien/Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Pipetten Eppendorf		
Pipettenspitzen 0,1-20 µl	VWR, Deutschland	613-3501
Pipettenspitzen 2-200 µl	VWR, Deutschland	613-3503
Pipettenspitzen 50-1000 µl	VWR, Deutschland	613-3505
Tubes 1,5 ml	VWR, Deutschland	211-2130
Tubes 2,0 ml Eppendorf	VWR, Deutschland	211-2120
Tubes 5,0 ml Eppendorf	VWR, Deutschland	525-0794

Tabelle 16: Materialien/Chemikalien, die bei den histologischen Färbungen verwendet wurden.

2.7. Auswertung histologischer Parameter:

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden entweder mithilfe eines Nikon ECLIPSE E200 Mikroskops (Nikon Instruments, Deutschland), ausgestattet mit einer DS-Vi1 Kamera, oder mit einem Zeiss Mirax Midi Scanner (Zeiss, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland), ausgestattet mit einer Stingray Kamera, digitalisiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mithilfe einer Olympus BX51-Wi Fluoreszenzmikroskop-Station (Olympus, Deutschland) digitalisiert.

Alle histologischen Auswertungen wurden durch mindestens einen geschulten Untersucher durchgeführt, der während der gesamten Analyse hinsichtlich der Behandlungsgruppen verblindet war. Die Rückenmarksanalysen wurden in drei verschiedenen kraniokaudalen Regionen und die Großhirnanalysen auf den Niveaus vom Commissura anterior und vom rostralen Hippocampus jeweils (R215 und R265 nach Sidman et al., 1971; Abbildung 10) durchgeführt.

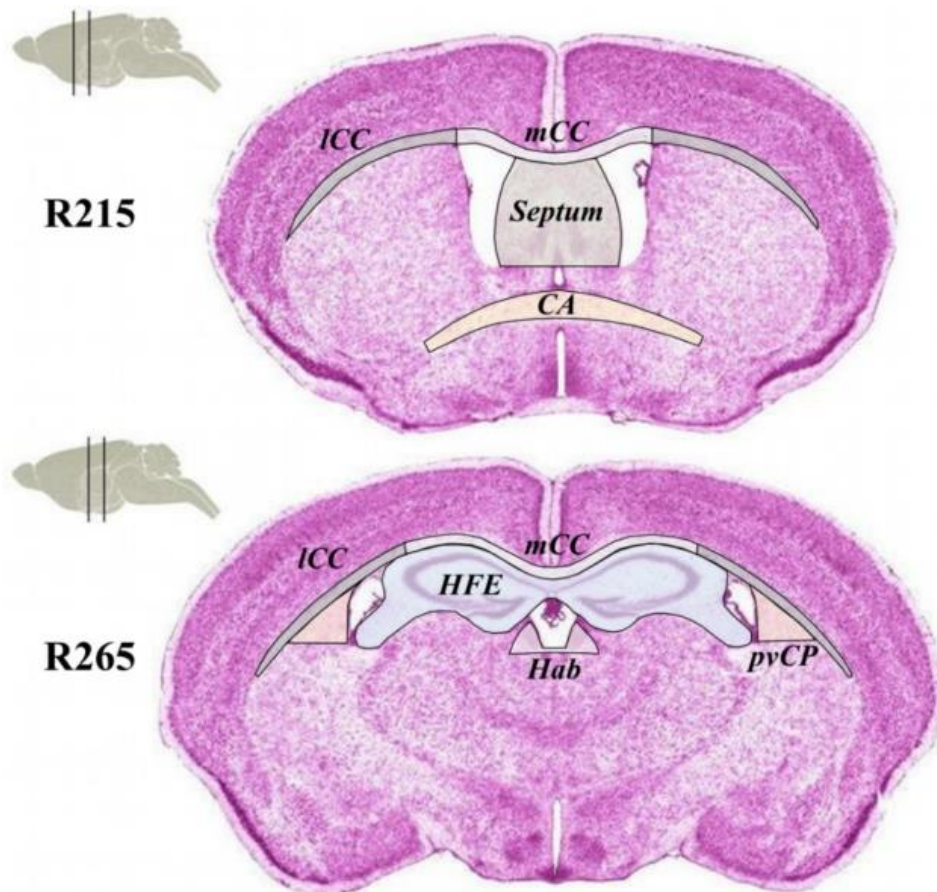


Abbildung 10: Untersuchte Regionen (ROIs) im Vorderhirn: R215 – Region 215 nach Sidman et al., 1971; mCC – mediales Corpus callosum (hellgraue Schattierung); ICC – laterales Corpus callosum (dunkelgraue Schattierung), Septum (hellgrüne Schattierung); CA – Commissura anterior (gelbe Schattierung); R265 – Region 265; HFE – Hippocampus-Fornix-Einheit (hellblaue Schattierung); Hab– Habenula (weiße Schattierung); pvCP – periventrikuläres Caudoputamen (beige Schattierung).

Im Rahmen unserer Studie haben wir das Ausmaß der inflammatorischer Demyelinisierung in LFB/PAS-gefärbten Rückenmarksschnitten quantifiziert, indem wir den durch inflammatorische Zellen infiltrierte Bereich der weißen Substanz zu dem gesamten Bereich der weißen Substanz des jeweiligen Rückenmarksschnitts in Beziehung gesetzt haben

(Infiltrationsindex, in %; Abbildung 11). Diese Auswertung wurde mit Hilfe von dem Open-Source Programm ViewPoint Online (PreciPoint, Deutschland) durchgeführt.

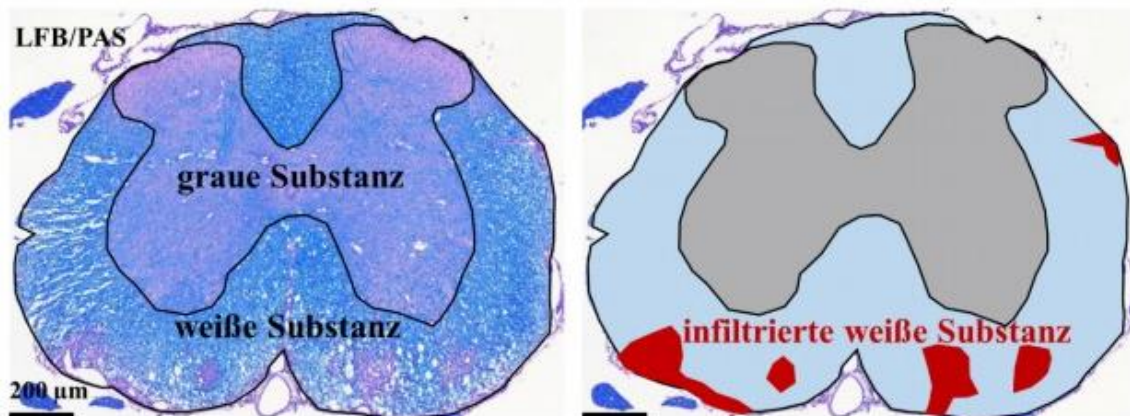


Abbildung 11: Infiltrationsindex. Zur Berechnung des Infiltrationsindex wurde die Fläche der infiltrierten weißen Substanz (rote Fläche) durch die Fläche der gesamten weißen Substanz (hellblaue Fläche + rote Fläche) geteilt.

Die Zell- bzw. Partikeldichten (anti-CD3, anti-APP4, Esterase-positive Zellen, anti-OLIG2/DDIT3, und apoptotische Körperchen) wurden quantifiziert, indem man den zu untersuchenden Bereich (engl. „region of interest“; ROI) manuell mit ViewPoint Online, und bei IF mit dem Software Stereo Investigator (MBF Bioscience Williston, USA) umrandete. Die Flächen der ROI wurden durch die entsprechenden Programme automatisch berechnet. Die positiven Zellen bzw. Partikel wurden dann von dem Untersucher markiert, deren Summe durch die entsprechende Fläche geteilt und als Zellen/mm² bzw. Partikel/mm² angegeben.

Die Anzahl der perivaskulären Infiltrate (Zellanhäufungen um Venülen herum; H&E) und die Neutrophilendichte (Esterase⁺ Zellen) im Vorderhirn wurden in R215 und R265 innerhalb des gesamten Gewebeschnitts quantifiziert. Die T-Zellen (anti-CD3), die apoptotischen Zellkörper (H&E), die gestressten, prä-apoptischen Oligodendrozyten (anti-OLIG2/DDIT3) und die Mikrogliazellen/Monozyten (anti-IBA1) wurden im Bereich des Corpus callosums (CC) quantifiziert. Zur Untersuchung der putativen Rekrutierung von peripheren Immunzellen durch das Plexus choroideus-Stroma ins Hirnparenchym wurden Zelldichten (T-Zellen und Neutrophilen) auch innerhalb vom Septum (R215) und von der Hippocampus-Fornix-Einheit (bestehend aus hippocampaler Formation, Fimbria, Alveus und dorsalem Fornix; R265) quantifiziert (Abbildung 10).

Der Grad der Demyelinisierung im Bereich des CC wurde durch drei verblindete Untersucher semiquantitativ evaluiert, indem jeweils pro Schnitt einen Score zwischen 0 und 100 vergeben wurde. Dabei entspricht der Score von 0 einer histologisch kompletten Demyelinisierung des

CC, wie nach 13 Wochen Cuprizone-Intoxikation, und der Score von 100 – eines intakten CC, wie bei einer gesunden Maus (Abbildung 12). Der Durchschnitt der durch die drei Untersucher vergebenen Scores wurde dann für jedes Tier ermittelt.

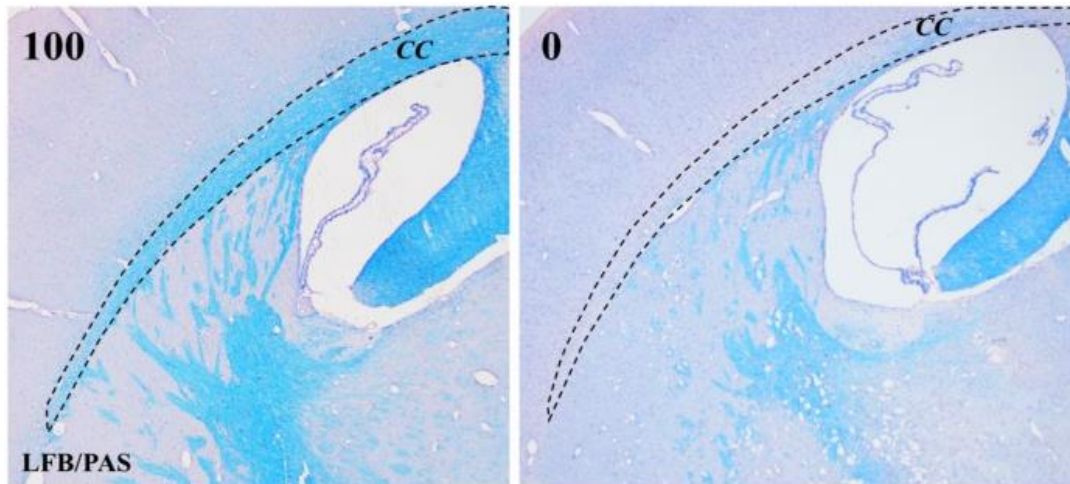


Abbildung 12: Repräsentative Bilder eines intakten Corpus callosum (CC; Score: 100) und eines komplett demyelinisierten CC wie nach 13 Wochen Cuprizone-Gabe (Score: 0). Die umrandeten Bereiche zeigen die Grenzen des CC.

2.8. Statistische Auswertung:

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM – „Standard error of mean“) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen wurden statistisch mit Hilfe des Softwarepakets GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA) getestet. Die Gaußsche Verteilung der Daten wurde mit Hilfe von „D’Agostino-Pearson omnibus test“ geprüft. Die angewendeten statistischen Tests und die Anzahl der ausgewerteten Proben (n) sind der jeweiligen Abbildungslegende zu entnehmen. p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die folgenden Symbole wurden zur Darstellung des Signifikanzniveaus verwendet: *p $\leq 0,05$; **p $\leq 0,01$; ***p $\leq 0,001$; ns – nicht signifikant.

3. Ergebnisse:

3.1. Adäquate anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort in C57BL/6-Mäusen trotz synchroner Cuprizone-Gabe:

Studien wie diese von Mana et al. [98] haben auf eine immunsuppressive Wirkung des Kupferchelators Cuprizone hingewiesen. Das ist bei dessen Kombination mit der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis besonders relevant, da die EAE ein immunvermitteltes Demyelinisierungsmodell darstellt.

In einem ersten Schritt haben wir deswegen untersucht, ob die immunisierten Mäuse eine adäquate anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort trotz gleichzeitiger Cuprizone-Intoxikation entwickeln. 87,5% der Tiere aus der EAE-Gruppe (7/8) und 50% der Tiere aus der Cup+EAE-Gruppe (4/8) zeigten nach der Immunisierung typische klinische Zeichen einer entzündlichen ZNS-Erkrankung. Der Krankheitsbeginn war gleich für beide Gruppen: ~ am 11. Tag nach der Immunisierung. Insgesamt zeigte sich eine Tendenz zum milderen klinischen Verlauf bei der mit Cuprizone intoxikierten Kohorte im Vergleich zur Kohorte, die kein Cuprizone erhalten hat (Abbildung 13). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf den kumulativen klinischen Score (EAE, $8,063 \pm 1,574$ vs. Cup+EAE, $3,750 \pm 1,421$; $p = 0,149$) sowie auf den maximalen klinischen Score (EAE, $1,875 \pm 0,375$ vs. Cup+EAE, $0,750 \pm 0,284$; $p = 0,0549$) erreichten jedoch das Signifikanzniveau nicht (Abbildung 13).

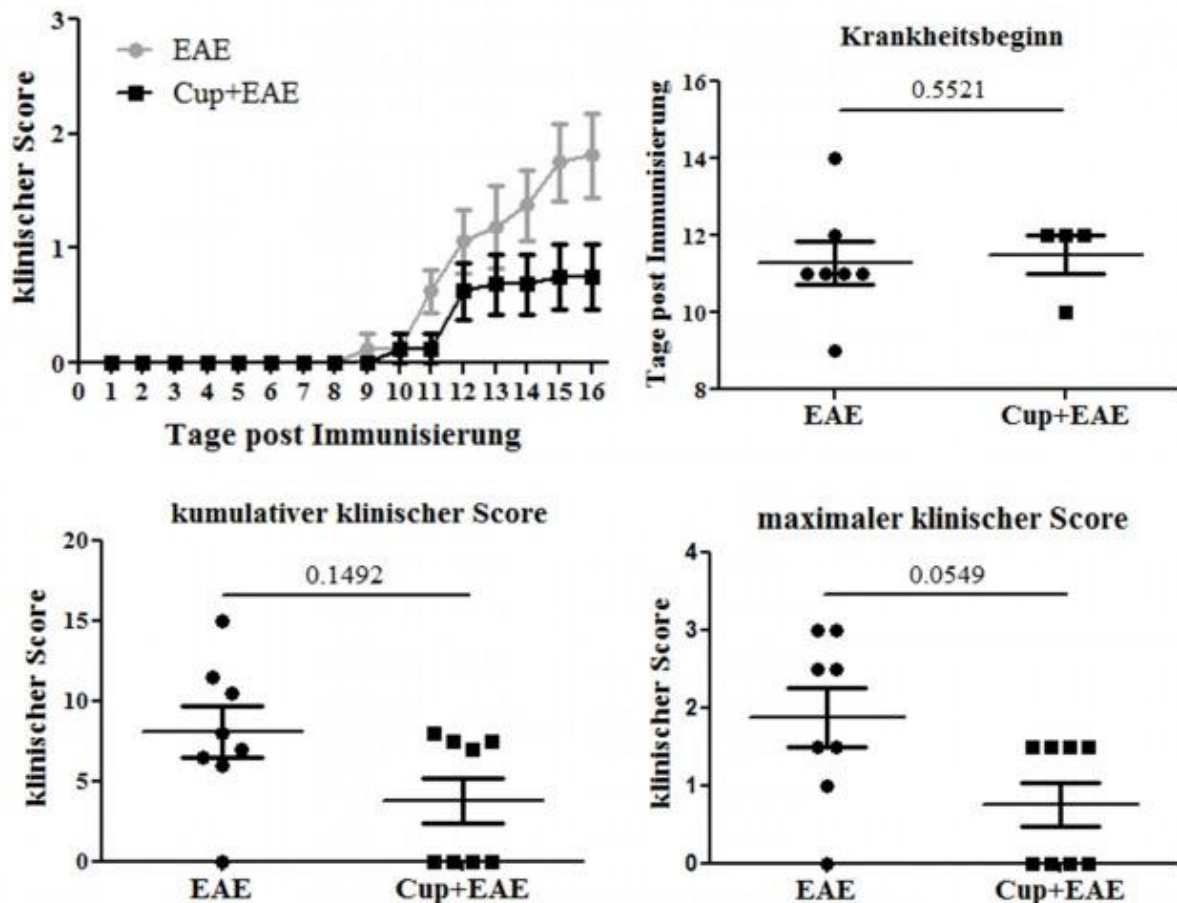


Abbildung 13: Krankheitsverlauf von EAE (N=8) und Cup+EAE (N=8) Mäusen. Auswertung der klinischen Parameter „Krankheitsbeginn“, „kumulativer klinischer Score“ und „maximaler klinischer Score“. Bei der Auswertung vom „Krankheitsbeginn“ wurden nur die Mäuse eingeschlossen, die einen klinischen Score entwickelten. Bei der Auswertung der Parameter „kumulativer klinischer Score“ und „maximaler klinischer Score“ wurden alle Tiere eingeschlossen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe von Mann-Whitney Tests auf statistische Signifikanz geprüft.

In Übereinstimmung mit der Tendenz zu einem milderen klinischen Verlauf der mit Cuprizone intoxikierten Mäusen, zeigte sich der Anteil der durch Immunzellen infiltrierte weißen Substanz (Infiltrationsindex) deutlich niedriger in der Cup+EAE-Gruppe im Vergleich zur EAE-Gruppe (EAE, $10,35 \pm 2,223\%$ vs. Cup+EAE, $1,178 \pm 0,366\%$; $p < 0,0001$) (Abbildung 14 A, B). Die Dichte der CD3⁺ T-Lymphozyten (EAE, $195,40 \pm 32,07$ Zellen/mm² vs. Cup+EAE, $51,57 \pm 16,00$ Zellen/mm²; $p = 0,0001$) sowie der axonalen APPA4⁺ Sphäroide (EAE, $87,92 \pm 21,37$ Sphäroide/mm² vs. Cup+EAE, $20,44 \pm 5,22$ Sphäroide/mm²; $p = 0,0008$) in der weißen Substanz waren ebenfalls signifikant niedriger in der Cup+EAE-Kohorte im Vergleich zu diesen in der EAE-Kohorte (Abbildung 14 C, D, E, F). Obwohl die synchrone Cuprizone-Intoxikation die EAE-typische Entzündung im Rückenmark abgeschwächt hat, verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Entstehung enzephalitogener T-Zellen potent stattfindet, und dass diese Lymphozyten potenziell ins Telenzephalon migrieren könnten.

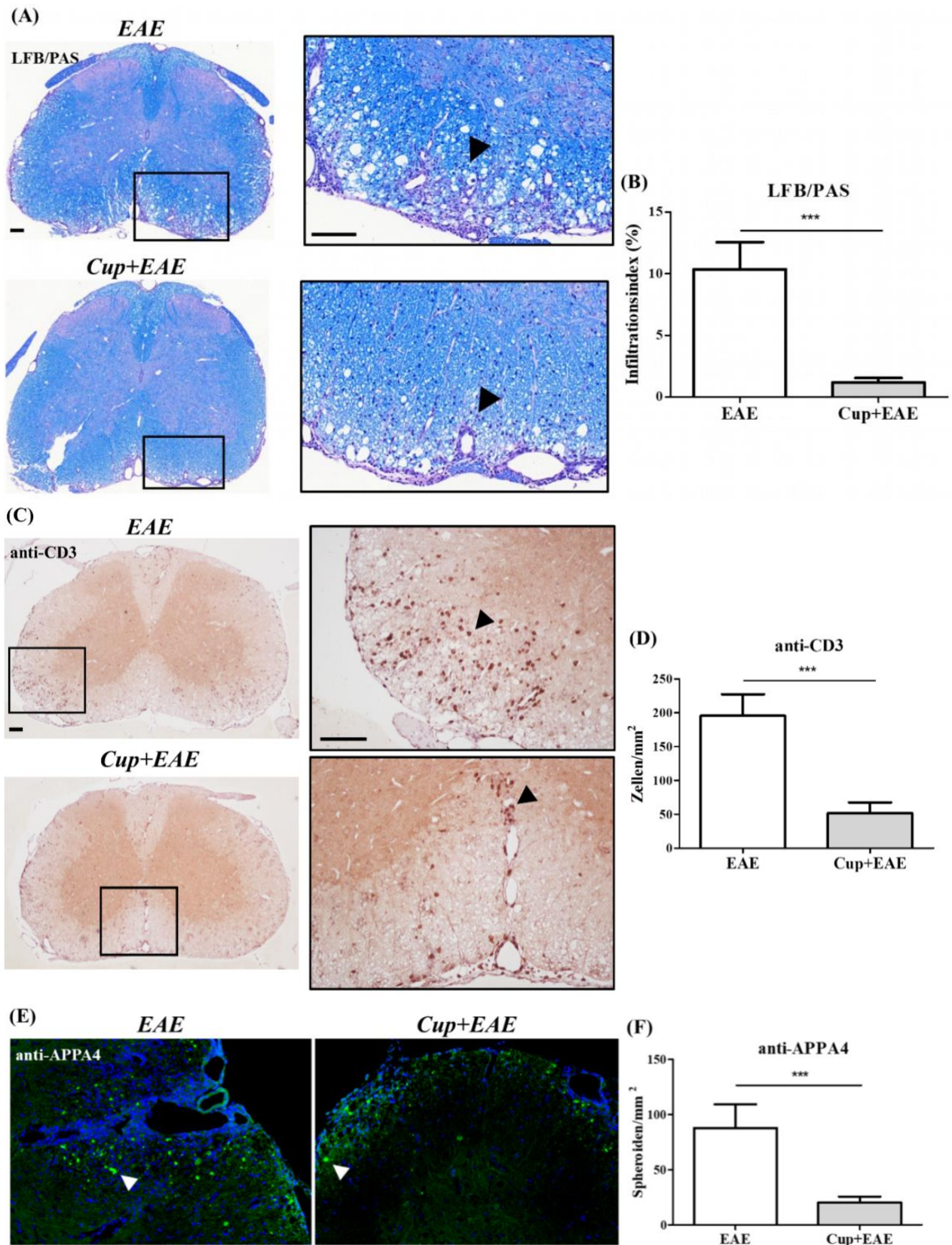


Abbildung 14: Histopathologische Merkmale und Schweregrad der Rückenmarksläsionen. (A) zeigt repräsentative Rückenmarksausschnitte von EAE- und Cup+EAE-Tieren. Die Pfeilköpfe markieren entzündliche Infiltrate in der weißen Substanz beider Kohorten. Das Diagramm in (B) zeigt die Auswertung des histologischen Parameters „Infiltrationsindex“ (n = 38 Schnitte). Die Pfeilköpfe in (C) zeigen CD3⁺ T-Lymphozyten und in (E) APPA4-Akkumulation als Zeichen axonaler Schädigung in der

weißen Substanz beider Gruppen. Auswertungen der T-Zell-Dichte ($n = 46$ Schnitte), (D) und des Ausmaßes der axonalen Schädigung ($n = 44$ Schnitte), (F). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren deutlich und statistisch signifikant (Mann-Whitney Tests). $***p \leq 0,001$; Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

3.2. Milde Cuprizone-induzierte Oligodendroglieopathie führt zur peripheren Immunzellinvasion in die Vorderhirne MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse

Jüngst publizierte Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine Cuprizone-induzierte Demyelinisierung einen potenten Trigger einer peripherer Immunzellrekrutierung in das ZNS darstellt [64, 81]. Dies wurde mithilfe des zeitversetzten Cup/EAE-Induktionsprotokolls untersucht.

In unserer aktuellen Studie haben wir untersucht, ob die **gleichzeitige** Kombination einer Cuprizone-Intoxikation und einer aktiven EAE-Immunisierung ebenso zur peripheren Immunzellinvasion ins Vorderhirn führen kann. Als validierte Zielparameter dieser Fragestellung wurden die Anzahl der perivaskulären Läsionen („perivascular cuffs“, PVCs), die Neutrophilen- sowie die T-Zell-Dichte im Vorderhirn vordefiniert. Trotz des besseren klinischen Verlaufs und der deutlich mildereren Pathologie in den Rückenmären der Cup+EAE-Gruppe war die Anzahl der PVCs zwischen den beiden Kohorten vergleichbar (Abbildung 15, A), (EAE, $0,844 \pm 0,232$ vs. Cup+EAE, $0,734 \pm 0,253$; $p = 0,7681$). Die Dichte der Esterase-exprimierenden Granulozyten war leicht höher in der Cup+EAE-Gruppe, obwohl dieser Unterschied das statistische Signifikanzniveau nicht erreichte (Abbildung 15, B), (EAE, $3,481 \pm 0,544$ Zellen/ mm^2 vs. Cup/EAE, $4,687 \pm 0,804$ Zellen/ mm^2 ; $p = 0.219$).

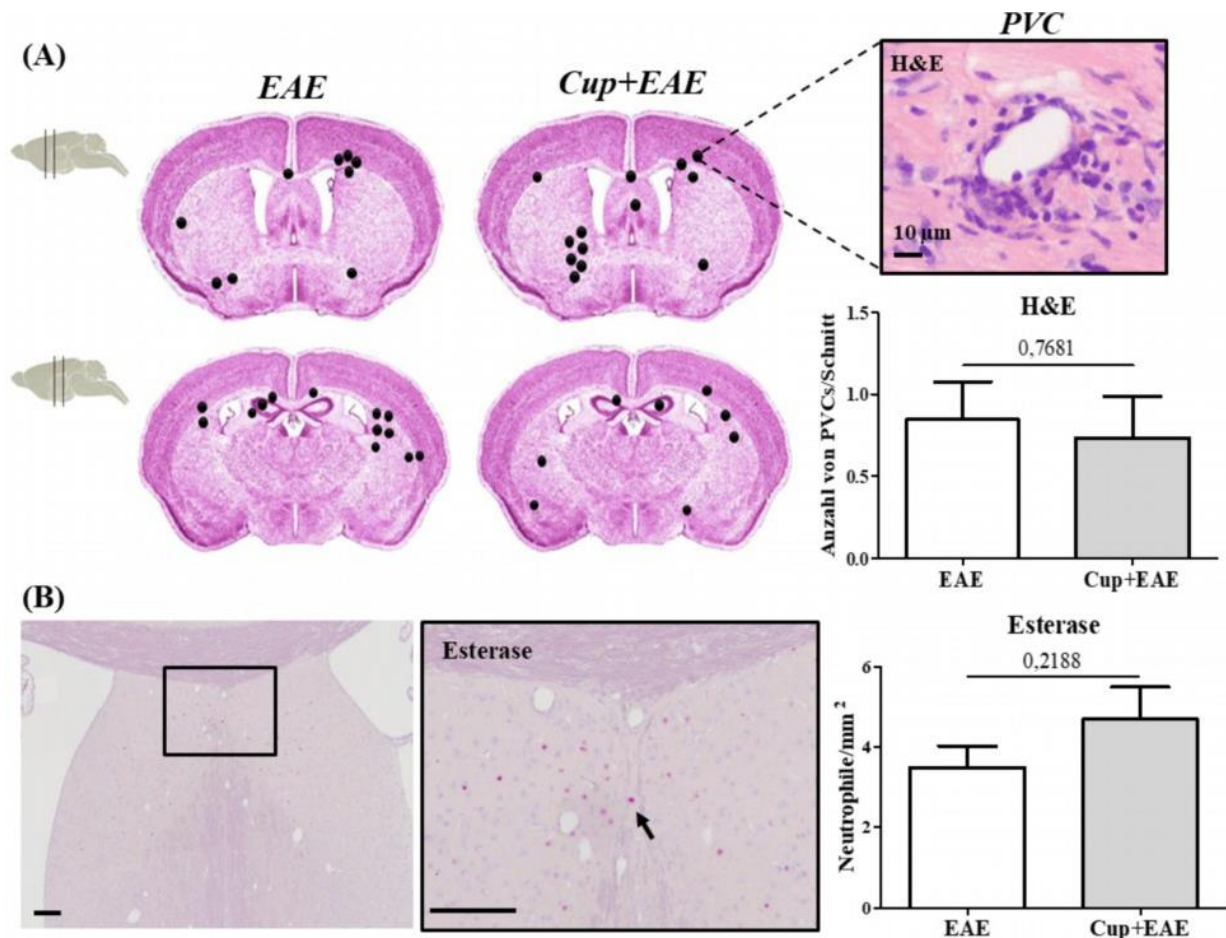


Abbildung 15: Perivaskuläre Läsionen (PVCs) und Granulozytenrekrutierung in das Vorderhirn der EAE und Cup+EAE Mäuse. (A) zeigt die kummulative Anzahl der PVCs in der EAE (links) und der Cup+EAE (rechts) Gruppe. Jeder schwarze Punkt repräsentiert eine perivaskuläre Läsion wie auf dem H&E-Bild rechts dargestellt. Es wurden die Regionen 215 (oben) und 265 (unten) nach Sidman et al. untersucht und bei der Quantifizierung eingeschlossen ($n=64$ Schnitte). Der Unterschied zwischen den Gruppen wurde mithilfe von Mann-Whitney Test auf statistische Signifikanz getestet. (B) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt von Esterase-exprimierenden Granulozyten im Bereich des Septums einer Cup+EAE Maus. Für die Auswertung wurden die Daten aus beiden Regionen (R215, R265) eingeschlossen ($n=31$ Schnitte) und der Unterschied mithilfe des T-tests auf statistische Signifikanz geprüft. Maßstäbe: (A) – 10 μ m, (B) – 100 μ m.

In Übereinstimmung mit dieser Tendenz zeigte sich die Dichte der CD3⁺ T-Lymphozyten stark erhöht in dem medialen Corpus callosum (EAE, $24,30 \pm 9,38$ Zellen/mm² vs. Cup+EAE, $123,50 \pm 19,41$ Zellen/mm²; $p = 0,001$) der mit Cuprizone intoxikierten Mäusen (Abbildung 16, B). Obgleich die T-Zell-Dichte im lateralen Corpus callosum der Cup+EAE-Gruppe höher war als diese in der EAE Gruppe, verfehlte dieser Unterschied das Signifikanzniveau (EAE, $37,96 \pm 19,30$ Zellen/mm² vs. Cup+EAE, $66,65 \pm 20,15$ Zellen/mm²; $p = 0,184$) (Abbildung 16, B). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass milde Cuprizone-induzierte Veränderungen im Telenzephalon im Rahmen des synchronen Cup+EAE-Protokolls eine periphere Immunzellrekrutierung bewirken.

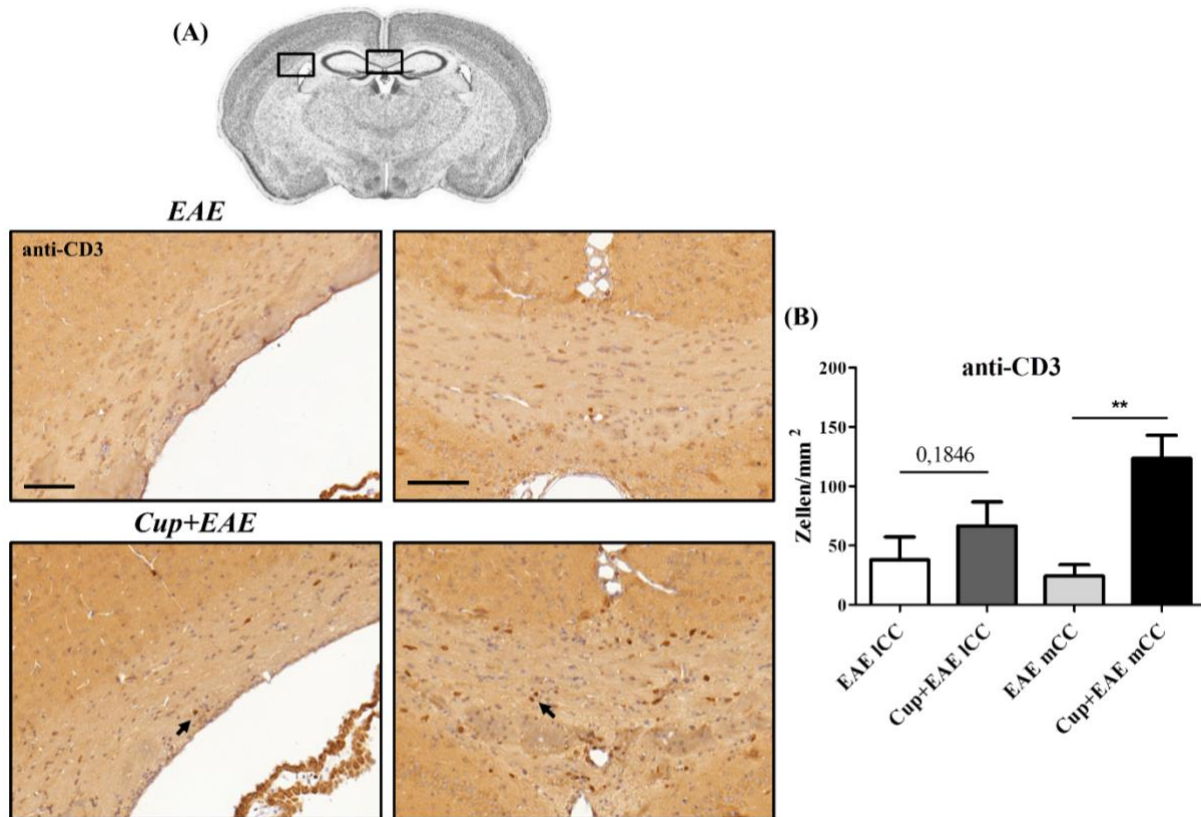


Abbildung 16: T-Zell-Rekrutierung in die Vorderhirne von EAE und Cup+EAE Mäusen. (A) Repräsentative Bilder von anti-CD3 Färbungen im lateralen (ICC, links) und medialen (mCC, rechts) Corpus callosum. Die Pfeile markieren CD3⁺ T-Lymphozyten. Die Quantifizierung (B) erfolgte im Bereich des rostralen Hippocampus (R265; n=32 Schnitte für ICC; n=32 Schnitte für mCC). Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe von Mann-Whitney Tests statistisch geprüft. **p ≤ 0,01; Maßstab: 100 µm..

3.3. Plexus-choroideus-Stroma als Invasionsroute für periphere

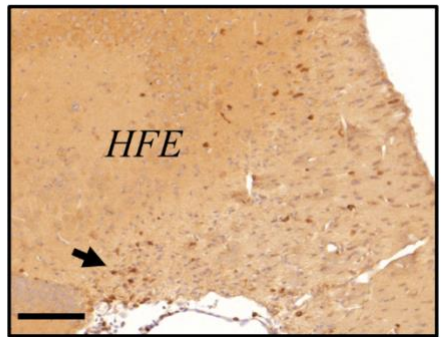
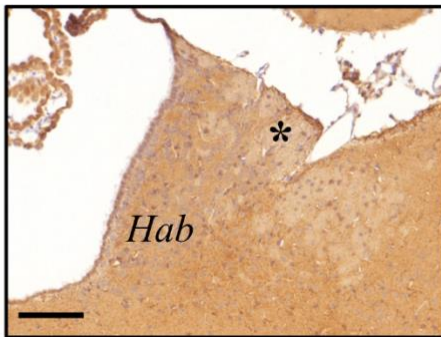
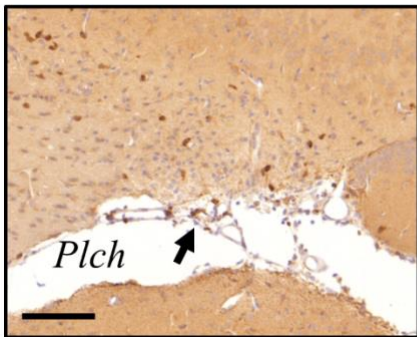
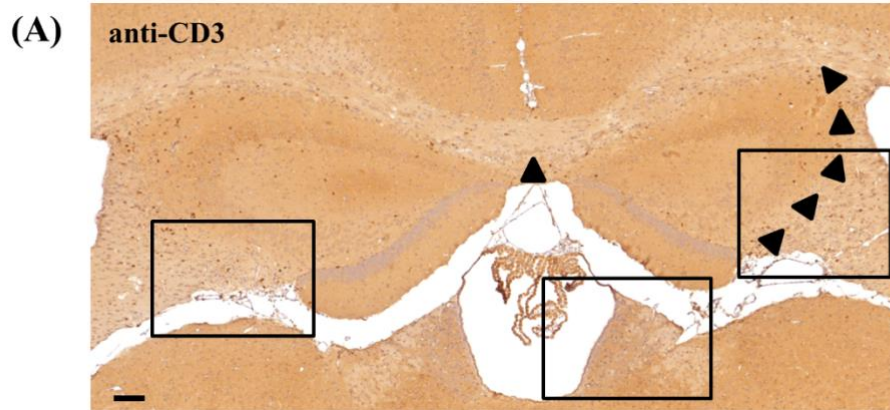
Immunzellen:

Llovera et al. [99] konnten jüngst zeigen, dass der Plexus choroideus eine entscheidende Rolle bei der zerebralen T-Zell-Invasion nach Schlaganfall spielen könnte. Sie konnten mittels präklinischer Schlaganfallmodelle demonstrieren, dass T-Lymphozyten über das Plexus choroideus-Stroma direkt periventriculäre Bereiche infiltrieren, ohne dass sie das Ventrikellumen überqueren. Als Nächstes haben wir in unserem Cup+EAE-Modell die Rolle dieser Invasionsroute bei der Leukozytenmigration ins Vorderhirn untersucht. Zu diesem Zweck haben wir die T-Zellen- und Neutrophilen-Dichten in Regionen quantifiziert, die einen direkten Anschluß an das Plexus-choroideus-Stroma haben oder sich in unmittelbarer Nähe von diesem befinden (Abbildung 17, A, B, C). Diese Leukozytendichten wurden dann mit denen der EAE-Gruppe verglichen. Zudem haben wir die T-Zell-Dichten in Plexus-nahen Regionen

mit den Dichten in Regionen verglichen, die keinen direkten Anschluss an das Plexus-choroideus-Stroma besitzen und somit Plexus-fern sind.

Die CD3⁺ Lymphozyten-Dichte im gesamten Corpus callosum war deutlich höher in der Cup+EAE-Gruppe im Vergleich zur EAE-Gruppe (EAE, 33,11 ± 7,54 Zellen/mm² vs. Cup+EAE, 102,20 ± 15,18 Zellen/mm²; p = 0,0010; mediales und laterales CC in R215 und R265). Ein signifikanter Unterschied konnte auch im Bereich der Hippocampus-Fornix-Einheit festgestellt werden (EAE, 23,66 ± 4,68 Zellen/mm² vs. Cup+EAE, 68,79 ± 15,52 Zellen/mm²; p = 0,0110), aber nicht im Bereich des Septums (EAE, 13,65 ± 4,61 Zellen/mm² vs. Cup+EAE, 30,57 ± 14,24 Zellen/mm²; p = 0,4418). Die Quantifizierung der Zelldichten der Esterase⁺ Granulozyten (Abbildung 17, C) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Corpus callosum (EAE, 8,97 ± 4,85 Zellen/mm² vs. Cup+EAE, 10,52 ± 3,02 Zellen/mm²; p = 0,0852), in der Hippocampus-Fornix-Einheit (EAE, 5,08 ± 1,76 Zellen/mm² vs. Cup+EAE, 17,36 ± 11,03 Zellen/mm²; p = 0,2086) und im Septum pellucidum (EAE, 13,65 ± 4,61 Zellen/mm² vs. Cup+EAE, 30,57 ± 14,24 Zellen/mm²; p = 0,4418).

Zudem haben wir die T-Zell-Dichten in Plexus-Stroma-nahen (Corpus callosum, Hippocampus-Fornix-Einheit) und Plexus-Stroma-fernen (Habenula, periventriculäres Caudoputamen) Regionen bei Cup+EAE-Mäusen quantifiziert und diese miteinander verglichen (Abbildung 17, D). In Übereinstimmung mit unserer Hypothese waren die T-Zell-Dichten in Plexus-Stroma-nahen Bereichen wesentlich höher als diese in Plexus-Stroma-fernen Regionen (CC, 102,2 ± 15,18 Zellen/mm² vs. HFS, 68,79 ± 15,52 Zellen/mm² vs. Hab, 2,655 ± 0,909 Zellen/mm² vs. pvCP 16,98 ± 7,944 Zellen/mm²). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Cuprizone-induzierte Pathologie eine Lymphozytenrekrutierung nicht nur über die gestörte Blut-Hirn-Schranke MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse auslöst, sondern auch über das Plexus-choroideus-Stroma.



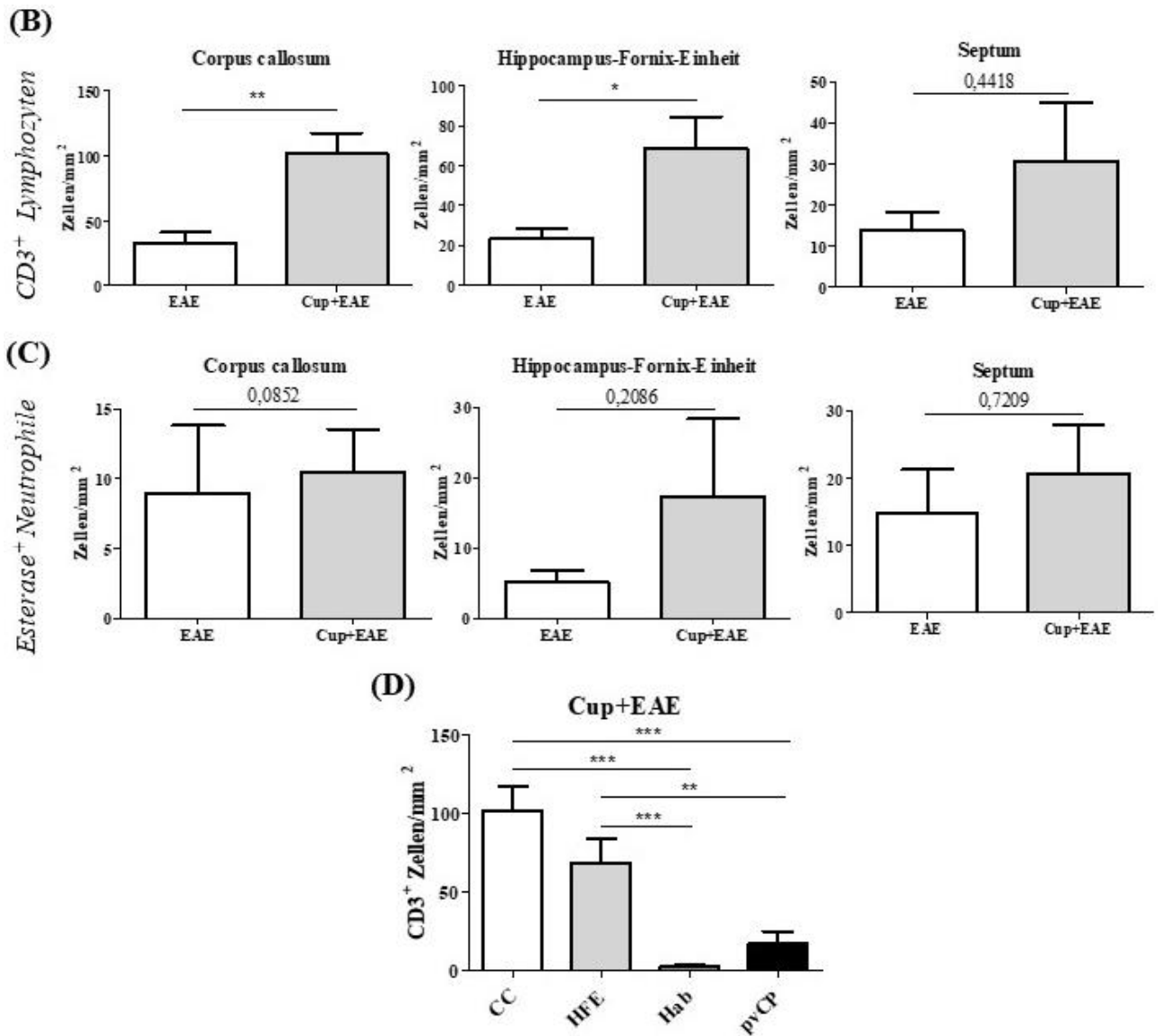


Abbildung 17: Lymphozytenrekritung in periventrikuläre Bereiche des Vorderhirns über das Plexus-choroideus-Stroma. (A) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus dem Vorderhirn (R265) einer Cup+EAE-Maus. Die Pfeilköpfe markieren die vorgeschlagene Invasionsroute der Leukozyten vom Plexus-choroideus-Stroma über periventrikuläre Bereiche zum Corpus callosum. Die drei Kästen oben sind unten vergrößert hervorgehoben. Der Pfeil auf dem unteren Bild (links) zeigt Anhäufung CD3⁺ T-Zellen im Plexus-choroideus-Stroma (Plch) sowie in Plexus-nahen Bereichen. Im Gegensatz zum Habenula (Hab; mittig) zeigte sich in der Hippocampus-Fornix-Einheit (HFE; rechts) eine deutliche Akkumulation von T-Zellen (mit Pfeil markiert). (B) Quantifizierung der CD3⁺ Lymphozyten im Bereich des Corpus callosum (CC; n = 48 Schnitte), der Hippocampus-Fornix-Einheit (n = 32 Schnitte) und des Septums (n = 16 Schnitte) bei EAE- und Cup+EAE-Mäusen. Die Auswertungen wurden in R215 und R265 durchgeführt. (C) Quantifizierung der Esterase⁺ Neutrophile im Bereich des CC (n = 31 Schnitte), HFE (n = 14 Schnitte) und Septums (n = 16 Schnitte) bei EAE und Cup+EAE Mäusen. Die Auswertungen wurden in R215 und R265 durchgeführt. Das letzte Diagramm (D) stellt eine vergleichende Quantifizierung von T-Zell-Dichten zwischen Plexus-Stroma-nahen (CC, HFE) und Plexus-Stroma-fernen (Hab, periventrikuläres Caudoputamen - pvCP) Bereichen in der Cup+EAE-Gruppe dar. (n = 24 Schnitte für CC, n = 16 Schnitte für HFE, n = 16 Schnitte für Hab, n = 16 Schnitte für pvCP). Die Auswertungen wurden in R265 durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe von Mann-Whitney Tests oder T-test statistisch geprüft. *p ≤ 0,05; Maßstab: 100 µm.

3.4. Cup+EAE Vorderhirnläsionen teilen histopathologische Merkmale mit Typ III MS-Läsionen:

In einem nächsten Schritt haben wir die histopathologischen Charakteristika der Vorderhirnläsionen unseres Cup+EAE-Modells genauer untersucht und sie mit diesen des EAE-Modells verglichen. Insbesondere wollten wir überprüfen, ob die gleichzeitige Kombination beider Modelle die Komplexität der MS-Pathologie näher widerspiegelt als das EAE-Modell allein. Zu diesem Zweck haben wir die Hirnpräparate auf typische Merkmale der Typ III MS-Läsionen [50] untersucht – Oligodendrozytendegeneration, Demyelinisierung, Mikrogliose/Monozytose und T-Zell-Invasion.

Zur genaueren Charakterisierung des Ausmaßes der Oligodendrogliepathie haben wir zuerst die Dichte der apoptotischen Zellkörper im Corpus callosum quantifiziert. Im medialen Teil des Corpus callosum der Cup+EAE-Gruppe war die Dichte erheblich höher als diese in der EAE-Gruppe (EAE mCC, $0,181 \pm 0,181$ Zellen/mm² vs. Cup+EAE mCC, $4,383 \pm 1,127$ Zellen/mm²; $p < 0,0001$) (Abbildung 18, A'). Im lateralen Corpus callosum zeigte sich eine Tendenz zur höheren apoptotischen Zelldichte in der Cup+EAE-Kohorte, obwohl dieser Unterschied das Niveau der statistischen Signifikanz nicht erreichte (EAE ICC, $0,0 \pm 0,0$ Zellen/mm² vs. Cup+EAE ICC, $0,405 \pm 0,219$ Zellen/mm²; $p < 0,0800$). Im Einklang mit diesen Daten zeigte sich die Dichte der OLIG2⁺ Oligodendrozyten deutlich niedriger im medialen (EAE mCC, $1823 \pm 98,08$ Zellen/mm² vs. Cup+EAE mCC, $620,3 \pm 113,7$ Zellen/mm²; $p < 0,0001$) und lateralen (EAE ICC, $1471 \pm 74,55$ Zellen/mm² vs. Cup+EAE ICC, $812,4 \pm 135,6$ Zellen/mm²; $p = 0,0008$) Corpus callosum von Cup+EAE Mäusen. Zudem war der „Stress-Transkriptionsfaktor“ DDIT3 viel häufiger in Oligodendrozyten der Cup+EAE-Gruppe exprimiert (EAE mCC, $0,149 \pm 0,102\%$ aller OLIG2⁺ Zellen vs. Cup+EAE mCC, $23,46 \pm 3,513\%$; $p = 0,0007$); (EAE ICC, $0,236 \pm 0,111\%$ aller OLIG2⁺ Zellen vs. Cup+EAE ICC, $32,09 \pm 1,769\%$; $p = 0,0009$). Die absolute Dichte dieser „prä-apoptischen“, DDIT3-exprimierenden Oligodendrozyten war sowohl im medialen (EAE mCC, $2,708 \pm 1,982$ Zellen/mm² vs. Cup+EAE mCC, $152,7 \pm 41,75$ Zellen/mm²; $p = 0,0007$), als auch im lateralen (EAE ICC, $3,473 \pm 1,533$ Zellen/mm² vs.

Cup+EAE ICC, $264,2 \pm 45,28$ Zellen/mm²; $p = 0,0009$) Corpus callosum wesentlich höher in der Cup+EAE-Gruppe.

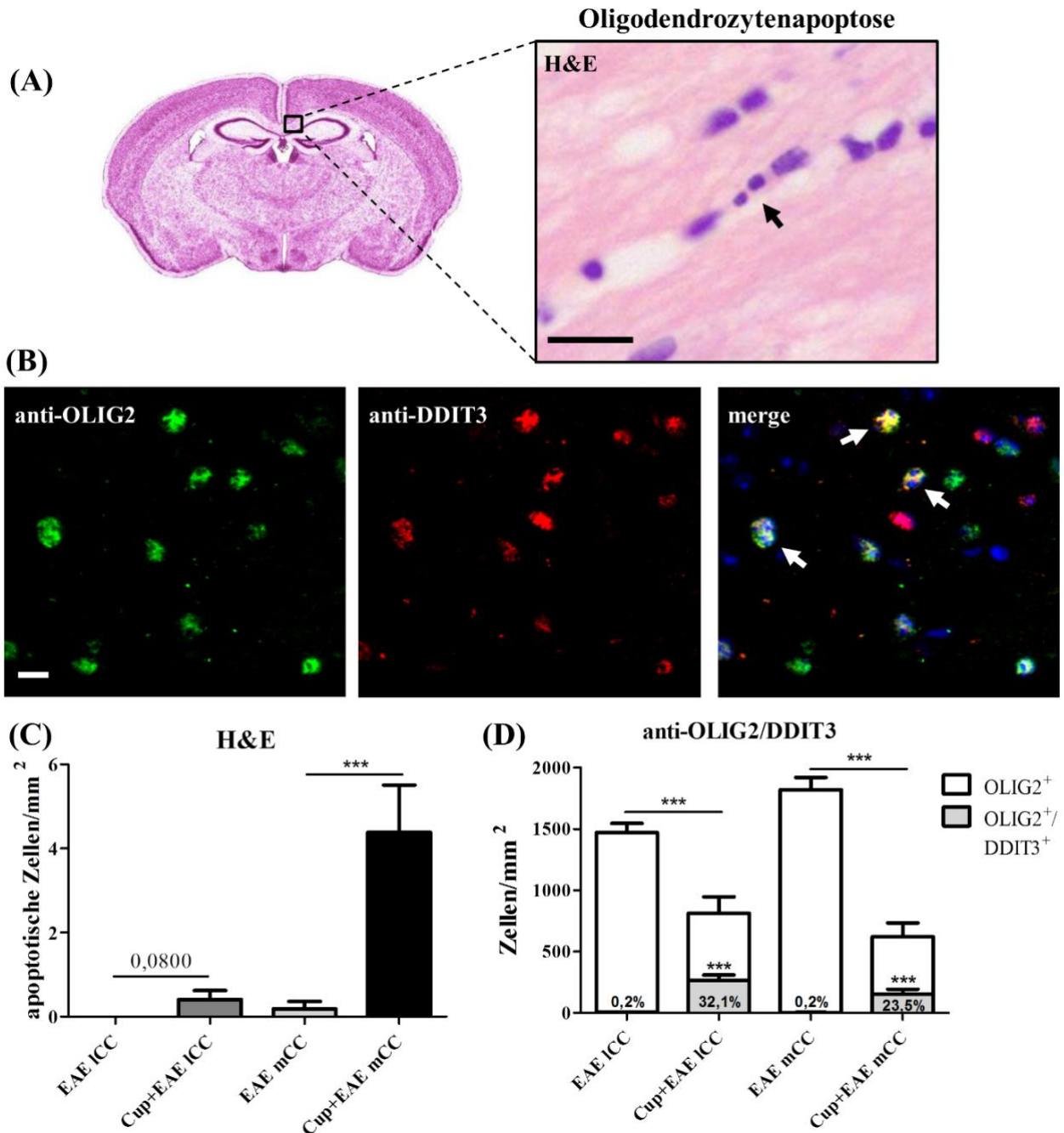


Abbildung 18: Oligodendroglipathie im Vorderhirn von EAE und Cup+EAE Mäusen. (A) Der Pfeil markiert einen apoptotischen Oligodendrozyt im medialen Corpus callosum einer Cup+EAE-Maus. (B) „Gestresste“, prä-apoptotische Oligodendrozyten im Bereich des mCC visualisiert durch anti-OLIG2 (grün fluoreszierend)/DDIT3 (rot fluoreszierend) Doppelfärbung. Die Pfeile markieren DDIT3-exprimierende Oligodendrozyten. (C) Quantifizierung von apoptotischen Zellkörpern im medialen (mCC) und lateralen Corpus callosum (ICC) der EAE und Cup+EAE Gruppe ($n = 32$ Schnitte; R265). Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe von Mann-Whitney Tests statistisch geprüft. (D) Quantifizierung der Dichten aller Oligodendrozyten sowie DDIT3⁺ Oligodendrozyten im mCC und ICC beider Kohorten ($n = 16$ Schnitte; R265). Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe von Mann-Whitney-Test (OLIG2⁺/DDIT3⁺-Zelldichte) oder T-test (OLIG2⁺-Zelldichte) statistisch geprüft. Maßstab: 100 μ m.

Als Nächstes haben wir das Ausmaß der Demyelinisierung in beiden Kohorten untersucht. Wie in Abbildung 19 (A) beispielhaft dargestellt, waren die Myelinscheiden im Corpus callosum der EAE-Gruppe auf histopathologischem Niveau weitgehend intakt. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine konsequente moderate Demyelinisierung im Corpus callosum der Cup+EAE-Gruppe (A'), die medial (EAE mCC, $95,83 \pm 0,945$ vs. Cup/EAE mCC, $63,13 \pm 4,792$; $p = 0,0009$) stärker ausgeprägt war als lateral (EAE ICC, $98,75 \pm 0,687$ vs. Cup+EAE ICC, $86,04 \pm 3,085$; $p = 0,0011$) (Abbildung 19, B). Außerdem korrelierte der Grad der Demyelinisierung im medialen Corpus callosum negativ mit der Dichte der CD3⁺ T-Zellen ($r = -0,6701$; $p = 0,0045$) (Abbildung 19, C).

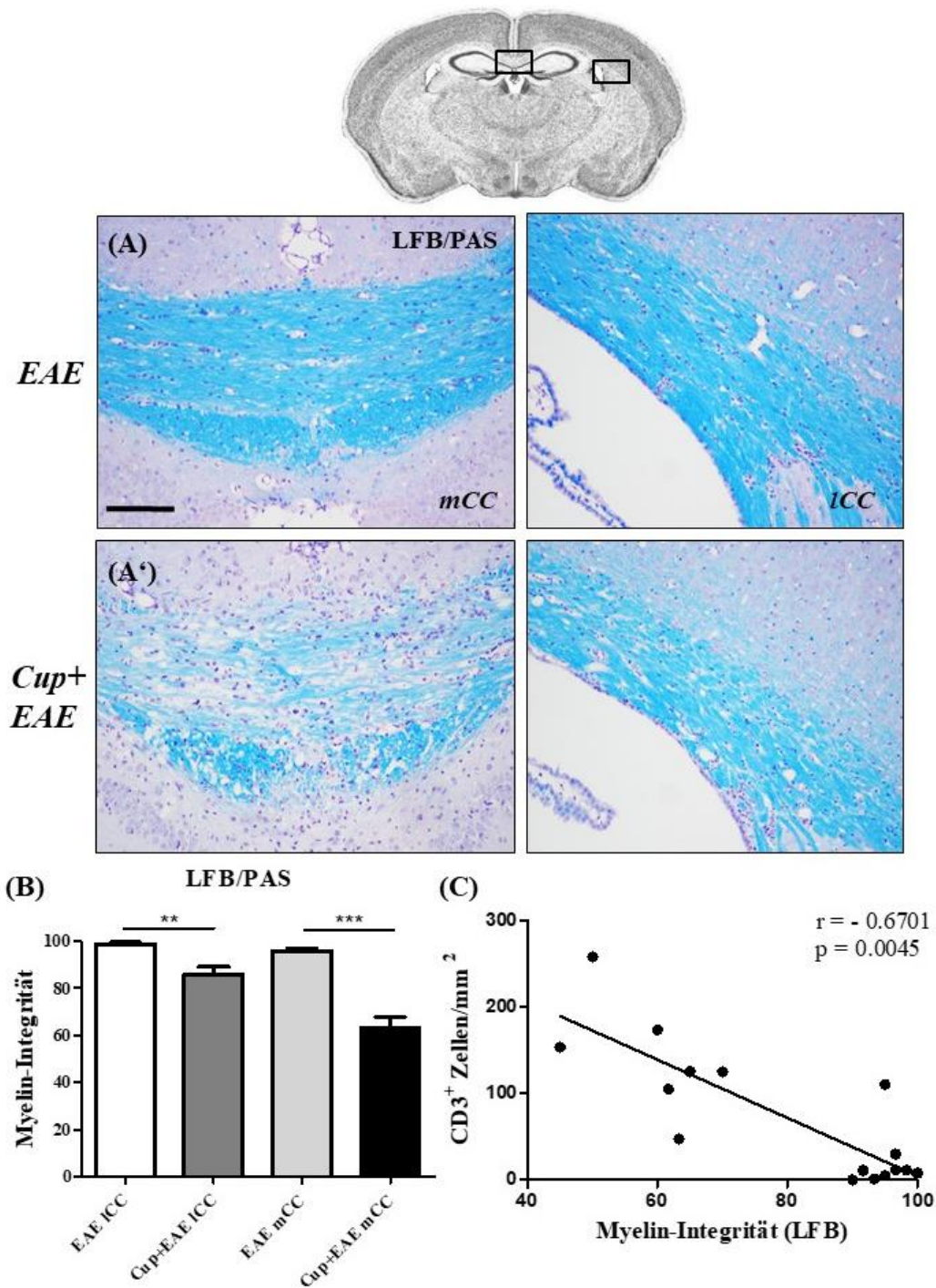


Abbildung 19: Demyelinisierung im Vorderhirn von EAE- und Cup+EAE-Mäusen. (A, A') zeigen repräsentative Ausschnitte aus dem medialen (mCC) und lateralen (ICC) Corpus callosum einer EAE- und einer Cup+EAE-Maus. Die Myelinscheiden wurden mithilfe von LFB/PAS-Färbung visualisiert. (B) Semiquantitative Auswertung des Myelinisierungsgrades ($n = 16$ Schnitte, R265). Die Gruppenunterschiede wurden mithilfe von Mann-Whitney-Tests auf statistische Signifikanz getestet. (C) Korrelation zwischen der Dichte der CD3⁺ Lymphozyten (y-Achse) und der Myelin-Integrität (x-Achse) ($n = 16$ Schnitte, R265) im mCC. Diese Korrelation wurde mithilfe von Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. Maßstab: 100 μ m.

Die Mikrogliose und Monozyten-Invasion sind weitere typische histopathologische Merkmale der Typ III-MS Läsionen. Aufgrund von Gemeinsamkeiten bei den Expressionsprofilen der Monozyten und Mikrogliazellen wurden beide Zellpopulationen mithilfe von Antikörpern, die gegen das zytoplasmatische Protein IBA1 („ionized calcium-binding adapter molecule 1“) gerichtet sind, visualisiert. Ein Nachteil dieser Gegebenheit ist, dass die Zellpopulationen nicht sicher voneinander unterschieden werden konnten und deshalb zusammen quantifiziert wurden. Die Dichte der Mikrogliazellen/Monozyten im medialen (EAE mCC, $97,20 \pm 29,94$ Zellen/mm² vs. Cup/EAE mCC, $620,40 \pm 61,30$ Zellen/mm²; $p = 0,0003$) und lateralen (EAE ICC, $106,40 \pm 31,88$ Zellen/mm² vs. Cup/EAE ICC, $244,60 \pm 44,99$ Zellen/mm²; $p = 0,0251$) Corpus callosum zeigte sich somit in gleicher Weise höher in der Cuprizone-intoxikierten Kohorte im Vergleich zur EAE-Gruppe (Abbildung 20, B). Zudem war die Morphologie der Mikrogliazellen bei den Cup+EAE-Mäusen verändert – die amöboide, aktivierte Form (Abbildung 20, A', mit Pfeilen markiert) war viel häufiger zu finden als die ramifizierte, inaktive Form. Es ergab sich außerdem eine positive Korrelation zwischen IBA1⁺ Zelldichten und CD3⁺ Lymphozytendichten im medialen Corpus callosum ($r = 0,7912$; $p = 0,0003$) (Abbildung 20, C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vorderhirnläsionen im kombinatorischen Cup+EAE Modell wichtige histopathologische Charakteristika mit den Typ III-MS Läsionen teilen.

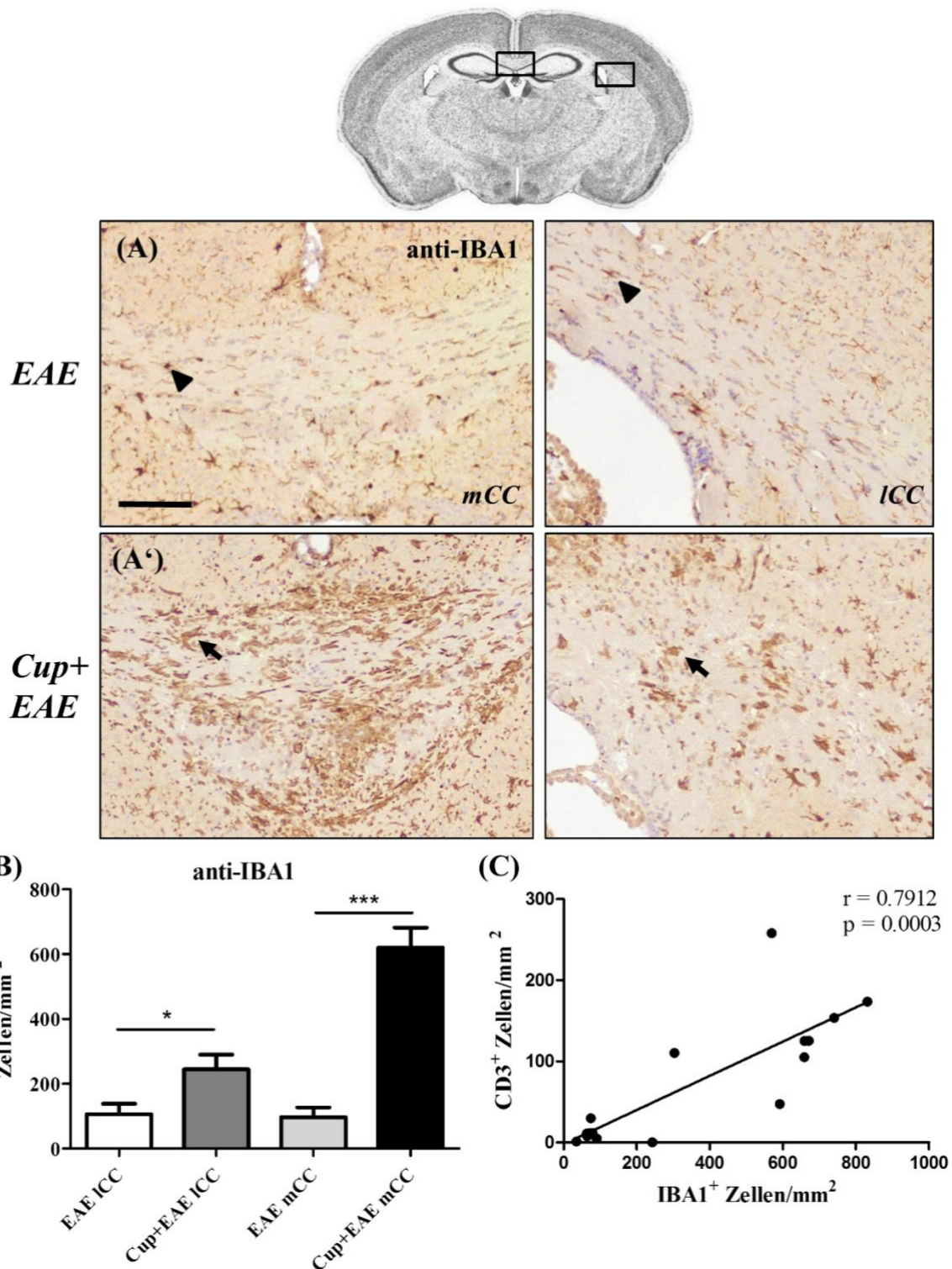


Abbildung 20: Mikrogliose und Monozyten-invasion im Vorderhirn von EAE und Cup+EAE Mäusen. (A, A') zeigen repräsentative Ausschnitte des medialen (mCC) und lateralen (ICC) Corpus callosum einer EAE und einer Cup+EAE-Maus. Die Mikrogliazellen/Monozyten wurden immunhistochemisch mithilfe von anti-IBA1 Antikörpern visualisiert. Die Pfeilköpfe in (A) zeigen ramifizierte, ruhende Mikrogliazellen im CC einer EAE-Maus. Die Pfeile in (A') markieren amöboide, aktivierte

Mikrogliazellen im CC einer Cup+EAE-Maus. (B) Quantifizierung der Zelldichten der Mikroglia/Monozyten in mCC und lCC (n = 16 Schnitte, R265). Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe von Mann-Whitney-Test (EAE mCC vs. Cup+EAE mCC) oder T-test (EAE lCC vs. Cup+EAE lCC) geprüft. (C) Die Korrelation zwischen den IBA1⁺ Mikrogliazellen/Monozyten (x-Achse) und den CD3⁺ Lymphozyten im mCC wurde mithilfe vom Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. Maßstab: 100 µm.

4. Diskussion:

Im Rahmen dieser Studie konnte ich zeigen, dass (1) die kontinuierliche Cuprizone-Intoxikation eine adäquate anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort nicht verhindert, dass (2) milde Cuprizone-induzierte Oligodendroglieopathie eine periphere Immuzellinvasion in die Vorderhirne MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse auslöst, dass (3) das Plexus-choroideus-Stroma wahrscheinlich als Invasionsroute für einen Teil der peripheren Immuzellen fungiert und dass (4) Cup+EAE Vorderhirnläsionen wichtige histopathologische Merkmale mit Typ III MS-Läsionen teilen.

4.1. Anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort in C57BL/6 Mäusen bei kontinuierlicher Cuprizone-Intoxikation

Der deutlich mildere klinische Verlauf in der Cup+EAE-Gruppe im Vergleich zu diesem in der EAE-Gruppe spiegelt die abgeschwächte anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort nach aktiver Immunisierung wider. Die histopathologischen Daten von den Rückenmären der Mäuse unterstützen diese klinische Beobachtung (Abbildung 14). Über einen immunmodulatorischen Effekt des Kupferchelators Cuprizone haben nicht nur unser, sondern auch andere Labore berichtet. In der Studie von Herder et al. konnte eine 5-wöchige Gabe von 0,2 % Cuprizone die demyelinisierende Leukomyelitis, die durch das „Theiler's murine encephalomyelitis virus“ in SJL-Mäuse induziert wurde, deutlich abmildern [100]. Mana et al. haben in einer Studie an C57BL/6 Mäuse gezeigt, dass eine 4-wöchige Gabe von 0,25% Cuprizone, gefolgt von 2-wöchiger Pause mit Normalfutter ohne Cuprizone und anschließender aktiver Immunisierung gegen MOG₃₅₋₅₅ die Inzidenz und Schwere der EAE deutlich senkt [98]. Sie konnten außerdem demonstrieren, dass ein passiver Transfer von MOG₃₅₋₅₅-reaktiven Splenozyten von Cuprizone-behandelten Tieren in naiven C57BL/6 Mäusen ebenso mit einer abgeschwächten anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort einhergeht. Dieses Ergebnis spricht eher für einen immunmodulatorischen und gegen einen direkten protektiven Effekt auf das ZNS durch Cuprizone, der theoretisch auch mit einem milderen klinischen EAE Verlauf einhergehen könnte. Da die T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der Neuroinflammation in den EAE-Modellen spielen, liegt es nahe, dass der protektive Effekt von Cuprizone über eine Regulation der T-Zell-Funktionen vermittelt wird.

Im Einklang mit dieser Hypothese konnten Solti, Kvell et al. zeigen, dass eine 1-wöchige Gabe von 0,2% Cuprizone eine schwere Thymusatrophie bei C57BL/6 Mäusen induziert. Die Atrophie ging mit einer Apoptose von CD4⁺CD8⁺ unreifen Thymozyten und war vorwiegend mitochondrialen Ursprungs durch Caspase-3 und Apoptose-induzierenden Faktor vermittelt [101]. Darüber hinaus konnten Sen et al. zeigen, dass die 5-wöchige Cuprizone-Fütterung eine dosisabhängige Milzatrophie sowie eine Abnahme der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz verursacht [102]. Obwohl diese Studien keinen kausalen Zusammenhang zwischen der abgemilderten anti-MOG₃₅₋₅₅ Immunantwort und der peripheren Immunmodulation durch die Cuprizone-Gabe nachweisen können, deuten sie stark auf einen immunmodulatorischen Effekt des Kupferchelators hin. Unabhängig von den zugrunde liegenden Mechanismen der Cuprizone-vermittelten Immunmodulation war die Generierung von Myelin-reaktiven T-Zellen nach aktiver MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung bei kontinuierlicher Cuprizone-Intoxikation möglich.

4.2.Cup+EAE Vorderhirnläsionen im Kontext des „inside-out“

Ätiopathogenesmodell der MS

Trotz des abgeschwächten klinischen Verlaufs und der mildereren Rückenmarkpathologie in der Cup+EAE-Gruppe war die Anzahl der peripheren Immunzellen in den Vorderhirnen der Cup+EAE-Mäuse tendenziell höher als in der EAE-Gruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte bei den CD3⁺ T-Zellen im Corpus callosum nachgewiesen werden (Abbildung 16). Obwohl die Anzahl der Granulozyten bei den Cuprizone-intoxikierten Tieren tendenziell höher war, wurde die statistische Signifikanz in diesem Fall verfehlt. Obgleich wir im Rahmen unserer Studie die Anzahl der Leukozyten weder im Blut noch in der Milz noch im Thymus untersucht haben, scheint es plausibel, dass der vermutete periphere immunmodulatorische Effekt von Cuprizone die Immunzellrekrutierung ins Vorderhirn geschwächt hat. Man kann deshalb spekulieren, dass das ursprüngliche Ausmaß der sekundären Inflammation, die durch die metabolische Oligodendrogliopathie ausgelöst wurde, viel ausgeprägter wäre, wenn es nicht für die unerwünschte Immunsuppression des Chelators Cuprizone gekommen wäre. Diese Frage sollte aber in weiteren Studien systematisch untersucht werden. Sen et al. konnten beispielsweise demonstrieren, dass eine 5-wöchige Intoxikation mit 0,2% Cuprizone mit einem deutlich stärkeren Verlust an T-Lymphozyten einhergeht als eine 5-wöchige Intoxikation mit 0,1% Cuprizone. Zudem hat nur die höhere Dosis eine Milzatrophie herbeigeführt. Interessanterweise führte die 5-wöchige Intoxikation mit 0,1% Cuprizone in dieser Studie zu einer nur geringer ausgeprägten

Oligodendrozytendegeneration, Demyelinisierung und Gliose im Vergleich zur 5-wöchigen Intoxikation mit 0,2% [102]. Basierend auf diesen Erkenntnissen lässt sich die Frage stellen, ob eine Kombination aus niedrig dosierter Cuprizone (0,1%) und aktiver EAE zu einer stärkeren Immunantwort im Vorderhirn führen und somit ein optimiertes Modell für die Untersuchung der Auswirkungen prä-apoptischer Läsionen auf die Immunzellrekrutierung darstellen würde. Es ist bemerkenswert, dass das Vorderhirn im EAE-Modell i.d.R. viel weniger betroffen ist als das Rückenmark. Die autoreaktiven Immunzellen infiltrieren v.a. das Rückenmark und das Kleinhirn und greifen dort das Myelin an [80, 81]. Im Gegensatz dazu löst der Kupferchelator Cuprizone eine toxische Oligodendrogliepathie und Gliose in verschiedenen Bereichen des Vorderhirns aus, das Rückenmark bleibt intakt [86]. Die Diskrepanz zwischen der abgeschwächten Entzündung im Rückenmark und der verstärkten Pathologie im Vorderhirn der Cup+EAE-Tiere lässt sich also durch die Cuprizone-induzierte Zytodegeneration und reaktive Gliose erklären (Abbildung 5). Eine reine Umverteilung der enzephalitogenen Lymphozyten vom Rückenmark ins Vorderhirn halten wir zwar für unwahrscheinlicher, können diese aber im Rahmen unserer Studie nicht sicher ausschließen. Obwohl die genauen Mechanismen, die zur sekundären Immunzellinvasion führen, nicht genau verstanden sind, gehen wir von einer komplexen Interaktion zwischen ZNS-intrinsischen zytodegenerativen Kaskaden und peripheren autoreaktiven Leukozyten aus. Dass primäre zytodegenerative Prozesse prinzipiell zu einer sekundären Immunantwort führen können, wurde mithilfe mehrerer Paradigmen von unserer Arbeitsgruppe und anderen demonstriert [64, 81]. Im Rahmen dieser Studien konnte man feststellen, dass die Anzahl an Entzündungszellen im Vorderhirn mit dem Ausprägungsgrad der primären Cuprizone-induzierten Pathologie zusammenhängt, was auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung hinweist. Dabei gilt je stärker die Demyelinisierung, die reaktive Gliose und die Neurodegeneration sind, desto ausgeprägter die Immunzellinvasion. Die Arbeitsgruppe von Stys konnte neulich demonstrieren, dass eine subtile Myelinpathologie und darauffolgende Immunstimulation bei C57BL/6 Mäusen ebenso zu einer autoimmunen Demyelinisierung in den Vorderhirnen der Tiere führen [103]. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse 2 Wochen lang mit 0,2% Cuprizone gefüttert und am Tag nach dem Ende der Cuprizone-Intoxikation wurde bei denen das Immunsystem mittels CFA und PTX stimuliert. Die Daten aus meiner Promotionsarbeit sind in Übereinstimmung mit der verfügbaren Literatur und unterstützen das „inside-out“ Modell der Entstehung von MS-Läsionen. In dieser Arbeit waren die Cuprizone-induzierten Schäden zum Zeitpunkt der EAE-Immunsierung viel geringer als in früheren Studien. Diese Tatsache deutet stark darauf hin, dass die milde Oligodendrogliepathie

und das damit assoziierte ZNS-Mikromilieu ausreichend für die Auslösung einer sekundären Immunantwort sind. Diese Beobachtung ist auch im Einklang mit der weit akzeptierten Annahme, dass die Multiple Sklerose lange vor der ersten klinischen Manifestation beginnt (Abbildung 2). Eine neue Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte zudem demonstrieren, dass die alleinige 5-wöchige Cuprizone-Intoxikation ohne aktive EAE-Immunisierung oder PTX-Gabe ausreichend für eine periphere Immunzellrekrutierung ist [104]. Interessanterweise war der Großteil dieser Immunzellen, ähnlich wie bei den MS-Läsionen und im Gegensatz zur EAE, CD8⁺ T-Zellen [105, 106]. Ob die T-Lymphozyten im Rahmen unseres synchronen Cup+EAE-Protokolls einen überwiegend CD4⁺ oder CD8⁺ Phänotyp nachweisen und ob sich der Phänotyp der Vorderhirn-infiltrierenden T-Zellen von dem Phänotyp der Rückenmark-infiltrierenden Lymphozyten unterscheidet, sollte in weiteren Studien untersucht werden. Diese Hypothese halten wir für wahrscheinlich, denn die Antigen-Spezifität der autoreaktiven T-Zellen ist sowohl in der EAE als auch in der MS eine wichtige Variable für die genaue Lokalisation der Läsionen [107, 108]. Obwohl die Untersuchung der genauen Mechanismen, die zur sekundären Immunzellrekrutierung ins ZNS führen, nicht Ziel unserer Studie war, schlagen wir das folgende Erklärungsmodell vor, das in darauffolgenden Studien noch adressiert werden kann. Die Cuprizone-induzierten (1) Oligodendrozyten-Stress und -Degeneration aktivieren (2) Astrozyten und Mikroglia-Zellen, die pro-inflammatorische Chemokine exprimieren und freisetzen. Außerdem (3) gelangen Myelin-Antigene in die Peripherie und werden durch Antigen-präsentierende Zellen phagozytiert und prozessiert. Die Myelin-Epitope sorgen dann für (4) die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, die ins ZNS migrieren, dort (5) reaktiviert werden und das (6) Myelin angreifen [94, 109]. Obwohl es inzwischen eine Menge experimenteller Evidenz dafür gibt, dass primäre metabolische Oligodendrogliopathie eine sekundäre periphere inflammatorische Welle bei immundysregulierten Wirten induzieren kann, bleibt die Frage offen, ob ein ähnliches Szenario auch bei der MS möglich ist. Ein starkes Argument für das Vorhandensein primärer metabolischer Oligodendrozytendegeneration und die Plausibilität des „inside-out“ Modells sind die Ergebnisse aus den histopathologischen Studien, die frühe MS-Läsionen untersucht haben. Diese zeigten, ähnlich wie nach Cuprizone-Intoxikation, apoptotische Oligodendrozyten und aktivierte Mikrogliazellen mit nur wenigen Lymphozyten oder Monozyten, ohne Demyelinisierung oder Neurodegeneration [58, 60, 61]. Außerdem beginnt die Oligodendrozyten-Degeneration in MS-Läsionen oft als „dying-back“ Oligodendrogliopathie, ähnlich wie bei den Cuprizone-induzierten Läsionen [56, 57]. Interessanterweise kann die Lokalisation der ersten demyelinisierenden Läsion im Rahmen der

schubförmigen MS den Ort des nächsten Schubs voraussagen [24, 110]. Obwohl die genauen Mechanismen dieses Phänomens unbekannt sind, ist es plausibel, dass im Rahmen der ersten klinischen Attacke immunogene, für den entsprechenden Ort typischen Myelinantigene in die Peripherie gelangen und eine sekundäre/tertiäre Immunantwort auslösen. Auch wenn die Art der Oligodendrogliopathie in dem Fall wahrscheinlich nicht primär, sondern sekundär ist, ähnelt dieses Prinzip unserem experimentellen Paradigma (Cup+EAE) und ist mit dem „inside-out“ Modell vereinbar. Die „inside-out“ Hypothese bezieht sich nicht nur auf die schubförmige MS, sondern findet auch in der progressiven Form der Erkrankung Anwendung. Somit wird es vermutet, dass die Zytodegeneration ein unabhängiger Prozess und keine alleinige Folge der abgekapselten Neuroinflammation ist [111]. Vermutlich beginnt diese noch in der präklinischen Phase der Erkrankung und wird lange Zeit durch Mechanismen wie Remyelinisierung kompensiert, die nach gewisser Zeit ausgeschöpft sind [112, 113]. Es gibt demzufolge ausreichend präklinische und klinische Evidenz für das „inside-out“ Modell der Ätiopathogenese der MS, das eine plausible Alternative zum alten „outside-in“ Paradigma darstellt. Unabhängig von dem initialen Ereignis ist eine Interaktion zwischen den zytodegenerativen und autoimmunen Prozessen sehr wahrscheinlich und von zentraler Bedeutung für die Neurodegeneration und Behinderungszunahme bei den Patienten [111]. Ein besseres Verständnis der genauen Mechanismen wird hoffentlich zur Entwicklung neuer Behandlungsoptionen führen, die die progrediente Phase der Erkrankung verlangsamen oder sogar aufhalten könnten.

4.3. Die Rolle des Plexus choroideus bei der Immunzellinvasion

Die Anzahl der perivaskulären Läsionen (PVCs) in den Vorderhirnen der Tiere war vergleichbar in beiden Gruppen. Als PVC wird die Ansammlung von peripheren Immunzellen im perivaskulären Raum einer postkapillären Venole bezeichnet. Die perivaskuläre Läsion ist ein typisches Merkmal der MS-Läsionen und ein histopathologisches Korrelat für die Immunzellinvasion über die gestörte Blut-Hirn-Schranke. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine funktionelle Einheit, die das ZNS vom peripheren Blut trennt, das ZNS vor schädlichen Metaboliten und Pathogenen schützt und das Milieu durch regulierten Import und Export aufrechterhält. Diese wird im engeren Sinne durch Endothelzellen mit interzellulären Tight junctions, Basalmembran, Perizyten und Astrozyten gebildet [114]. Ein perivaskulärer Raum, der essenziell für die Leukozytenmigration im Rahmen der Immunüberwachung oder der Neuroinflammation ist, gibt es nur an den postkapillären Venolen [115, 116]. Bei der MS und insbesondere in der schubförmigen Phase der Krankheit ist die Funktion dieser BHS gestört,

was die Invasion der autoreaktiven Lymphozyten fördert. Die gestörte Schranke ist ein typisches radiologisches Zeichen der Neuroinflammation und korreliert stark mit der Formierung neuer demyelinisierenden Herden. Darüber hinaus zielt Natalizumab, eins der hochwirksamsten Medikamente gegen MS, genau auf die Leukozytenmigration durch die gestörte BHS (Tabelle 2) [41, 117]. Bei der progredienten Phase der MS, ist die Blut-Hirn-Schranke-Integrität zum großen Teil erhalten [118]. Diese macht sich u.a. durch das Fehlen aktiver, Gadolinium-aufnehmender Läsionen in der MRT bemerkbar. Der entzündliche Prozess im ZNS bleibt also hinter intakter Blut-Hirn-Schranke abgeschottet und treibt höchstwahrscheinlich die für die Behinderungszunahme zuständige Neurodegeneration voran [49]. Außerdem könnte die Abkapselung der Neuroinflammation die fehlende Wirksamkeit der immunmodulatorischen Medikamente in der progredienten MS erklären, die sich als so wirksam in der schubförmigen Phase der Erkrankung erwiesen haben [111]. Obwohl die Immunzellinvasion über die Blut-Hirn-Schranke stark eingeschränkt ist [49], könnten andere Orte im ZNS wie die Meningen und der Plexus choroideus für die Neuroinflammation bei der PPMS und SPMS von Bedeutung sein [120, 121]. Der Plexus choroideus ist ein epithelial-endotheliales Gefäßkonvolut, das sich in den Hirnventrikeln befindet und für die Produktion des Liquor cerebrospinalis zuständig ist [69]. Es besteht aus einer Schicht Epithelzellen, die auf einer Basalmembran liegen, miteinander durch Tight junctions verbunden sind, und die sogenannte Blut-Liquor-Schranke bilden. Diese Schranke gewährleistet die Regulation des Mikromilieus im ZNS und ist für dessen Funktion unverzichtbar [122]. Basal von den Epithelzellen liegen im Stroma fenestrierte Kapillaren [69]. Diese dienen als Eintrittsstelle für Immunzellen im Rahmen der Immunüberwachung oder eines entzündlichen Prozesses, aber auch für Pathogene [123]. Der Plexus choroideus könnte zudem aus mehreren Gründen eine plausible Route für die Leukozytenmigration ins ZNS im Rahmen der MS darstellen. Erstens, die fenestrierten Gefäße erlauben eine problemlose Migration von Leukozyten ins Plexus-choroideus-Stroma [94]. Dass Leukozyten im Rahmen der MS das Plexus-choroideus-Stroma infiltrieren, wurde zum ersten Mal von Vercellino und Kollegen demonstriert [121]. Zweitens, die Expression von MHC I und MHC II durch die Epithelzellen und das Vorhandensein dendritischer Zellen weisen auf eine Antigen-Präsentation und (Re-)Aktivierung von Lymphozyten, die im Stroma stattfinden [124, 125]. Drittens, es wurde gezeigt, dass die Plexus-Migrationsroute eine Schlüsselrolle bei der Induktion der EAE spielt [126]. Obwohl die Rolle der Plexus-choroideus-Route für die Migration der dendritischen Zellen in MS noch nicht umfassend untersucht wurde, gibt es Hinweise darauf, dass sie von Relevanz ist. CCR5 und

CCR7 werden oft bei dendritischen Zellen im Liquor cerebrospinalis von MS Patienten exprimiert und deren Liganden sind im Hirnparenchym demyelinisierender Läsionen hochreguliert [127, 128]. Weiterhin migrieren dendritische Zellen rasch in den Plexus choroideus nach MOG₃₅₋₅₅ Immunisierung und können sowohl periventriculäre demyelinisierende Läsionen als auch zervikale Lymphknoten infiltrieren [129]. Man könnte deshalb spekulieren, dass (1) die Cuprizone-induzierte Pathologie dendritische Zellen vom Plexus choroideus über Chemokine wie CCL2 und CCL3 anlockt. Diese könnten (2) immunogene Myelinreste phagozytieren, prozessieren und diese (3) Lymphozyten in den zervikalen Lymphknoten präsentieren. Die (4) autoreaktiven Lymphozyten würden in einem nächsten Schritt die Cuprizone-induzierten Läsionen u.a. über den Plexus choroideus infiltrieren und das Myelin angreifen. Diese Hypothese sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die Rolle dieser Route bei der progredienten MS wurde durch eine neulich publizierte histopathologische Studie von Rodriguez-Lorenzo et al. untersucht. Diese hat die Immunzellverteilung im Plexus choroideus von Patienten mit progredienter MS genauer beschrieben. Interessanterweise konnten die Autoren demonstrieren, dass die CD8⁺ T-Zell-Dichte sowie die Granulozyten-Dichte im Plexus-choroideus-Stroma von MS-Patienten deutlich höher sind als bei Kontrollen. Außerdem waren MHCII⁺ Antigen-präsentierende Zellen in unmittelbarer Nähe zu T-Zellen zu finden, was auf eine Interaktion zwischen diesen Zellpopulationen hinweist [130]. Die Autoren behaupten, dass die Begrenzung der Immunzellen auf das Plexus-choroideus-Stroma für eine untergeordnete Rolle der Plexus-choroideus-Route für die Immunzellinvasion spricht. Llovera et al. konnten jedoch mithilfe präklinischer Schlaganfall-Tiermodellen demonstrieren, dass nach ischämischem Insult T-Zellen das ZNS direkt über das Plexus-choroideus-Stroma infiltrieren können, ohne die durch Tight junctions verbundenen Epithelzellen überwinden zu müssen [99]. Obwohl die MS und der Schlaganfall zwei unterschiedliche Krankheiten sind, teilen sie auch einige gemeinsame pathophysiologische Aspekte wie Demyelinisierung, Gliose und Immunzellinfiltration. Es ist deshalb plausibel, dass so eine Art der Immunzellmigration nicht nur beim Schlaganfall vorkommt. Die fehlenden Leukozyten im Plexus-choroideus-Epithelium in der Studie von Rodriguez-Lorenzo et al. schließt demzufolge der Plexus choroideus als relevante Migrationsroute im Rahmen der progredienten MS keineswegs aus.

Da das Vorderhirn im EAE Modell i.d.R. nicht so stark von der Neuroinflammation betroffen ist, weist die vergleichbare Anzahl der perivaskulären Läsionen in beiden Kohorten auf eine

untergeordnete Rolle dieser Migrationsroute bei der Immunzellmigration in unserem Cup+EAE Modell hin. Interessanterweise war trotzdem die Anzahl der CD3⁺ Zellen in den Vorderhirnen der Cup+EAE Mäuse deutlich höher als diese in der EAE Gruppe. Diese Diskrepanz könnte auf einen alternativen Migrationsweg hindeuten, den die enzephalitogenen Lymphozyten nutzen könnten, um das ZNS zu infiltrieren. In einem nächsten Schritt haben wir deshalb untersucht, ob ein Teil der Leukozyten das ZNS über den Plexus choroideus infiltriert haben. Die Anzahl der CD3⁺ Lymphozyten war im Bereich des Corpus callosum sowie der Hippocampus-Fornix-Einheit signifikant höher in der Cup+EAE-Kohorte im Vergleich zur EAE-Kohorte. Außerdem imponierten die T-Zell-Dichten in Plexus-Stroma-nahen Regionen (Corpus callosum, Hippocampus-Fornix-Einheit) deutlich höher als in Plexus-Stroma-fernen Regionen (Habenulae, periventrikuläres Caudoputamen). Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass ein substanzieller Teil der Lymphozyten über das Plexus-choroideus-Stroma ins ZNS migrieren könnte. Die Granulozyten-Dichte der Cup+EAE Gruppe war vergleichbar mit dieser der EAE Gruppe. Man kann jedoch spekulieren, dass der ursprüngliche Effekt durch die immunmodulierende Wirkung von Cuprizone abgeschwächt wurde. Unsere Daten sowie die genauen Pathomechanismen der Immunzellmigration sollen in weiteren *in vivo* Zell-Tracking-Studien untersucht werden. Es wäre interessant zu sehen, ob im Rahmen unseres Modells die T-Zellen, ähnlich wie bei der EAE, über die CCR6-CCL20 Achse reguliert werden oder andere Mechanismen involviert sind [74]. Mithilfe unseres Cup+EAE-Modells ließen sich vermutlich die Mechanismen, die zur Immunzellinvasion über diese alternative Route führen, einfach und effizient untersuchen. Diese Erkenntnisse würden hoffentlich zu einem besseren Verständnis der Neuroinflammation im Rahmen der progredienten MS und zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

4.4.Cup+EAE Vorderhirnläsionen als Modell zur Untersuchung der Typ III MS-Läsionen

Die Cup+EAE Vorderhirnläsionen werden histopathologisch u.a. durch metabolischen Stress, Demyelinisierung, Mikroglia-Aktivierung und Infiltration von autoreaktiven T-Lymphozyten gekennzeichnet (Abbildungen 18, 19, 20). Interessanterweise ähneln die Cup+EAE Läsionen dadurch stark den Typ III MS-Läsionen, die sowohl durch metabolische als auch durch immunvermittelte Oligodendroglieopathie geprägt sind [48]. Diese histopathologischen Ähnlichkeiten deuten möglicherweise auf gemeinsame Pathomechanismen hin, die die Progression beider Läsionsarten vorantreiben. Somit könnte man durch die Untersuchung des Zusammenspiels der

metabolischen und der immun-vermittelten Oligodendrogliepathie im Cup+EAE Modell wichtige Erkenntnisse zur Entstehung und Progression von Typ III MS-Läsionen gewinnen. Es ist bemerkenswert, dass Patienten, die Typ III MS-Läsionen aufweisen, kaum von einer Plasmapherese profitieren. Stork et al. konnten demonstrieren, dass die Ansprechrate der Apherese i.R. eines akuten Rückfalls maßgeblich mit dem immunopathologischen Läsionssubtyp zusammenhängt. Daraus ergibt sich die klinisch relevante Frage, ob die immunopathologischen Läsionsmuster mit der (1) Ansprechrate verfügbarer Medikamente und mit der (2) Prognose zusammenhängen. Die wirksameren verlaufsmodifizierenden Medikamente gehen i.d.R. mit deutlich höheren gesundheitlichen Risiken einher (Tabelle 2) und können in manchen Fällen sogar lebensbedrohliche Folgen haben. Deshalb sind die besonders wirksamen verlaufsmodifizierenden Medikamente (z.B. Natalizumab und Alemtuzumab) den Patienten mit schweren aktiven Verläufen vorbehalten. Es gibt jedoch immer mehr Evidenz dafür, dass eine frühe aggressive Behandlung mit einem späteren Beginn der SPMS und insgesamt einer besseren Prognose einhergeht [131]. Biomarker, die zu einer genaueren Prognoseeinschätzung beitragen und das Ansprechen eines Patienten auf eine Medikamentengruppe vorhersagen könnten, würden zu einer wirksamen und sicheren Behandlung führen. Präklinische *in vivo* Modelle wie unser Cup+EAE-Modell, die bestimmte immunopathologische Läsionsmuster reproduzieren, können somit nicht nur zum Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung, sondern auch zur Entdeckung neuer Biomarker beitragen. Solche Biomarker würden eine zentrale Rolle bei der personalisierten Prognoseeinschätzung und Behandlung der MS spielen.

Ein zentrales Merkmal sowohl der Cup+EAE Vorderhirnläsionen als auch der Typ III MS-Läsionen ist der metabolische Oligodendrozyten-Stress. Dass Oligodendrozyten-Stress Mikrogliazellen aktivieren und dadurch eine neuroinflammatorische Kaskade ankurbeln kann, wurde mehrmals im Rahmen von experimentellen Studien demonstriert [132, 133]. Zum Beispiel konnten Hövelmeyer et al. zeigen, dass Mäuse, deren Oligodendrozyten die proapoptischen Gene *Fas* und *TNF-RI* fehlen, nur einen milden EAE-Verlauf entwickeln. Weiterhin können Oligodendrozyten Chemokine wie IL6, CXCL10, CCL2 und CCL3 sezernieren und dadurch Mikroglia zum Ort der Schädigung rekrutieren oder via Exosomen mit diesen interagieren [75, 132]. Welche Mechanismen für die Mikroglia-Aktivierung bei den Typ III-Läsionen zuständig sind, bleibt es noch zu klären.

Mikrogliazellen sind die angeborenen Immunzellen des Zentralnervensystems. Sie haben ähnliche Funktionen wie die Makrophagen – d.h. sie sind u.a. für die Phagozytose, die

Antigenpräsentation und die Zytokinproduktion zuständig [134]. Im Rahmen der neuroinflammatorischen Kaskade sezernieren Mikrogliazellen nach Aktivierung proinflammatorische Mediatoren wie Glutamat, Matrix-Metalloproteinasen, reaktiver Sauerstoff und reaktive Stickstoffspezies. Zudem werden diverse Zyto- und Chemokine freigesetzt [135]. Diese führen zu einer diffusen Schädigung benachbarter Zellen, wobei die Oligodendrozyten aufgrund des hohen Energiebedarfs besonders anfällig sind [75]. Die Mikroglia interagieren nicht nur mit Zellen des ZNS, sondern über die Antigenpräsentation auch mit peripheren Immunzellen. Die Antigenpräsentation ist unverzichtbar für die Generierung von enzephalitogenen Lymphozyten und den Krankheitsbeginn der MS [136]. Interessanterweise konnten Sosa et al. zeigen, dass zuerst die Mikrogliazellen die antigenpräsentierende Rolle nach EAE-Induktion übernehmen und die dendritischen Zellen erst etwa 7 Tage p.i. dazu beitragen [137]. Eine Hochregulation der MHC-II Moleküle wurde auch beim Cuprizone-Demyelinisierungsmodell gezeigt [138]. Die Bedeutung dieses Expressionsmusters bleibt angesichts der Tatsache, dass eine Immunzellrekrutierung im Cuprizone-Modell eine untergeordnete Rolle spielt, noch unklar. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass aktivierte Mikrogliazellen sehr häufig in der sogenannten normal erscheinenden weißen Substanz („normal appearing white matter“) auftreten [139]. Sie gehen mit Neurodegeneration, Oligodendrozytenstress und Komplementsystemablagerungen einher [140]. Dieser Muster weist auf eine zentrale Rolle der aktivierten Mikrogliazellen bei der Formierung von frühen Läsionen hin, die auf der histopathologischen Ebene (noch) unauffällig erscheinen. Die frühe Cuprizone-induzierte Mikroglia-Aktivierung und die anschließende EAE-vermittelte Immunzellrekrutierung i.R. unseres Cup+EAE-Protokolls ermöglichen die Untersuchung dieser frühen Interaktionen, die möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Formierung von MS-Läsionen spielen.

Mikrogliazellen tragen nicht nur zur Oligodendrozyten-Degeneration, sondern auch zur Oligodendrozyten-Regeneration und Remyelinisierung bei. So konnten zwei unabhängige Arbeitsgruppen demonstrieren, dass eine Minocyclin-vermittelte Hemmung der Mikroglia-Aktivierung die Rekrutierung und Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen verhindert [141, 142]. Die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sind die Zellen, die für die Produktion neuer Myelinscheiden nach einer Demyelinisierung zuständig sind. Ein zentraler Mechanismus zur Förderung der Remyelinisierung durch die Mikrogliazellen ist die Phagozytose. Dadurch werden die Myelintrümmer vom Ort des Geschehens entfernt und die

Axone auf Remyelinisierung vorbereitet [143]. Man sieht anhand dieser Beispiele, dass die Interaktion zwischen Oligodendrozyten und Mikroglia bidirektional und hochkomplex ist.

Gliazellen interagieren höchstwahrscheinlich nicht nur miteinander sondern auch mit den rekrutierten peripheren Immunzellen und tragen gemeinsam zur Entstehung und Progression insbesondere von Typ III MS-Läsionen [94]. Plemel et al. konnten zum Beispiel demonstrieren, dass Mikrogliazellen die periphere Monozyten-invasion ins ZNS nach Demyelinisierung regulieren und sogar inhibieren können [144].

Die Degeneration reifer Oligodendrozyten sowie von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ist auf histopathologischem Niveau ein Hauptmerkmal der entzündlichen MS-Läsionen. Zytokine wie das Interferon- γ , die durch aktivierte T-Zellen sezerniert werden, können die Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen beeinträchtigen und zur Zytodegeneration beitragen [145]. Dass Myelinproteine stark immunogen sind und zu einer Rekrutierung peripherer Immunzellen führen können, wurde bereits in zahlreichen Studien demonstriert [81, 103]. Die Oligodendrozyten sind dabei aber nicht nur passive Opfer der neuroinflammatorischen Reaktion, sondern auch wichtige Immunregulatoren. Diese unterschätzte Rolle wird u.a. dadurch deutlich, dass Oligodendrozyten Chemokinrezeptoren wie CXCR1, CXCR2, CXCR3 exprimieren und diese bei der Multiplen Sklerose sogar hochreguliert sind [146]. Dass Oligodendrozyten nicht nur auf Signalmoleküle von Immunzellen reagieren, sondern auch aktiv mit diesen interagieren, konnten Koning et al. im Rahmen einer histopathologischen Studie zeigen. Die Oligodendrozyten exprimieren das Glykoprotein CD200, das als Ligand für den CD200R dient. Der CD200R wird im ZNS v.a. durch die Mikrogliazellen exprimiert. Durch die Bindung des Liganden am Rezeptor wird die Mikroglia-Aktivität heruntergefahren und somit die Entzündung eingedämmt [147]. Zudem interagiert eine Untergruppe von Oligodendrozyten (sog. inflammatorische Oligodendroglia) mit CD8⁺ T-Zellen, indem sie den MHC-I-Rezeptor exprimiert und Antigene präsentiert [148]. Einzelzell-RNA-Sequenzierung weißer Substanz von Patienten mit progredienter MS konnte auch eine Anreicherung einer bestimmten Oligodendrozytengruppe finden, bei denen mehrere Antigenpräsentationsgene hochreguliert sind [149]. Obwohl wir den folgenden Aspekt i.R. unserer Studie nicht explizit untersucht haben, könnte man spekulieren, dass die primäre metabolische Oligodendrogliaopathie eine Verschiebung des Oligodendrozytenphänotyps hin zum inflammatorischen Phänotyp mit vermehrter Expression von Zytokinen und Antigenpräsentationsmolekülen bewirkt. Diese Verschiebung könnte zu einer stärkeren Immunzellrekrutierung und sekundären Oligodendrogliaopathie beitragen. Um solche Zell-Zell-

Interaktionen untersuchen zu können, brauchen wir präklinische Modelle wie das hier vorgestellte Cup+EAE Modell (Tabelle 17), die sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Oligodendrogliepathie reproduzieren und sich dadurch der pathophysiologischen Komplexität der Multiplen Sklerose annähern.

Aspekte der MS	Cuprizone	MOG ₃₅₋₅₅ -EAE	Cup/EAE (sequenziell)	Cup+EAE (simultan)	CAE (Cup/PTX)
Akuter Schub	-	+++	+++	++	-
Progrediente Behinderungszunahme	+	-	?	?	?
Fokale entzündliche demyelinisierende Läsionen	-	+++	+++	++	++
Diffuse Schädigung der weißen/grauen Substanz	+++	+	+++	+(+)	?
Remyelinisierung	+++	-	++	-	-
Metabolische Oligodendrogliepathie	+++	-	+++	+++	+++
Immun-vermittelte Oligodendrogliepathie	-	+++	+++	++	+++
Neurodegeneration	+++	+++	+++	++	?
Inside-out Mechanismen	-	-	+++	+++	+++
Outside-in Mechanismen	-	+++	-	-	-
Zusammenspiel zwischen schwerer Oligodendrogliepathie und peripheren autoreaktiven Leukozyten	-	-	+++	-	-
Zusammenspiel zwischen milder Oligodendrogliepathie und peripheren autoreaktiven Leukozyten	-	-	-	+++	+++

+++ ausgeprägt; ++ moderat; + kaum vorhanden; - nicht vorhanden; ? unklar.

Tabelle 17: Klinische und histopathologische Merkmale der MS, die in unterschiedlichen präklinischen Mausmodellen widerspiegelt werden. Modifiziert aus [59]. Cup/EAE (sequenziell) nach [81]; Cup+EAE (simultan) nach [94]; CAE (“cuprizone autoimmune encephalomyelitis”) nach [103].

5. Zusammenfassung:

Hintergrund: Oligodendrozyten-Degeneration und die daraus resultierende Demyelinisierung sind zentrale Merkmale der MS-Pathologie. Behandlungsansätze, welche die Oligodendrozyten und das Myelin schützen und die endogenen Regenerationsmechanismen fördern, stehen bisher noch nicht zur Verfügung. Oligodendrogliepathie und Demyelinisierung werden üblicherweise

als direkte Folgen einer immun-vermittelten entzündlichen Reaktion gesehen. Intrinsische metabolische Störungen sind aber wahrscheinlich von ähnlicher Bedeutung. Obwohl wir über gute präklinische Modelle für die isolierte Untersuchung immun-vermittelter und metabolischer Oligodendrogliepathie verfügen, fehlen uns Modelle zur Untersuchung des Zusammenspiels zwischen beiden Prozessen.

Fragestellung: Wir vermuten, dass die kontinuierliche Cuprizone-Intoxikation und die aktive Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) bei Mäusen uns erlauben würde, Interaktionen zwischen metabolischer und inflammatorischer Schädigung von Oligodendrozyten im ZNS zu untersuchen.

Methoden: Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden zur Induktion einer metabolischen Oligodendrozyten-Degeneration mit 0,25% Cuprizone für 18 Tage intoxikiert. Am 3. Tag der Cuprizone-Intoxikation wurden die Tiere mit MOG₃₅₋₅₅ („myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide“) immunisiert. Diese bewirkte die Formierung Myelin-autoreaktiver T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen. Die Mäuse wurden mithilfe eines strukturierten klinischen Score-Systems täglich beurteilt und am Höhepunkt der EAE finalisiert. Die ZNS-Präparate wurden (immun-) histochemisch hinsichtlich inflammatorischer Infiltrate, Demyelinisierung, Oligodendrozyten-Degeneration, Mikroglie und Neurodegeneration untersucht.

Ergebnisse: Trotz der immunsuppressiven Wirkung von Cuprizone kam es bei kontinuierlicher Intoxikation zur Formierung Myelin-autoreaktiver T-Zellen und zur Entwicklung motorischer Defizite. Obwohl die Cuprizone-Intoxikation zu einem milderen klinischen EAE-Verlauf und geringerem Ausmaß an Inflammation im Rückenmark führte, sorgte die Cuprizone-induzierte Oligodendrogliepathie im Vorderhirn zur verstärkten Lymphozyteninvasion am Ort der Läsion. Diese Vorderhirnläsionen ähnelten stark den Typ III MS-Läsionen und waren u.a. durch Oligodendrozyten-Apoptose, Demyelinisierung, Mikroglie und Infiltration von Lymphozyten gekennzeichnet.

Ausblick: Zusammenfassend haben wir im Rahmen dieser Studie ein präklinisches Mausmodell entwickelt, welches es uns erlaubt, das direkte Zusammenspiel zwischen immun-vermittelter und metabolischer Oligodendrogliepathie zu untersuchen. Das bessere Verständnis der genauen Mechanismen, die zur Demyelinisierung und folglich klinischen Progression führen, würde zur Entwicklung neuer Behandlungsansätze und Verbesserung der Prognose der Patienten mit MS führen.

6. Abkürzungsverzeichnis:

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ABC	<i>engl.</i> avidin-biotin-complex
APPA4	<i>engl.</i> amyloid precursor protein A4
APC	<i>engl.</i> antigen-presenting cells; antigenpräsentierende Zellen
BSA	bovines Serumalbumin
CA	Commissura anterior
CAE	<i>engl.</i> cuprizone autoimmune encephalomyelitis
CC	Corpus callosum
CCL	C-C-Chemokinligand
CCR	C-C-Chemokinrezeptor
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CFA	<i>engl.</i> complete Freund's adjuvant; komplettes Freund-Adjuvans
Cup	Cuprizone
CWF	<i>engl.</i> cold water fish skin gelatin
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DAB	3,3'Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDIT3	<i>engl.</i> DNA damage-inducible transcript 3
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	<i>engl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid; Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
h	Stunden
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hab	Habenula
HFE	Hippokampus-Fornix-Einheit
HIER	<i>engl.</i> heat-induced epitope retrieval; Hitze-induzierte Epitop-Demaskierung
HRP	<i>engl.</i> horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase

i.p.	intraperitoneal
IBA1	<i>engl.</i> ionized calcium-binding adapter molecule 1
IF	Immunfluoreszenz
IFN γ	Interferon Gamma
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KIS	klinisch isoliertes Syndrom
LFB/PAS	<i>engl.</i> luxol fast blue/periodic acid-schiff
l	Liter
ICC	laterales Corpus callosum
mCC	mediales Corpus callosum
MHC	<i>engl.</i> major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOG ₃₅₋₅₅	<i>engl.</i> myelin oligodendrocyte glycoprotein ₃₅₋₅₅ peptide
mRNA	<i>engl.</i> messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NK-Zellen	<i>engl.</i> natural killer cells; Natürliche Killerzellen
ns	nicht signifikant
OLIG2	<i>engl.</i> oligodendrocyte transcription factor 2
p.i.	post Immunisierung
PBS	<i>engl.</i> phosphate-buffered saline
PLP	<i>engl.</i> myelin proteolipid protein
PPMS	<i>engl.</i> primary progressive multiple sclerosis, primär progrediente MS
PTX	Pertussis-Toxin
PVC	<i>engl.</i> perivascular cuff; perivaskuläre Läsion
pvCP	periventrikuläres Caudoputamen
R215	Region 215 nach Sidman et al., 1971
R265	Region 265 nach Sidman et al., 1971
ROI	<i>engl.</i> region of interest

RRMS	<i>engl.</i> relapsing remitting multiple sclerosis, schubförmige MS
s	Sekunden
s.c.	<i>engl.</i> subcutaneous, subkutan
SEM	<i>engl.</i> standard error of mean
SPMS	<i>engl.</i> secondary progressive multiple sclerosis, sekundär progrediente MS
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentralnervensystem

7. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Prinzip der Interaktionseffekte zwischen Risikofaktoren	7
Abbildung 2: Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.	9
Abbildung 3: Prozentuale Häufigkeit der klinischen Manifestationen der MS	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Erklärungsmodelle für die Entstehung der MS	16
Abbildung 5: Schematische Abbildung der histopathologischen Merkmale der Cuprizone-induzierten ZNS-Läsionen	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.	29
Abbildung 7: Platzierung der Hirnschnitte (HS) bzw. Rückenmarkschnitte (RMS) auf den Objektträgern.....	31
Abbildung 8: Schematische Darstellung der indirekten chromogenen immunhistochemischen Methode.....	36
Abbildung 9: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz.	36
Abbildung 10: Untersuchte Regionen (ROIs) im Vorderhirn.....	41
Abbildung 11: Infiltrationsindex.....	42
Abbildung 12: Repräsentative Bilder eines intakten Corpus callosum (CC; Score: 100) und eines komplett demyelinisierten CC wie nach 13 Wochen Cuprizone-Gabe (Score: 0).....	43
Abbildung 13: Krankheitsverlauf von EAE (N=8) und Cup+EAE (N=8) Mäusen.	45
Abbildung 14: Histopathologische Merkmale und Schweregrad der Rückenmarksläsionen.	46
Abbildung 15: Perivaskuläre Läsionen (PVCs) und Granulozytenrekrutierung in das Vorderhirn der EAE und Cup+EAE Mäuse.....	48
Abbildung 16: T-Zell-Rekrutierung in die Vorderhirne von EAE und Cup+EAE Mäusen...	49

Abbildung 17: Lymphozytenrekrutierung in periventrikuläre Bereiche des Vorderhirns über das Plexus-choroideus-Stroma..	52
Abbildung 18: Oligodendrogliopathie im Vorderhirn von EAE und Cup+EAE Mäusen.	54
Abbildung 19: Demyelinisierung im Vorderhirn von EAE- und Cup+EAE-Mäusen.	56
Abbildung 20: Mikrogliose und Monozyten-invasion im Vorderhirn von EAE und Cup+EAE Mäusen.	58

8. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Die 2017 McDonald Kriterien für die Diagnose einer MS bei Patienten mit klinischer Attacke.....	11
Tabelle 2: Verlaufsmodifizierende Therapie der Multiplen Sklerose	14
Tabelle 3: Histopathologische Merkmale der MS-Läsion-Subtypen	15
Tabelle 4: Evaluierungsprotokoll für EAE-Mäuse nach „Hooke Laboratories“	27
Tabelle 5: Auflistung von Materialien und Chemikalien, die bei der Durchführung von Tierversuchen verwendet wurden.	28
Tabelle 6: Herstellung von Lösungen, die bei der transkardialen Perfusion verwendet wurden.	30
Tabelle 7: Schritte bei Paraffineinbettung der Proben.....	30
Tabelle 8: Materialien/Chemikalien, die bei der Gewebepreparation und Paraffineinbettung verwendet wurden.	32
Tabelle 9: Ansetzen von Hämalaun- und Eosinlösung.....	33
Tabelle 10: Schritte bei Entparaffinierung und Entwässerung vor Eindeckung bei H&E Färbung.....	33
Tabelle 11: Ansetzen der Lösungen für die LFB/PAS Färbung.....	35
Tabelle 12: Schritte bei Entparaffinierung und Entwässerung vor Eindeckung bei IHC/IF. ..	37
Tabelle 13: Ansetzen der Lösungen für die IHC/IF.	38
Tabelle 14: Liste mit verwendeten Antikörpern. RRID (Research Resource Identifiers) [97]	39
Tabelle 15: Ansetzen der Neutrophilen Kit-Lösung.....	40
Tabelle 16: Materialien/Chemikalien, die bei den histologischen Färbungen verwendet wurden.	40
Tabelle 17: Klinische und histopathologische Merkmale der MS, die in unterschiedlichen präklinischen Mausmodellen widerspiegelt werden.	70

9. Literaturverzeichnis:

1. Rommer, P.S., et al., *Symptomatology and symptomatic treatment in multiple sclerosis: Results from a nationwide MS registry*. *Mult Scler*, 2019. **25**(12): p. 1641-1652.
2. Zhan, J., et al., *The Cuprizone Model: Dos and Do Nots*. *Cells*, 2020. **9**(4).
3. Goodin, D.S., *The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis*. *Handb Clin Neurol*, 2014. **122**: p. 231-66.
4. Kingwell, E., et al., *Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review*. *BMC Neurol*, 2013. **13**: p. 128.
5. Hawker, K., *Progressive multiple sclerosis: characteristics and management*. *Neurol Clin*, 2011. **29**(2): p. 423-34.
6. Thompson, A.J., et al., *Multiple sclerosis*. *Lancet*, 2018. **391**(10130): p. 1622-1636.
7. Nielsen, N.M., et al., *Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study*. *Am J Epidemiol*, 2005. **162**(8): p. 774-8.
8. International Multiple Sclerosis Genetics, C., *Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility*. *Science*, 2019. **365**(6460).
9. Olsson, T., L.F. Barcellos, and L. Alfredsson, *Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis*. *Nat Rev Neurol*, 2017. **13**(1): p. 25-36.
10. Marrie, R.A., *Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology*. *Lancet Neurol*, 2004. **3**(12): p. 709-18.
11. Thacker, E.L., F. Mirzaei, and A. Ascherio, *Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis*. *Ann Neurol*, 2006. **59**(3): p. 499-503.
12. Sotelo, J., et al., *Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis*. *Ann Neurol*, 2008. **63**(3): p. 303-11.
13. Berg-Hansen, P., et al., *Prevalence of multiple sclerosis among immigrants in Norway*. *Mult Scler*, 2015. **21**(6): p. 695-702.
14. Ascherio, A., et al., *Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study*. *JAMA*, 2001. **286**(24): p. 3083-8.
15. Abrahamyan, S., et al., *Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020. **91**(7): p. 681-686.
16. Handel, A.E., et al., *An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis*. *PLoS One*, 2010. **5**(9).
17. Nielsen, T.R., et al., *Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1*15 in multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 2009. **15**(4): p. 431-6.
18. Lassmann, H., et al., *Epstein-Barr virus in the multiple sclerosis brain: a controversial issue--report on a focused workshop held in the Centre for Brain Research of the Medical University of Vienna, Austria*. *Brain*, 2011. **134**(Pt 9): p. 2772-86.
19. Bjornevik, K., et al., *Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis*. *Science*, 2022. **375**(6578): p. 296-301.
20. Lublin, F.D., et al., *Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions*. *Neurology*, 2014. **83**(3): p. 278-86.

21. Miller, D., et al., *Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis*. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(5): p. 281-8.
22. Weinshenker, B.G., *Natural history of multiple sclerosis*. *Ann Neurol*, 1994. **36 Suppl**: p. S6-11.
23. Bejaoui, K. and L.A. Rolak, *What is the risk of permanent disability from a multiple sclerosis relapse?* *Neurology*, 2010. **74**(11): p. 900-2.
24. Mowry, E.M., et al., *The onset location of multiple sclerosis predicts the location of subsequent relapses*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009. **80**(4): p. 400-3.
25. Eriksson, M., O. Andersen, and B. Runmarker, *Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 2003. **9**(3): p. 260-74.
26. Kurtzke, J.F., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. *Neurology*, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
27. Koch, M., et al., *The natural history of primary progressive multiple sclerosis*. *Neurology*, 2009. **73**(23): p. 1996-2002.
28. Filippi, M., et al., *Multiple sclerosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2018. **4**(1): p. 43.
29. Thompson, A.J., et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. *Lancet Neurol*, 2018. **17**(2): p. 162-173.
30. Brusaferri, F. and L. Candelise, *Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials*. *J Neurol*, 2000. **247**(6): p. 435-42.
31. Le Page, E., et al., *Oral versus intravenous high-dose methylprednisolone for treatment of relapses in patients with multiple sclerosis (COPOUSEP): a randomised, controlled, double-blind, non-inferiority trial*. *Lancet*, 2015. **386**(9997): p. 974-81.
32. Correale, J., et al., *Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment*. *Brain*, 2017. **140**(3): p. 527-546.
33. Kasper, L.H. and A.T. Reder, *Immunomodulatory activity of interferon-beta*. *Ann Clin Transl Neurol*, 2014. **1**(8): p. 622-31.
34. *Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group*. *Lancet*, 1998. **352**(9139): p. 1498-504.
35. La Mantia, L., L.M. Munari, and R. Lovati, *Glatiramer acetate for multiple sclerosis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(5): p. CD004678.
36. Fox, R.J., et al., *Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(12): p. 1087-97.
37. O'Connor, P., et al., *Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(14): p. 1293-303.
38. Cohen, J.A. and J. Chun, *Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis*. *Ann Neurol*, 2011. **69**(5): p. 759-77.
39. Kappos, L., 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.
40. Cohen, J.A., et al., *Safety and efficacy of ozanimod versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a multicentre, randomised, 24-month, phase 3 trial*. *Lancet Neurol*, 2019. **18**(11): p. 1021-1033.
41. Polman, C.H., et al., *A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(9): p. 899-910.

42. Giovannoni, G., et al., *A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2010. **362**(5): p. 416-26.
43. Zhang, J., et al., *Alemtuzumab versus interferon beta 1a for relapsing-remitting multiple sclerosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **11**: p. CD010968.
44. Hauser, S.L., et al., *Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2017. **376**(3): p. 221-234.
45. Montalban, X., et al., *Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2017. **376**(3): p. 209-220.
46. Hauser, S.L., et al., *Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2020. **383**(6): p. 546-557.
47. Pirko, I., et al., *Gray matter involvement in multiple sclerosis*. Neurology, 2007. **68**(9): p. 634-42.
48. Popescu, B.F., I. Pirko, and C.F. Lucchinetti, *Pathology of multiple sclerosis: where do we stand?* Continuum (Minneap Minn), 2013. **19**(4 Multiple Sclerosis): p. 901-21.
49. Lassmann, H., J. van Horssen, and D. Mahad, *Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis*. Nat Rev Neurol, 2012. **8**(11): p. 647-56.
50. Lucchinetti, C., et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. Ann Neurol, 2000. **47**(6): p. 707-17.
51. Ziabreva, I., et al., *Injury and differentiation following inhibition of mitochondrial respiratory chain complex IV in rat oligodendrocytes*. Glia, 2010. **58**(15): p. 1827-37.
52. Metz, I., et al., *Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions*. Ann Neurol, 2014. **75**(5): p. 728-38.
53. Weiner, H.L., *Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease*. Arch Neurol, 2004. **61**(10): p. 1613-5.
54. Stys, P.K., et al., *Will the real multiple sclerosis please stand up?* Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(7): p. 507-14.
55. Podbielska, M. and E.L. Hogan, *Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis?* Mult Scler, 2009. **15**(9): p. 1011-29.
56. Rodriguez, M. and B. Scheithauer, *Ultrastructure of multiple sclerosis*. Ultrastruct Pathol, 1994. **18**(1-2): p. 3-13.
57. Ludwin, S.K. and E.S. Johnson, *Evidence for a "dying-back" gliopathy in demyelinating disease*. Ann Neurol, 1981. **9**(3): p. 301-5.
58. 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.
59. Kipp, M., et al., *Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective*. Brain Pathol, 2017. **27**(2): p. 123-137.
60. van der Valk, P. and S. Amor, *Preactive lesions in multiple sclerosis*. Curr Opin Neurol, 2009. **22**(3): p. 207-13.
61. Frischer, J.M., et al., *Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque*. Ann Neurol, 2015. **78**(5): p. 710-21.
62. Henderson, A.P., et al., *Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions*. Ann Neurol, 2009. **66**(6): p. 739-53.
63. Baxi, E.G., et al., *Transfer of myelin-reactive th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice*. J Neurosci, 2015. **35**(22): p. 8626-39.

64. Ruther, B.J., et al., *Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression*. *Glia*, 2017. **65**(12): p. 1900-1913.
65. Zeis, T., et al., *Molecular changes in white matter adjacent to an active demyelinating lesion in early multiple sclerosis*. *Brain Pathol*, 2009. **19**(3): p. 459-66.
66. Veto, S., et al., *Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death*. *Brain*, 2010. **133**(Pt 3): p. 822-34.
67. Machado-Santos, J., et al., *The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells*. *Brain*, 2018. **141**(7): p. 2066-2082.
68. Lopes Pinheiro, M.A., et al., *Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1862**(3): p. 461-71.
69. Wolburg, H. and W. Paulus, *Choroid plexus: biology and pathology*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(1): p. 75-88.
70. Kunis, G., et al., *Immunization with a Myelin-Derived Antigen Activates the Brain's Choroid Plexus for Recruitment of Immunoregulatory Cells to the CNS and Attenuates Disease Progression in a Mouse Model of ALS*. *J Neurosci*, 2015. **35**(16): p. 6381-93.
71. Cepok, S., et al., *Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis*. *Brain*, 2001. **124**(Pt 11): p. 2169-76.
72. Meeker, R.B., et al., *Cell trafficking through the choroid plexus*. *Cell Adh Migr*, 2012. **6**(5): p. 390-6.
73. Unger, W.W., et al., *Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(11): p. 3147-59.
74. Reboldi, A., et al., *C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(5): p. 514-23.
75. Peferoen, L., et al., *Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system*. *Immunology*, 2014. **141**(3): p. 302-13.
76. Kirby, L., et al., *Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3887.
77. Kassmann, C.M., et al., *Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes*. *Nat Genet*, 2007. **39**(8): p. 969-76.
78. Olah, M., et al., *Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination*. *Glia*, 2012. **60**(2): p. 306-21.
79. Lassmann, H. and M. Bradl, *Multiple sclerosis: experimental models and reality*. *Acta Neuropathol*, 2017. **133**(2): p. 223-244.
80. Mokhtarian, F., D.E. McFarlin, and C.S. Raine, *Adoptive transfer of myelin basic protein-sensitized T cells produces chronic relapsing demyelinating disease in mice*. *Nature*, 1984. **309**(5966): p. 356-8.
81. Scheld, M., et al., *Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain*. *J Neurosci*, 2016. **36**(4): p. 1410-5.
82. Kipp, M., et al., *Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond*. *Mult Scler Relat Disord*, 2012. **1**(1): p. 15-28.

83. Constantinescu, C.S., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1079-106.
84. Goldberg, J., et al., *Short-term cuprizone feeding induces selective amino acid deprivation with concomitant activation of an integrated stress response in oligodendrocytes*. Cell Mol Neurobiol, 2013. **33**(8): p. 1087-98.
85. Hesse, A., et al., *In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(2): p. 362-9.
86. Goldberg, J., et al., *Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice*. J Mol Neurosci, 2015. **57**(2): p. 166-75.
87. Kipp, M., et al., *The cuprizone animal model: new insights into an old story*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(6): p. 723-36.
88. Love, S., *Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphologic observations*. J Neurol Sci, 1988. **84**(2-3): p. 223-37.
89. Acs, P., et al., *Distribution of oligodendrocyte loss and mitochondrial toxicity in the cuprizone-induced experimental demyelination model*. J Neuroimmunol, 2013. **262**(1-2): p. 128-31.
90. Janssen, K., et al., *Absence of CCL2 and CCL3 Ameliorates Central Nervous System Grey Matter But Not White Matter Demyelination in the Presence of an Intact Blood-Brain Barrier*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(3): p. 1551-1564.
91. Pasquini, L.A., et al., *The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia*. Neurochem Res, 2007. **32**(2): p. 279-92.
92. Fischbach, F., et al., *Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3*. Glia, 2019. **67**(2): p. 263-276.
93. Iglesias, A., et al., *T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Glia, 2001. **36**(2): p. 220-34.
94. Yakimov, V., et al., *Continuous cuprizone intoxication allows active experimental autoimmune encephalomyelitis induction in C57BL/6 mice*. Histochem Cell Biol, 2019. **152**(2): p. 119-131.
95. Hochstrasser, T., et al., *Cuprizone-Containing Pellets Are Less Potent to Induce Consistent Demyelination in the Corpus Callosum of C57BL/6 Mice*. J Mol Neurosci, 2017. **61**(4): p. 617-624.
96. Wujek, J.R., et al., *Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(1): p. 23-32.
97. !!! INVALID CITATION !!! [168].
98. Mana, P., et al., *Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation*. J Neuroimmunol, 2009. **210**(1-2): p. 13-21.
99. Llovera, G., et al., *The choroid plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke*. Acta Neuropathol, 2017. **134**(6): p. 851-868.
100. Herder, V., et al., *Cuprizone inhibits demyelinating leukomyelitis by reducing immune responses without virus exacerbation in an infectious model of multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2012. **244**(1-2): p. 84-93.
101. Solti, I., et al., *Thymic Atrophy and Apoptosis of CD4+CD8+ Thymocytes in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129217.

102. Sen, M.K., et al., *Suppression of the Peripheral Immune System Limits the Central Immune Response Following Cuprizone-Feeding: Relevance to Modelling Multiple Sclerosis*. *Cells*, 2019. **8**(11).
103. Caprariello, A.V., et al., *Biochemically altered myelin triggers autoimmune demyelination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(21): p. 5528-5533.
104. Kaddatz, H., et al., *Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment*. *Glia*, 2021. **69**(4): p. 925-942.
105. Babbe, H., et al., *Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction*. *J Exp Med*, 2000. **192**(3): p. 393-404.
106. Aranami, T. and T. Yamamura, *Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS)*. *Allergol Int*, 2008. **57**(2): p. 115-20.
107. Berger, T., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system*. *Lab Invest*, 1997. **76**(3): p. 355-64.
108. Greer, J.M., et al., *Correlation of blood T cell and antibody reactivity to myelin proteins with HLA type and lesion localization in multiple sclerosis*. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 6402-10.
109. Titus, H.E., et al., *Pre-clinical and Clinical Implications of "Inside-Out" vs. "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis*. *Front Cell Neurosci*, 2020. **14**: p. 599717.
110. Tsantes, E., et al., *Location of first attack predicts the site of subsequent relapses in multiple sclerosis*. *J Clin Neurosci*, 2020. **74**: p. 175-179.
111. Faissner, S., et al., *Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies*. *Nat Rev Drug Discov*, 2019. **18**(12): p. 905-922.
112. Irvine, K.A. and W.F. Blakemore, *Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 6): p. 1464-77.
113. Brown, R.A., S. Narayanan, and D.L. Arnold, *Imaging of repeated episodes of demyelination and remyelination in multiple sclerosis*. *Neuroimage Clin*, 2014. **6**: p. 20-5.
114. Obermeier, B., R. Daneman, and R.M. Ransohoff, *Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier*. *Nat Med*, 2013. **19**(12): p. 1584-96.
115. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 158-73.
116. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds*. *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 174-90.
117. Niino, M., et al., *Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis*. *Ann Neurol*, 2006. **59**(5): p. 748-54.
118. Hochmeister, S., et al., *Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. **65**(9): p. 855-65.
119. Kapoor, R., et al., *Effect of natalizumab on disease progression in secondary progressive multiple sclerosis (ASCEND): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with an open-label extension*. *Lancet Neurol*, 2018. **17**(5): p. 405-415.
120. Choi, S.R., et al., *Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis*. *Brain*, 2012. **135**(Pt 10): p. 2925-37.
121. Vercellino, M., et al., *Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study*. *J Neuroimmunol*, 2008. **199**(1-2): p. 133-41.

122. Kaur, C., G. Rathnasamy, and E.A. Ling, *The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain*. J Neuropathol Exp Neurol, 2016. **75**(3): p. 198-213.
123. Schwerk, C., et al., *The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 80.
124. Nathanson, J.A. and L.L. Chun, *Immunological function of the blood-cerebrospinal fluid barrier*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(5): p. 1684-8.
125. Alldinger, S., et al., *Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis*. Acta Neuropathol, 1996. **92**(3): p. 273-80.
126. Ransohoff, R.M., *Immunology: In the beginning*. Nature, 2009. **462**(7269): p. 41-2.
127. Balashov, K.E., et al., *CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6873-8.
128. Sorensen, T.L., et al., *Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 807-15.
129. Hatterer, E., et al., *Cerebrospinal fluid dendritic cells infiltrate the brain parenchyma and target the cervical lymph nodes under neuroinflammatory conditions*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3321.
130. Rodriguez-Lorenzo, S., et al., *Inflammation of the choroid plexus in progressive multiple sclerosis: accumulation of granulocytes and T cells*. Acta Neuropathol Commun, 2020. **8**(1): p. 9.
131. Brown, J.W.L., et al., *Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. JAMA, 2019. **321**(2): p. 175-187.
132. Scheld, M., et al., *Mitochondrial Impairment in Oligodendroglial Cells Induces Cytokine Expression and Signaling*. J Mol Neurosci, 2019. **67**(2): p. 265-275.
133. Hovelmeyer, N., et al., *Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5875-84.
134. Prinz, M., S. Jung, and J. Priller, *Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts*. Cell, 2019. **179**(2): p. 292-311.
135. Merson, T.D., M.D. Binder, and T.J. Kilpatrick, *Role of cytokines as mediators and regulators of microglial activity in inflammatory demyelination of the CNS*. Neuromolecular Med, 2010. **12**(2): p. 99-132.
136. Voet, S., M. Prinz, and G. van Loo, *Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology*. Trends Mol Med, 2019. **25**(2): p. 112-123.
137. Sosa, R.A., et al., *The kinetics of myelin antigen uptake by myeloid cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2013. **191**(12): p. 5848-57.
138. Remington, L.T., et al., *Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1713-24.
139. Zrzavy, T., et al., *Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis*. Brain, 2017. **140**(7): p. 1900-1913.
140. Singh, S., et al., *Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons*. Acta Neuropathol, 2013. **125**(4): p. 595-608.

141. Li, W.W., et al., *Minocycline-mediated inhibition of microglia activation impairs oligodendrocyte progenitor cell responses and remyelination in a non-immune model of demyelination*. J Neuroimmunol, 2005. **158**(1-2): p. 58-66.
142. Tanaka, T., et al., *Minocycline reduces remyelination by suppressing ciliary neurotrophic factor expression after cuprizone-induced demyelination*. J Neurochem, 2013. **127**(2): p. 259-70.
143. Lampron, A., et al., *Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes*. J Exp Med, 2015. **212**(4): p. 481-95.
144. Plemel, J.R., et al., *Microglia response following acute demyelination is heterogeneous and limits infiltrating macrophage dispersion*. Sci Adv, 2020. **6**(3): p. eaay6324.
145. Lin, W., et al., *Interferon-gamma inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress*. Brain, 2006. **129**(Pt 5): p. 1306-18.
146. Omari, K.M., et al., *CXC chemokine receptors on human oligodendrocytes: implications for multiple sclerosis*. Brain, 2005. **128**(Pt 5): p. 1003-15.
147. Koning, N., et al., *Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions*. J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(2): p. 159-67.
148. Ji, Q., L. Castelli, and J.M. Goverman, *MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(3): p. 254-61.
149. Jakel, S., et al., *Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis*. Nature, 2019. **566**(7745): p. 543-547.

10. Eidesstattliche Versicherung

Yakimov, Vladislav

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel **„Untersuchung des Zusammenspiels metabolischer und autoimmuner Oligodendrogliopathie im kombinatorischen Mausmodell der Multiplen Sklerose“** selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, den 12.05.2023

Vladislav Yakimov

11. Danksagung

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

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, herzlich für die herausragende Betreuung meiner Promotion bedanken. Durch seine Begeisterung für die Wissenschaft, kreative Denkweise und fordernde, jedoch stets zuvorkommende und unterstützende Art hat er mir die wissenschaftliche Arbeitsweise beigebracht. Er stand mir während meiner gesamten Promotion mit ausgezeichnetem akademischem Rat und großer Geduld zur Seite. Letztlich danke ich Herrn Professor Kipp für seine Unterstützung bei der Veröffentlichung von wissenschaftlichen Publikationen, der Ermöglichung meiner Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen und der Verfassung zahlreicher Gutachten, die mich in meine akademische Laufbahn enorm weitergebracht haben.

Frau Dr. med. Tanja Hochstrasser danke ich ebenso für die großartige Mitbetreuung und wertvolle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz möchte ich für die Möglichkeit meine Promotion an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen, meinen Dank aussprechen.

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

Ich möchte mich auch bei meinen Kommilitonen und Mitdoktoranden für die gemeinsame Zeit und die große Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Brüder und meine Eltern für ihre unendliche Unterstützung und Liebe sowie an meine Freunde, die immer für mich da waren.