

Aus der Abteilung Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Bedeutung des p75-Neurotrophinrezeptors während der De- und Remyelinisierung
im Cuprizin-Modell der Multiplen Sklerose**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

Vorgelegt von
Susann-Cathrin Schüle
aus
Heidelberg

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

I. Berichtstatterin: Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

II. Berichtstatterin: Prof. Dr. med. I. Zerr

III. Berichtstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klinik und Verlaufsformen.....	2
1.1.3 Pathogenese	4
1.1.4 Diagnose der MS	7
1.1.5 Pathologische Subtypen der MS	8
1.1.6 Therapie	10
1.2 Das Cuprizon-Modell der MS	12
1.2.1 De- und Remyelinisierung im Cuprizon-Modell.....	12
1.2.2 Die Bedeutung des Cuprizon-Modells in Bezug auf MS	13
1.3 Neurotrophine und ihre Rezeptoren	15
1.3.1 Vorkommen und Bedeutung der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren.....	15
1.3.2 Die verschiedenen Interaktionen des p75 ^{NTR}	16
1.3.3 p75 ^{NTR} im Cuprizon-Modell	19
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Tierexperimente	21
2.1.1 Versuchstiere	21
2.1.2 Cuprizon-Tiermodell	22
2.1.3 Gewebeasservation	22
2.2 Histologische Aufarbeitung der Präparate.....	24
2.2.1 Histologische Färbung	24
2.2.2 Immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten.....	25
2.2.3 Elektronenmikroskopische Präparate	30
2.3 Auswertung.....	32
2.3.1 Mikroskopische Auswertung	33
2.3.2 Statistische Darstellung der Ergebnisse.....	35
3 Ergebnisse	36
3.1 De- und Remyelinisierungseffizienz in Abwesenheit des p75^{NTR}	36
3.1.1 Ausmaß der Demyelinisierung.....	36
3.1.2 Ausmaß der Remyelinisierung	39
3.2 Elektronenmikroskopische Analyse in p75^{NTR} -/- Mäusen.....	44
3.2.1 Analyse zum Demyelinisierungszeitpunkt.....	44
3.2.2 Analyse zum Remyelinisierungszeitpunkt	47

3.3	Axonale Schädigung bei p75^{NTR}-defizienten-Mäusen im Cuprizon-Modell.....	51
3.3.1	Ausmaß des axonalen Schadens im demyelinisierten Corpus callosum nach Cuprizon-Gabe in der APP-Färbung	51
3.3.2	Ausmaß des axonalen Schadens im demyelinisierten Corpus callosum nach Cuprizon-Gabe in der Synaptophysin-Färbung.....	54
3.3.3	Ausmaß des axonalen Schadens im remyelinisierten Corpus callosum nach Cuprizon-Absetzung in der APP-Immunhistochemie.....	57
3.3.4	Ausmaß des axonalen Schadens im remyelinisierten Corpus callosum nach Cuprizon-Absetzung in der Syn.-Immunhistochemie	60
3.4	Entzündungsreaktion bei p75^{NTR}-knockout-Mäusen im Cuprizon-Modell	63
3.4.1	Ausmaß der Entzündungsreaktion zum Demyelinisierungszeitpunkt	63
3.4.2	Ausmaß der Entzündungsreaktion zum Remyelinisierungszeitpunkt	64
4	Diskussion	67
4.1	Die Bedeutung des p75^{NT}-Rezeptors für die De- und Remyelinisierung im Cuprizon-Modell	67
4.1.1	Beeinflussung der Demyelinisierung durch den p75 ^{NTR}	67
4.1.2	Beeinflussung der Remyelinisierung durch den p75 ^{NTR}	68
4.2	Der Einfluss des p75^{NT}-Rezeptors auf die Axonvulnerabilität	72
4.2.1	Ausmaß des p75 ^{NTR} -un/abhängigen axonalen Schadens zum Demyelinisierungszeitpunkt.....	72
4.2.2	Ausmaß des p75 ^{NTR} -un/abhängigen axonalen Schadens zum Remyelinisierungszeitpunkt	72
4.3	Die Bedeutung des p75^{NT}-Rezeptors für die Entzündungsreaktion	75
4.3.1	Infiltration von CD3 ⁺ -Zellen in Abhängigkeit von der Expression des p75 ^{NTR} nach der Entmarkung	75
4.3.2	Infiltration von CD3 ⁺ -Zellen in Abhängigkeit von der Expression des p75 ^{NTR} nach Wiederherstellung der Myelinscheiden	75
5	Zusammenfassung.....	77
6	Literaturverzeichnis	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Schematischer Aufbau des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC-Methode)	26
Abbildung 2.2	Anatomische Einteilung des Corpus callosum	33
Abbildung 2.3	Vermessung der Axondurchmesser und ihrer zugehörigen Myelinscheiden in den elektronenmikroskopischen Auswertungen	34
Abbildung 3.1	Semiquantitative Auswertung des Demyelinisierungsgrades zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 3	37
Abbildung 3.2	Semiquantitative Auswertung des Demyelinisierungsgrades zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.2	38
Abbildung 3.3	Lichtmikroskopische Aufnahmen der medialen Corpora callosa in der LFB/PAS-Färbung zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 2	38
Abbildung 3.4	Semiquantitative Auswertung des Remyelinisierungsausmaßes zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2	39
Abbildung 3.5	Lichtmikroskopische Aufnahmen in der LFB/PAS-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2	40
Abbildung 3.6	Semiquantitative Auswertung des Remyelinisierungsausmaßes zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.4	40
Abbildung 3.7	Lichtmikroskopische Aufnahmen der medialen Corpora callosa in der LFB/PAS-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.4	41
Abbildung 3.8	Lichtmikroskopische Aufnahmen der lateralen Corpora callosa in der LFB/PAS-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.4	41
Abbildung 3.9	Semiquantitative Auswertung des Remyelinisierungsausmaßes zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 3	42
Abbildung 3.10	Lichtmikroskopische Aufnahmen der medialen Corpora callosa in der LFB/PAS-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.1	42
Abbildung 3.11	Vergleich der Axondurchmesser und Myelindicken zwischen den p75 ^{NTR} -/- Tieren und den wt-Tieren zum Demyelinisierungszeitpunkt	45
Abbildung 3.12	Elektronenmikroskopische Aufnahmen je eines p75 ^{NTR} -/- und wt-Tieres zum Demyelinisierungszeitpunkt	45

Abbildung 3.13	Vergleich der Axondurchmesser und Myelindicken zwischen den p75 ^{NTR} -knockout-Tieren und den Wildtyp-Tieren unter Cuprizon-Gabe mit unbehandelten Kontroll-Tieren zum Demyelinisierungszeitpunkt	46
Abbildung 3.14	Elektronenmikroskopische Aufnahmen je eines unbehandelten Kontroll-Tieres der p75 ^{NTR} -/- und wt-Gruppe und ihrer Cuprizon-behandelten Vergleichsgruppe zum Demyelinisierungszeitpunkt	47
Abbildung 3.15	Elektronenmikroskopische Aufnahmen je eines p75 ^{NTR} -/- und wt-Tieres zum Remyelinisierungszeitpunkt	48
Abbildung 3.16	Vergleich der Axondurchmesser und Myelindicken zwischen den p75 ^{NTR} -/- und wt-Tieren zum Remyelinisierungszeitpunkt	48
Abbildung 3.17	Elektronenmikroskopische Aufnahmen je eines Kontroll-Tieres und je eines Cuprizon-gefütterten Tieres der p75 ^{NTR} -/- und wt-Gruppe zum Remyelinisierungszeitpunkt	49
Abbildung 3.18	Quantifizierung der APP ⁺ -Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.2 und 3	52
Abbildung 3.19	Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.2 und 3	52
Abbildung 3.20	Quantifizierung der APP ⁺ -Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.1	53
Abbildung 3.21	Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.1	53
Abbildung 3.22	Quantifizierung der Syn. ⁺ -Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.2 und 3	54
Abbildung 3.23	Quantifizierung der Syn. ⁺ -Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.1	55
Abbildung 3.24	Immunhistologie des axonalen Schadens in der Syn.-Färbung zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 2	56
Abbildung 3.25	Quantifizierung der APP ⁺ -Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 4	57
Abbildung 3.26	Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.4	57
Abbildung 3.27	Quantifizierung der APP ⁺ -Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2	58
Abbildung 3.28	Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2	58

Abbildung 3.29	Quantifizierung der APP ⁺ -Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.3	59
Abbildung 3.30	Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.3	59
Abbildung 3.31	Quantifizierung der Syn. ⁺ -Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 2	60
Abbildung 3.32	Immunhistologie des axonalen Schadens in der Syn.-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2	61
Abbildung 3.33	Quantifizierung der Syn. ⁺ -Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.3 und 4	62
Abbildung 3.34	Immunhistologie des axonalen Schadens in der Syn.-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.3	62
Abbildung 3.35	Anzahl der T-Zellen zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1-3	63
Abbildung 3.36	Lichtmikroskopische Aufnahmen der T-Zell-Infiltration zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.1.	64
Abbildung 3.37	Anzahl der T-Zellen zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.2 und 3	64
Abbildung 3.38	Lichtmikroskopische Aufnahmen der T-Zell-Infiltration zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.3	65
Abbildung 3.39	Anzahl der T-Zellen zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 4	65
Abbildung 3.40	Lichtmikroskopische Aufnahmen der T-Zell-Infiltration zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.1	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Auflistung der Anzahl homozygote und heterozygoter p75 ^{NTR} -/- Mäuse sowie der Wildtyp-Mäuse pro Versuchsreihe	22
Tabelle 2.2	Verwendete Materialien für die Gewebeasservation	24
Tabelle 2.3	Verwendete Materialien für die lichtmikroskopischen Präparate	29
Tabelle 2.4	Primärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen	30
Tabelle 2.5	Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen	30
Tabelle 2.6	Verwendete Materialien zur Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate	32
Tabelle 3.1	Semiquantitative Analyse der LFB/PAS-Färbungen zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 3 [MW+/-SD]	36
Tabelle 3.2	Axondurchmesser und Myelindicken der verschiedenen Gruppen im Vergleich [MW+/-SD]	50
Tabelle 3.3	APP ⁺ -Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.2 und 3	51
Tabelle 3.4	T-Zell-Infiltration zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1-3	63

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	<i>antigen presenting cell</i> (Antigenpräsentierende Zelle)
APP	<i>amyloid-precursor-protein</i> (Amyloid-Vorläuferprotein)
ATPase	ATP-spaltendes Enzym
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bidest.	bidestillata (zweifachdestilliert)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CD3 ⁺	<i>cluster of differentiation 3 positive</i>
CIS	<i>clinically isolated syndrome</i> (klinisch isoliertes Syndrom)
DAB	3-3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DM	Demyelinisierung
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	<i>expanded disability status scale</i> (nach Kurtzke) (Skala der Behinderung bei MS)
EM	elektronenmikroskopisch

EPO	Erythropoetin
EtOH	Ethanol
F _{ab}	<i>fragment antigen-binding</i> (Antigen-bindendes Fragment)
F _c	<i>fragment crystallizable region</i> (kristallisierbares Fragment)
Fas	CD95 Ligand
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (Gliafaserprotein)
GTPase	Guanosintriphosphat-spaltendes Enzym
h	Stunde
HDAC1	Histon-Deazetylase1
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1α</i> (Hypoxie-induzierter Faktor-1 α)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM	<i>inter-cellular adhesion molecule</i> (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IFN	Interferon
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i> (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1)
IL	Interleukin
JC-Virus	Humanes Polyomavirus 2, das bei John Cunningham erstmals festgestellt wurde
JNK	c-jun-N-terminale Kinase
K ⁺	Kalium
Kat.-Nr.	Katalog-Nummer
kDa	Kilodalton
LFB	Luxol-fast-blue
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
Lingo-1	<i>leucine rich repeat and Ig domain containing-1</i>

LP	Liquorpunktion
LTD	<i>long-term depression</i> (Langzeit-Depression)
LTP	<i>long-term potentiation</i> (Langzeit-Potenzierung)
µm	Mikrometer
M	Molar
MAG	<i>myelin-associated glycoprotein</i> (Myelin-assoziiertes Glykoprotein)
MAP	<i>mitogen-activated-protein</i> (Mitogen-aktiviertes Protein)
MBP	<i>myelin-basic protein</i> (Myelin-basisches Protein)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min.	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metallo-Protease
MOG	<i>myelin-oligodendrocyte glycoprotein</i> (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein)
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natrium
NAWM	<i>normal appearing white matter</i> (normal erscheinende weiße Substanz)
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i> (nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B)
NG2	Chondroitinsulfat Proteoglykan
NGF	<i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
nm	Nanometer

NMSS	<i>National Multiple Sclerosis Society</i> (Nationale Multiple Sklerose Gesellschaft)
NO	Stickoxid
Nogo	<i>neurite outgrowth inhibitory protein</i> (Neuriten-wachstumshemmendes Protein)
ns	nicht signifikant
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
OCT	Optische Kohärenztomographie
Olig2	oligodendrocyte transcription factor 2
OMg	<i>Oligodendrocyte-myelin glycoprotein</i> (Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein)
OPC	<i>oligodendrocyte precursor cell</i> (Oligodendrozytenvorläuferzelle)
P	<i>probability</i> (Wahrscheinlichkeitswert)
p75 ^{NTR}	<i>75kDa nerve growth factor receptor</i> (p75-Neurotrophinrezeptor)
Par-3	protease-activated receptor-3
Pas	Perjodic-acid Schiff-reaction (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDGF- α	Platelet derived growth factor- α
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia von H_3O^+ neg. logarithmischer Anteil der Oxonium-Ionen (H_3O^+)
Pi-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PNS	Peripheres Nervensystem
PP-MS	<i>primary-progressive multiple sclerosis</i> (primär chronisch-progrediente Multiple Sklerose)

PR-MS	<i>progressive-relapsing multiple sclerosis</i> (progredient-schubförmige Multiple Sklerose)
Rac	G-Protein der Rho-Familie
Rip2	receptor interacting protein2
RM	Remyelinisierung
RR-MS	<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i> (Schubförmige Multiple Sklerose)
SD	Standardabweichung
Siah2	ubiquitin-ligase seven in absentia homolog2
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SP-MS	<i>secondary-progressive multiple sclerosis</i> (sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose)
Syn.	Synaptophysin
Tab.	Tabelle
TGF	<i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i> (Tumornekrosefaktor- α)
Trk	<i>tropomyosin-related kinase</i> (Tropomyosin-verwandte Kinase)
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> (enzymhistochemische Darstellung von apoptotischen Zellen)
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i> (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wt	Wildtypen
ZNS	Zentrales Nervensystem
-/-	<i>knockout</i>

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche, schubweise verlaufende Erkrankung des ZNS, die vermutlich auf einer autoimmunvermittelten Pathogenese gegen körpereigene Antigene beruht (Nylander und Hafler 2012). Sie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen bei Erwachsenen vor allem in den Industrieländern, mit insgesamt ca. einer Million betroffenen Patienten weltweit (Nakahara et al. 2010), von denen mehr als die Hälfte Frauen sind (Kuhlmann et al. 2009). Morphologisch ist MS durch demyelinisierte Axone im ZNS charakterisiert, welche für die Symptome verantwortlich sind und vor allem in frühen Stadien noch teilweise remyelinisiert werden können (Irvine und Blakemore 2008). Trotz des enormen Zugewinns an Erkenntnissen in den letzten Jahren und der Entwicklung von kausalen Therapiekonzepten ist die MS noch nicht heilbar.

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Die Pathogenese der MS ist bis heute nicht eindeutig geklärt; vermutlich wird sie durch ein Zusammenspiel von genetischen mit Umweltfaktoren verursacht (Ramagopalan et al. 2008). Zu diesen zählen neben viralen auch bakterielle Pathogene wie *chlamydia pneumoniae* (Giovannoni et al. 2006). So konnte beispielsweise für das Epstein-Barr-Virus (EBV), als Vertreter der Familie der Herpesviren, bislang zwar ein epidemiologischer Zusammenhang mit dem Erkrankungsaufreten gezeigt werden, allerdings sind die genauen Mechanismen noch unklar (Ascherio und Munger 2010; Sargsyan et al. 2010; Keegan und Noseworthy 2002). Ein weiterer potentieller Umweltfaktor stellt das Klima dar - so soll ein Vitamin-D-Mangel für die Krankheit prädestinieren (Ebers 2008). Dies wird von epidemiologischen Daten unterstützt: Im Gegensatz zum sonnigen afrikanischen und asiatischen Kontinent stellt MS in Europa sowie den USA eine häufige Diagnose dar (Compston 1999). Ebenfalls dazu passt die Beobachtung von Kurtzke, dass ein Nord-Süd-Gradient mit Häufung der Patienten im Norden besteht. Eine hohe Patientenzahl gerade in Süd-Australien legt aber nahe, dass dies nicht der alleinige ausschlaggebende Faktor sein kann (Kalmann und Lublin 1999), sondern dass auch gewisse ethnische Gruppen, wie beispielsweise die Kaukasier, anfälliger sind (Hogencamp et al. 1997).

Das Vorkommen mehrerer MS-Patienten in einer Familie führte zu der Annahme, dass eine genetische Prädisposition vorliegt (Hafler 2004), obwohl MS nicht direkt vererbbar ist (Noseworthy et al. 2000). Bestätigt ist aber dennoch, dass Verwandte ersten Grades ein

erhöhtes Risiko aufweisen, an MS zu erkranken (Sadovnick et al. 1997). So konnten bestimmte Subtypen des Major-Histocompatibility-Complex -MHC-I- (Dyment et al. 2004) und des MHC-II-Moleküls (Genotyp HLA-DR2 (Kalman und Lublin 1999) und HLA-DQ (Noseworthy et al. 2000)) als Risikogene bei MS-Patienten identifiziert werden. Sie sind unter anderem an der Antigenpräsentation gegenüber T- und B-Zellen beteiligt (Hemmer et al. 2002). Sawcer et al. (2011) beschreiben, dass bestimmte Gen-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*; SNPs), die v.a. die regulatorischen T-Zellen betreffen, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS zu spielen scheinen. Diese regulatorischen T-Zellen sind durch die Synthese des Zytokins Interleukin-2 sowohl an der T-Zell-Aktivierung als auch an ihrer Proliferationsförderung beteiligt. Oksenberg et al. (1999) fanden heraus, dass auch das X-Chromosom Einfluss auf die Krankheitsentwicklung hat. Dies erklärt möglicherweise, neben den bekannten hormonellen prädestinierenden Einflüssen durch erhöhte Östrogenspiegel (Orton et al. 2006), warum Frauen doppelt so häufig erkranken wie Männer (Sadovnick et al. 1997). Die genauen Abläufe, wie Umweltfaktoren und genetischer Hintergrund im Detail die Pathogenese der MS bestimmen, ist auch heute noch Forschungsgegenstand.

1.1.2 Klinik und Verlaufsformen

Der Beginn der adulten MS wird in der Regel als klinisch isoliertes Syndrom („*clinically isolated syndrome*“; CIS) beschrieben. Dabei handelt es sich um plötzlich auftretende Symptome, die hinweisend auf die demyelinisierende Erkrankung sind und sowohl durch zeitliche als auch durch örtliche Limitation charakterisiert sind (Miller D et al. 2012). So manifestiert sich beispielsweise eine Beteiligung des visuellen Systems als Optikusneuritis (Lightman et al. 1987) oder als Uhthoff-Phänomen, einer Sehstörung bei steigender Körpertemperatur (Pearce 2005). Symptome bei Befall des Hirnstamms bzw. des Kleinhirns können Ataxie und Ophthalmoplegie umfassen, wohingegen es bei Befall des Rückenmarks zu dem Lhermitte-Zeichen, einem schmerzhaften Gefühl entlang der Wirbelsäule bei Nackenbeugung, kommen kann (Huijbregts et al. 2006). Aber auch eine Hemiparese bei Befall einer Hemisphäre ist möglich (Miller D et al. 2012).

Später im Krankheitsverlauf auftretende Symptome können Blasen- und Darmstörungen sowie sexuelle Störungen sein (Courtney et al. 2011). Viele Patienten leiden im Krankheitsverlauf unter Fatigue und möglicherweise unter affektiven Störungen wie Depression (Vucic et al. 2010).

Sowohl die im MRT sichtbare Gehirnatrophie (Loseff et al. 1996) als auch die kortikalen Schädigungen (Rovaris et al. 2000) korrelieren mit der zunehmenden Behinderung der Patienten und mit kognitiven Störungen (Huijbregts et al. 2006).

Aufgrund der komplexen und heterogenen Klinik der MS teilte die National Multiple Sclerosis Society (NMSS) 1996 die klinischen Verlaufsformen in vier Gruppen ein:

Die schubförmige MS (*relapsing-remitting MS*; RR-MS) ist durch das Auftreten von Schüben gekennzeichnet, die sich mit symptomfreien Perioden abwechseln, in denen die Erkrankung nicht voranschreitet (Lublin und Reingold 1996). Sie stellt die häufigste Form, vor allem bei Patientinnen, dar und beginnt oft mit sensiblen Beeinträchtigungen (Noseworthy et al. 2000; Confavreux et al. 1980). Charakteristisch für sie ist ein, nach jahrelangem Verlauf, Übergang in die sekundär chronisch-progrediente MS (*secondary-progressive MS*; SP-MS). Hier schreitet die Erkrankung kontinuierlich fort und kann von zusätzlichen Schüben begleitet werden (Lublin und Reingold 1996). Ein Zusammenhang zwischen der Schubanzahl während der RR-Phase und dem zeitlichen Übergang in die SP-MS konnte nicht nachgewiesen werden (Confavreux et al. 2000; Confavreux et al. 2003; Confavreux und Vukusic 2006; Scalfari et al. 2010). Da beide oben genannten MS-Formen entzündliche Veränderungen aufweisen, (Huijbregts et al. 2006) wird vermutet, dass sie auf die gleiche Ätiologie zurückzuführen sind (Dutta und Trapp 2007).

Die primär chronisch-progrediente MS (*primary-progressive MS*; PP-MS) ist durch das Fehlen von Schüben definiert. Es kommt von Diagnosestellung an zu einer stetigen Symptomzunahme, die auch von möglichen Stillständen und kleinen Verbesserungen nicht aufgehalten wird (Lublin und Reingold 1996). Sie betrifft meist eine etwas ältere Patientengruppe (Beginn etwa um die 40 Jahre) und kommt bei 10-20% aller Patienten beider Geschlechter vor (Thompson et al. 1997). Prognostisch ist der Verlauf mit dem der SP-MS vergleichbar. Das klinische Bild ist geprägt von motorischen und sensiblen Symptomen durch spinale Plaques, Kleinhirnsymptome sowie kognitive Probleme (McDonnell und Hawkins 2002). Diese könnten durch Kortextentmarkungen bedingt sein, die auffallend häufig sowohl bei PP-MS als auch bei SP-MS festgestellt wurden (Albert et al. 2007).

Die seltenste Form, die progredient-schubförmige MS (*progressive-relapsing MS*; PR-MS), weist wie die RR-MS Schübe auf, die entweder vollständig reversibel sein können oder auch zu Residualschäden führen können. Allerdings schreitet hier die Erkrankung in der schubfreien Zeit voran (Lublin und Reingold 1996).

Zusammenfassend gilt, dass Schübe auf eine gerade ablaufende Entzündung im ZNS hinweisen und es durch ihre Beendigung zur Symptomrückbildung kommen kann. Die Progression der Erkrankung, die auch eine Gehirnatrophie - bei SP-, PP- und PR-MS - mit einschließt, wird dagegen durch das pathologische Korrelat des axonalen Verlustes (Confavreux et al. 2000) sowie Neuronen-Untergangs erklärt (Bjartmar und Trapp 2001; Hemmer et al. 2002).

1.1.3 Pathogenese

Neben Robert Carswell (1838) gilt auch Jean Cruveilhier (1841) als einer der Erstbeschreiber der MS (Lassmann 1999). Die erste klinische Beschreibung als „Hirnsklerose“ erfolgte 1856 durch den Göttinger Frerich gefolgt von Charcot (1825-93), der heute noch mit der „Charcot-Trias“ bestehend aus Nystagmus, Intentionstremor und skandierender Sprache bekannt ist (Kesselring 2004).

Wie Rivers schon 1933, so vermutet man heute noch, dass es sich bei MS um eine chronische Autoimmunerkrankung des ZNS handelt, die mit Entzündung, Demyelinisierung und axonalem Verlust einhergeht (Lassmann 1999). Ob MS als Autoimmunerkrankung mit weiteren Erkrankungen aus diesem Formenkreis assoziiert ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden (Ebers 2008).

Wahrscheinlich läuft die von Rindfleisch 1863 beschriebene Entzündung nach folgendem Schema ab (Lassmann 1999; Steinman 2001): Zuerst werden die T-Zellen in den Lymphknoten über Antigene des ZNS (z.B. Myelin-basisches Protein=MBP, Myelin-assoziiertes Glykoprotein=MAG, Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein=MOG (Hohlfeld und Wekerle 2001)) bzw. dem ZNS strukturell ähnliche Antigene (Viren wie Epstein-Barr (EBV)) aktiviert (Hemmer et al. 2002). Gelangen autoreaktive T-Zellen im Rahmen der Immunüberwachung in das ZNS, kann deren T-Zellrezeptor durch Präsentation des spezifischen Antigens auf MHC-II-Molekülen (Keegan und Noseworthy 2002) auf Makrophagen und dendritischen Zellen aktiviert werden (Nakahara et al. 2010). Das von den T-Zellen im Anschluss synthetisierte Zytokin TNF- α sorgt dafür, dass das Endothel im ZNS Zelladhäsionsmoleküle wie *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) exprimiert, wodurch weitere T-Zellen die Bluthirnschranke (BHS) passieren können. Die Passage des sich an die BHS anschließenden Gewebes ermöglichen Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP), die vermehrt im Liquor von MS-Patienten nachweisbar sind (Steinman 2001). Nach dem Zusammenbruch der BHS-Integrität können auch andere Zellen des peripheren Immunsystems, wie

Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen oder Komplementfaktoren, ins ZNS gelangen (Hemmer et al. 2002).

An der anschließenden axonalen Demyelinisierung sind sowohl spezifische (Antikörper) und unspezifische (Komplement, Zytokine) humorale Faktoren als auch spezifische (T-Zellen) und unspezifische zelluläre Komponenten (Mikroglia/Makrophagen) beteiligt. Diese führen entweder direkt über eine Zerstörung der Oligodendrozyten bzw. des Myelins oder indirekt über eine Förderung der Entzündung zur Entmarkung.

Im ZNS kommt es zur Aktivierung der ZNS-Antigen-spezifischen $CD4^+$ -T-Zellen über eine Bindung mit MHC-II-tragenden Antigen-präsentierenden Zellen (antigen presenting cells; APCs). Die $CD4^+$ - Th_1 - bzw. - Th_2 -Zellen haben gegensätzliche Effekte: aktivierte $CD4^+$ - Th_1 -Zellen fördern über ihre proinflammatorischen Zytokine, wie beispielsweise Interferon- γ und TNF- α , das entzündliche Geschehen (Keegan und Noseworthy 2002). Durch ihre Rezeptorbindung bewirken sie eine Stickoxid-Synthese (NO) durch Makrophagen. Dieser Vorgang ist toxisch für die Oligodendrozyten und verursacht axonalen Schaden (Steinman 2001). Makrophagen beteiligen sich zudem an der Demyelinisierung über die Synthese von Proteasen, Sauerstoffradikalen, Zytokinen und Chemokinen (Noseworthy 1999). Im Gegensatz dazu wirken $CD4^+$ - Th_2 -Zellen über ihre Zytokine IL-4, IL-10, Interferon- β und transformierender Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor*; TGF- β), entzündungshemmend (Keegan und Noseworthy 2002).

$CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen werden durch Bindung an MHC-I-Moleküle, auf denen ihr spezifisches Antigen präsentiert wird, aktiviert. Sie können die Demyelinisierung durch den Apoptose-indizierenden Fas-Liganden und die Ausschüttung von Oligodendrozyten lysierendem Perforin unterstützen (Noseworthy 1999). Entzündungsfördernde Th_{17} -Zellen können über vaskuläre Strukturen in das ZNS gelangen und durch Ausschüttung ihrer Zytokine IL-17 und IL-23 die BHS-Integrität stören (Nylander und Hafler 2012). Sobald die BHS nicht mehr intakt ist, können auch B-Zellen in das ZNS einwandern. Nachdem sie ihr Antigen gebunden haben, werden sie über Bindung der von Th_1 - oder Th_2 -Zellen sezernierten Zytokine, wie beispielsweise TNF- α , aktiviert. Anschließend sezernieren sie dann Autoantikörper (Hemmer et al. 2002), die möglicherweise auch gegen Myelinbestandteile, wie u.a. MOG, gerichtet sind (Genain et al. 1999; Zhou D et al. 2006) und die Komplementkaskade (c9 neo) aktivieren (Hemmer et al. 2002). Ihre Präsenz kann auch anhand der intrathekal nachweisbaren oligoklonalen Banden sichtbar gemacht werden (Mc Farland und Martin 2007).

Vermutlich durch die Demyelinisierung kommt es zum axonalen Schaden, der zum einen durch den Myelin- bzw. Oligodendrozytenschaden bedingt ist (Matthews et al. 1998; Kornek et al. 2000), zum anderen auch durch das entzündliche Milieu im ZNS, das u.a. zu einer toxischen Glutamatsynthese von Mikroglia und Lymphozyten führt (Dutta und Trapp 2007; McFarland und Martin 2007) – auch in Abwesenheit von T-Zellen (Wang et al. 2005). Nachweisbar ist der axonale Schaden vorwiegend in akuten (Trapp et al. 1999) und weniger in chronischen und remyelinisierten Läsionen (Kuhlmann et al. 2002; Stadelmann und Brück 2008; Siffrin et al. 2010) sowie in der „normal-erscheinenden weißen Substanz“ (*normal appearing white matter*; NAWM) (Bjartmar und Trapp 2001). Klinisch kann dieser axonale Schaden unter Umständen unauffällig bleiben, falls er sich an einer nicht eloquenten Stelle befindet, andernfalls macht er sich als Schub bzw. progrediente Symptomverschlechterung bemerkbar (Dutta und Trapp 2007).

Die Reversibilität des Schubes kann primär durch Rückgang des entzündungsbedingten Ödems und sekundär durch Na⁺-Kanal-Einbau und nachfolgende Remyelinisierung erklärt werden. Des Weiteren trägt auch die Kompensation des axonalen Schadens durch das ZNS zur Schubrückbildung bei (Bjartmar und Trapp 2001; Noseworthy 1999). Im Verlauf der Erkrankung akkumuliert der axonale Schaden allerdings und führt so zu bleibenden neurologischen Defiziten (Matthews et al. 1998; Lee M et al. 2000; Trapp et al. 1999; Lassmann 1999). Neben der weißen Substanz ist auch der Kortex sowohl von axonalem Verlust (Peterson et al. 2001) als auch von der Demyelinisierung betroffen. Hier scheint die Remyelinisierung aber effektiver abzulaufen als in der weißen Substanz (Stadelmann et al. 2008). Die Bedeutung der Remyelinisierung liegt vor allem im Schutz vor weiterem axonalen Schaden, gerade bei noch gering vorhandener Restentzündungsaktivität (Kornek et al. 2000; Kuhlmann et al. 2002). Organisiert wird die Remyelinisierung zum kleinen Teil von reifen Oligodendrozyten (Blakemore und Keirstead 1999), hauptsächlich aber von den Oligodendrozytenvorläuferzellen (Bradl und Lassmann 2010).

Remyelinisiert werden vorwiegend akute Läsionen, da möglicherweise nur eine begrenzte Anzahl von Vorläuferzellen zur Verfügung stehen (Blakemore und Keirstead 1999) und bei einem Teil der Patienten unter Umständen auch Antikörper gegen Oligodendrozytenvorläuferzellen gebildet werden (Niehaus et al. 2000). Aber auch steigendes Lebensalter und weniger effektive Beseitigung des Myelindebris stellen Limitationen für die Remyelinisierung dar (Bradl und Lassmann 2010). Der Nachweis von Chondroitinsulfat Proteoglykan (NG2) und *Oligodendrocyte transcription factor2* (Olig2), beides Marker für Oligodendrozytenvorläuferzellen, gelang zwar auch in chronischen MS-Plaques, allerdings findet hier, im

Vergleich zu akuten Läsionen, nur eine geringere Remyelinisierung statt (Chang et al. 2000). Kuhlmann et al. (2009) führen dies auf die hier ebenfalls nur wenig ausgeprägte Entzündungsantwort zurück. Auch werden in dieser Arbeit heterogene Remyelinisierungsbestrebungen, selbst innerhalb derselben Patienten beschrieben, sodass diese neben systemischen Faktoren wie Alter, Geschlecht und Gene, auch durch noch unbekannte lokale Faktoren bedingt sein könnten.

Neben der Autoimmunpathogenese existiert die These, dass MS durch einen primären oligodendroglialen Schaden bedingt sein könnte, der erst sekundär zu den entzündlichen Infiltraten führt (Chaudhuri und Behan 2004). Grundlage dafür bietet die neuropathologische Einteilung nach Lucchinetti et al. von 2001, deren Typ III, charakterisiert durch primären Oligodendrozytentod, als initialer Mechanismus für die Pathogenese angesehen wird (Nakahara et al. 2010). Wie und ob diese beiden Theorien miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig bedingen, bleibt bislang noch Forschungsgegenstand.

1.1.4 Diagnose der MS

Eine schnelle und sichere Diagnosestellung ist essentiell, um möglichst früh im Krankheitsverlauf eine individuelle Therapie beginnen zu können. Im Gegensatz zur rein klinischen Diagnosestellung, die den Nachweis von mindestens zwei Schüben fordert, ermöglichen die neuen McDonald Kriterien von 2010 nach Polman et al. (2011) die Diagnose schon nach dem ersten klinischen Schub in Kombination mit einer gleichzeitig sichtbaren Läsion in der Magnetresonanztomographie (MRT). Die aktiven MS-Läsionen sind als Gadolinium-aufnehmende Hyperintensitäten in der T2-Wichtung vor allem in der weißen Substanz von Hirnstamm, Kleinhirn, periventrikulärem Bereich, aber auch im Bereich des Rückenmarks nachweisbar. Hypointensitäten in der T1-Wichtung können bei Reversibilität für ein Ödem in der akuten Phase der Demyelinisierung sprechen. Bei wiederholter Darstellbarkeit sind sie allerdings als schwerer chronischer Gewebeschaden zu interpretieren (Filippi et al. 2012).

Eine weitere wertvolle diagnostische Methode stellt die Liquorpunktion (LP) dar. Dabei handelt es sich um den Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese von IgG, die anhand des Delpech-Lichtblau-Quotienten quantifiziert werden kann (=Liquor/Serum-Quotient von IgG : Liquor/Serum-Quotient von Albumin) und indikativ für einen Defekt der BHS ist (Delpech und Lichtblau 1972; Delank und Gehlen 2006). Zusätzlich können im Liquor oligoklonale Banden nachgewiesen werden, die einen Rückschluss der Immunglobulinsynthese auf wenige Zelllinien ermöglichen und auf ein chronisch

entzündliches Geschehen hinweisen (Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012). Durch Kombination von MRT-Bildgebung und LP kann die Sensitivität der Diagnosestellung auf bis zu 100% erhöht werden (Schäffler et al. 2010).

Zur optimalen Einstellung und Kontrolle der Therapie sowie zur Progredienz-Beurteilung der MS sollte neben der neurologischen Untersuchung die mögliche Gehstrecke anhand des EDSS-Scores (*expanded disability status scale*) nach Kurtzke durchgeführt werden. Dabei werden auf der Skala von 0-10 aufsteigende Werte für eine abnehmende Gehstrecke vergeben. So steht der Wert 0 für den Befund, dass keine nachweisbaren Defizite vorliegen, der Wert 5 für die verbleibende Fähigkeit, nur noch wenige Schritte zu gehen, bis hin zu einem Wert von 9, der die vollständige Bewegungsunfähigkeit beschreibt (Kurtzke 2008; Kesselring 2004).

Eine modernere Möglichkeit, den Progress der MS und damit den bislang akkumulierten Krankheitsschaden einschätzen zu können, stellt die optische Kohärenztomografie (OCT) dar. Anhand dieses nichtinvasiven Verfahrens kann der aktuelle axonale Retinaschaden, der auf das Ausmaß der krankheitsbedingten Degeneration schließen lässt, beurteilt werden. Dieses Verfahren ist sehr sensitiv und kann daher schon subklinische Veränderungen nachweisen. In Zusammenschau mit der MRT-Bildgebung kann hiermit ein guter Überblick über das Krankheitsausmaß gewonnen werden (Galletta et al. 2011).

1.1.5 Pathologische Subtypen der MS

Histologische Charakteristika von MS sind entzündliche Infiltrate, bestehend aus T- und B-Zellen sowie Makrophagen und Mikroglia, neben Myelin- und im Verlauf auch auftretendem Oligodendrozytenverlust. Dieser kann teilweise von einer Remyelinisierung unterschiedlichen Ausmaßes begleitet werden. Weiterhin werden eine verminderte Anzahl von Axonen und das Auftreten von Narbengewebe in der weißen Substanz beschrieben (Brück und Stadelmann 2005). Dabei zeigen akute MS-Läsionen neben dem akuten axonalen Schaden eine Infiltration sowohl von Lymphozyten sowie Myelin-phagozytierenden Makrophagen als auch von reaktiv veränderten Astrozyten. Gelegentlich kommt es hier schon zur Remyelinisierung. Die chronischen MS-Läsionen lassen sich in chronisch-aktive und chronisch-inaktive Plaques unterteilen. Dabei sind die chronisch aktiven durch vereinzelte randständige Makrophagen charakterisiert, die Myelindebris beseitigen, im Rahmen eines Saums aus aktivierten Mikroglia-Zellen mit eingestreuten T-Zellen. Die inaktiven MS-Läsionen fallen hauptsächlich durch Fasergliose und Zellverlust neben einer meist geringen Anzahl noch vorhandener Axone auf (Frohman et al. 2006).

Durch immunhistologische Untersuchungen von Präparaten zahlreicher biopsierter MS-Läsionen gelang es Luchinetti et al. 2000, das Dogma, dass die axonale Demyelinisierung auf eine einzige Ursache zurückzuführen ist, zu widerlegen. Sie klassifizierten histologisch vier verschiedene Subtypen von MS-Läsionen, die jedoch nicht mit der klinischen Einteilung in die verschiedenen Verlaufsformen übereinstimmen.

Typ I

Die perivenösen entzündlichen Infiltrate enthalten T-Zellen und Makrophagen. Das von ihnen ausgeschüttete TNF- α wird maßgeblich für die starke Demyelinisierung verantwortlich gemacht. Da die Oligodendrozyten entweder im Bereich der aktiven Läsion nur mäßig reduziert oder im inaktiven Plaque-Zentrum fast gar nicht reduziert sind, ermöglichen sie eine rasche Remyelinisierung.

Typ II

Der am häufigsten vorkommende Typ II zeigt, wie Typ I, perivenös lokalisierte Läsionen. Allerdings findet man in den Plaques neben T-Lymphozyten auch aktivierte Komplementkomponenten als Hinweis auf eine Komplement-vermittelte Demyelinisierung. Dies erklärt auch, warum nur in diesem Subtyp Antikörperablagerungen gefunden wurden. Myelin wird hier durch Antikörperbindung und eventuell durch Porenbildung der Komplementfaktoren zerstört und durch die vorhandenen Antikörper opsonisiert, gefolgt von Phagozytose durch Makrophagen und Mikroglia. Die nur mäßig reduzierten Oligodendrozyten erklären die ausgeprägten Remyelinisierungsvorgänge.

Typ III

Der am zweithäufigsten vorkommende Typ weist oftmals weniger scharf begrenzte Entmarkungsherde auf, die meist nicht perivenös zentriert erscheinen. Das entzündliche Infiltrat besteht wiederum aus T-Zellen und Makrophagen. Allerdings finden sich hier zahlreiche apoptotische Oligodendrozyten, vor allem in der unmittelbar periläsionalen weißen Substanz. Die Apoptose der Oligodendrozyten ist nicht nur maßgeblich verantwortlich für die Demyelinisierung, sondern auch der Grund dafür, warum bei diesem Typ die Remyelinisierung schlechter stattfinden kann. Da dieser Typ nur bei besonders schwer verlaufenden Formen der MS nachgewiesen wurde (Luchinetti et al. 2000), könnte er der Baloschen konzentrischen Sklerose ähneln (Stadelmann et al. 2005; Franklin und Ffrench-Constant 2008) – einem Subtyp der MS, der früher häufig rasch tödlich verlief und auf einem primären Oligodendrozytentod zu beruhen scheint (Capello und Mancardi 2004).

Typ IV

Dieser Subtyp, der bislang nur in Autopsien gefunden wurde, weist bei der enzymatischen Darstellung von apoptotischen Zellen (*terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*; TUNEL) zugrundegehende Oligodendrozyten in der periläsionalen weißen Substanz auf und ähnelt somit Typ III.

Die Beobachtung, dass jeweils nur ein histologischer Typ bei einem Patienten festgestellt werden konnte, spricht für die heterogene Ätiologie der Erkrankung: Den Typen I und II scheint eine primäre Demyelinisierung mit konsekutivem sekundären Oligodendrozytentod zugrunde zu liegen. Dies spiegelt somit die weitverbreitete Annahme wider, die von einer autoimmunen Genese der Erkrankung ausgeht (König et al. 2008).

Grundlage der Typen III und IV ist ein primärer Oligodendrozytentod, dem eine sekundäre Demyelinisierung folgt, einem Vorgang, wie er in viralen bzw. Toxin-induzierten Modellen der MS angetroffen wird (Luchinetti et al. 2000).

Über welche Prozessschritte die unterschiedlichen Mechanismen zum axonalen Schaden führen und welche therapeutischen Ansatzpunkte sich daraus ableiten lassen könnten, ist aktueller Forschungsgegenstand (Petratos et al. 2010).

1.1.6 Therapie

MS ist bislang nicht heilbar, allerdings stehen neben symptomatischen auch den Krankheitsverlauf modulierende Therapien zur Verfügung. Dieser ist jedoch sehr heterogen, sodass die Therapiemöglichkeiten individuell für den Patienten ausgewählt werden müssen.

Die akute Schubtherapie zielt auf eine Rückbildung der aktuellen Symptome ab und besteht aus der intravenösen Gabe von hochdosierten antiinflammatorischen Glukokortikoiden, die eine Entzündungsreduktion bewirken (Rhen und Cidlowski 2005). Allerdings kann eine Dauermedikation mit Steroiden weder den Krankheitsprogress noch das Auftreten weiterer Schübe verhindern (Milligan et al. 1987). Bei Steroid-resistenten Schüben kann alternativ eine Besserung durch eine Plasmapherese (Weinshenker et al. 1999) bzw. eine Immunadsorption erreicht werden (Havla et al. 2012).

Die RR-MS sowie die SP-MS werden mit den immunmodulatorischen Medikamenten IFN- β und Glatirameracetat behandelt, die nachweislich die Anzahl der Schübe reduzieren können (Noseworthy et al. 2000). IFN- β als physiologischer Bestandteil der Immunantwort auf Entzündungen (Huynh et al. 1995) behindert die Antigenpräsentation körpereigener Proteine über Downregulation von MHC-II-Molekülen und verhindert damit die Aktivierung von (autoreaktiven) T-Zellen (Dhib-Jalbut 2002). In der Folge wird vermehrt IL-10 gebildet, das

eine antiinflammatorische TH₂-Antwort bewirkt (Noseworthy et al. 2000; Dhib-Jalbut 2002). Auch trägt IFN- β zur Aufrechterhaltung der BHS-Stabilität bei, wodurch weniger Immunzellen in das ZNS gelangen können (Khan et al. 2011). Um das, bei manchen Menschen beobachtete, Risiko der Antikörperbildung gegen Interferone zu reduzieren, wird die gleichzeitige Gabe von Interferonen und Steroiden empfohlen (Zarkou et al. 2010).

Klinisch vergleichbare Ergebnisse wie IFN- β erzielt auch Glatirameracetat bei der RR-MS-Therapie (Goodin 2008). Das Peptid ähnelt strukturell dem MBP, das durch seine Bindung an das MHC-II-Molekül autoreaktive und entzündungsfördernde Th₁-Zellen aktiviert (Dhib-Jalbut 2002). Wenn statt des MBP nun Glatirameracetat an das MHC-II-Molekül bindet, werden die autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie inaktiviert (Noseworthy et al. 2000). Des Weiteren aktiviert Glatirameracetat durch die Ausschüttung von Zytokinen die antiinflammatorischen TH₂-Zellen (Neuhaus et al. 2001).

Falls diese Basistherapie nicht ausreichend ist, muss eine Eskalationstherapie mit Fingolimod, Natalizumab oder Mitoxantron in Erwägung gezogen werden. Fingolimod ist das erste orale immunmodulierende Medikament zur Schubreduktion. Als Antibiotika-Abkömmling bindet Fingolimod statt des Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Lipids an dessen Rezeptor. Dieser S1P-Rezeptor wird von T- und B-Zellen zur Migration aus den Lymphknoten (LK) benötigt. Bindet nun Fingolimod anstatt des S1P-Lipids an ihn, können sowohl T- als auch B-Zellen nicht mehr aus den LK migrieren und damit keine Entzündung fördern. Des Weiteren kann Fingolimod auch die BHS überwinden und sorgt auch hier über die Interaktion mit Astrozyten und Oligodendrozyten für protektive Effekte (Martin 2010).

Der humanisierte Antikörper Natalizumab besetzt die α 4-Bindungsstelle der Leukozyten, über die sie normalerweise an den VCAM-Rezeptor der Endothelzellen binden und anschließend in das entzündliche Infiltrat immigrieren können (Brown 2009). Da der α 4-Rezeptor u.a. auch auf B-, T-Zellen und Monozyten exprimiert wird, sinkt die Anzahl der eingewanderten Entzündungszellen in das ZNS durch die Gabe von Natalizumab drastisch. Allerdings besteht durch die Supprimierung der Immunzellen (Nylander und Hafler 2012) die Gefahr einer JC-Virus-Infektion unter Therapie (Havla et al. 2012) und somit der Entwicklung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) (Bourdette und Whitham 2010).

Das Anthrazyklinderivat und Zytostatikum Mitoxantron wirkt immunsuppressiv über Induktion von Lyse der B-Zellen (Gbadamosi et al. 2003) und T-Zellen (Neuhaus et al. 2005). Die potente Mitoxantron-Therapie ist allerdings zeitlich limitiert, da unter ihr nicht nur eine

Kardiotoxizität (Hartung et al. 2002), sondern auch das vermehrte Auftreten von akuter myeloischer Leukämie (AML) (Havla et al. 2012) beobachtet wurden und es noch keine Daten zu den Langzeitfolgen gibt (Kingwell et al. 2010).

Bei der PR-MS steht neben der rein symptomatischen Therapie die aktuelle Schubtherapie mit Interferon-Gabe bei nachweislicher entzündlicher Aktivität im Vordergrund (Havla et al. 2012). Alternativ rät Murray 2006, eine Therapie mit Mitoxantron zu erwägen.

Für die PP-MS, die durch die Abwesenheit von Schüben charakterisiert ist, wird lediglich eine individuelle symptomatische Therapie empfohlen (Khan et al. 2011).

Als Therapieausblick sollte erforscht werden, warum es bei einem kleinen Teil der Patienten zum Krankheitsprogress unter Immunsuppressiva-Gabe bzw. nach autologer Knochenmarkstransplantation kommt (Metz et al. 2007). Eine These vermutet, dass unter dieser Therapie auch benigne autoreaktive T-Zellen zu Grunde gehen (Hohlfeld et al. 2006). Des Weiteren wird auf lange Sicht eine therapeutische Förderung der schnellen Remyelinisierung angestrebt, um axonale Degeneration und damit Krankheitsprogression (Dubois-Dalcq et al. 2005) bzw. irreversible Symptome zu verhindern (Petratos et al. 2010). Dies kann möglicherweise durch Stammzelltransplantation, die derzeit in Tieren getestet wird, erreicht werden (Franklin und Ffrench-Constant 2008).

In Anbetracht der Bedeutung der axonalen Schädigung für die klinische Symptomatik wird für die Zukunft eine Kombination von antiinflammatorischen mit neuroprotektiven Therapeutika wie beispielsweise Östrogen, Fumarat, Minocyclin und Erythropoetin angestrebt (Chen et al. 2012).

1.2 Das Cuprizon-Modell der MS

1.2.1 De- und Remyelinisierung im Cuprizon-Modell

Cuprizon (Bis-cyclohexanonoxalyldihydrazon) ist eine Substanz, die bei oraler Gabe in Mäusen und Ratten zur Demyelinisierung hauptsächlich des Corpus callosum führt. Die derzeitige Hypothese zum Wirkungsmechanismus der oralen Aufnahme des Kupferchelators beruht auf der Annahme, dass Cuprizon zur Hemmung von mitochondrialen Enzymen führt. Dies geschieht über Komplexbildung von Cuprizon mit Kupfer, sodass dieses den Enzymen, wie der Monoamin-Oxidase und der Cytochrom C-Oxidase, nicht mehr zur Verfügung steht mit konsekutiver Reduktion der Aktivität. Im Falle einer verminderten Enzymaktivität der Monoamin-Oxidase häufen sich Stoffwechselprodukte an, die zu einer Mitochondrien-schädigung führen, wohingegen bei Ausfall der Cytochrom C-Oxidase der konstante pH-Wert

im ZNS nicht mehr aufrecht erhalten werden kann (Kipp et al. 2009). In der Folge kommt es zu einer Oligodendrozytenapoptose mit axonaler Demyelinisierung (Copray et al. 2005; Matsushima und Morell 2001; Blakemore 1972). Trotzdem führt eine Cuprizin-Gabe nicht zur systemischen Toxizität, sondern nur zur lokalen Entmarkung im ZNS (Hiremath et al. 1998). Außerdem tritt unter Cuprizin-Gabe eine Lebervergrößerung auf und gegebenenfalls die Entwicklung eines Hydrozephalus; dieser wird durch ein Ödem mit nachfolgender Stenose im Aquädukt verursacht (Kesterson und Carlton 1970). Der zugrunde liegende Pathomechanismus umfasst eine Hemmung der ATPase im Gehirn mit konsekutiver Inhibition von Transportmechanismen und Störung der Ionenhomöostase, welche zur intrazellulären Ödembildung führt (Howell et al. 1974). Auch Astrogliose sowie eine Wachstumsinderung werden unter Cuprizin-Gabe beschrieben (Kipp et al. 2009).

Während der Demyelinisierung unter Cuprizin-Gabe wird neben einer Aktivierung der Mikroglia-Zellen zur Beseitigung der apoptotischen Oligodendrozyten und des Myelindebris auch eine Erhöhung des insulinähnlichen Wachstumsfaktors-1 (*Insulin-like-growth factor-1*; IGF-1) beobachtet. Dieses Zytokin ermöglicht u.a. durch Apoptoseschutz der neuen Oligodendroglia eine Remyelinisierung (Matsushima und Morell 2001). Klinisch zeigt sich die Remyelinisierung durch eine Symptomrückbildung (Liebetanz und Merkler 2006), obwohl die Myelinscheiden ihren ursprünglichen Durchmesser nicht mehr annehmen und somit die initialen Faserdurchmesser nicht wieder erreicht werden (Blakemore 1973b). Studien zeigen, dass die Remyelinisierung sehr heterogen ausfallen kann und es mehrere Gründe dafür gibt. Dazu zählen beispielsweise steigendes Alter der Mäuse, das zu abnehmender Myelinisierungskapazität führt (Irvine und Blakemore 2008), und dass eine langsamere Remyelinisierung bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Mäusen zu verzeichnen ist (Li W et al. 2006). Auch scheint die Lokalisation der Entmarkung eine entscheidende Rolle zu spielen: Während Blakemore (1973b) eine nahezu vollständige axonale Remyelinisierung im Pedunculus cerebellaris superior nachwies, war diese in den Axonen des Corpus callosum deutlich reduziert (Mason et al. 2001). Die Arbeit von Mason et al. 2001 zeigt weiterhin eine abnehmende Remyelinisierungskapazität mit Zunahme der Dauer der Demyelinisierung. Dies mag durch die abnehmenden Zahl der Oligodendrozytenvorläuferzellen bedingt sein, die schließlich erschöpft ist (Matsushima und Morell 2001) oder durch Veränderungen der von ihnen benötigten Wachstumsfaktoren (Mason et al. 2001).

1.2.2 Die Bedeutung des Cuprizin-Modells in Bezug auf MS

Neben der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und der Theiler-Virus-Infektion stellt das Cuprizin-Modell eine experimentelle Möglichkeit dar, De- und

Remyelinisierungsvorgänge in Mäusen zu untersuchen (Mason et al. 2001). Blakemore (1973a) berichtete schon über den Gewinn von kontrollierten und reproduzierbaren Ergebnissen in diesem Modell. Seine Bedeutung liegt heute vor allem in der Möglichkeit, MS-Formen zu untersuchen, die primär nicht auf einer autoimmunvermittelten Basis, sondern auf einer Zerstörung von Oligodendrozyten beruhen. Autoreaktive T-Zellen, die als ursächlich für die Pathogenese der MS angesehen werden, sind in diesem Modell initial nicht vorhanden (Torkildsen et al. 2008).

Während in der EAE die Demyelinisierung durch Entzündung verursacht wird, läuft diese im Cuprizon-Modell Toxin-induziert ab und ähnelt histologisch den Subtypen III und IV nach Lucchinetti (Torkildsen et al. 2008). Diese histologischen Subtypen der MS sind durch primäre Oligodendrozytenapoptose und sekundär auftretende Entmarkungen charakterisiert (Kipp et al. 2009). Barnett und Prineas (2004) sehen diese Morphologie als Beginn jeder MS-Erkrankung an: Nach massiver Oligodendrozytenapoptose mit folgender Demyelinisierung entstehen erst sekundär entzündliche Infiltrate, die u.a. T-Zellen enthalten. Daher konnten T-Zellen erst in Bereichen mit fortgeschrittener Demyelinisierung nachgewiesen werden. Torkildsen et al. (2008), McMahon et al. (2002) und Matsushima und Morell (2001) erklären die geringe Anzahl von T-Zellen in den experimentellen Entmarkungsherden durch die intakte BHS-Schranke im Cuprizon-Modell, die das Einwandern von T-Zellen in das ZNS behindert. Des Weiteren lässt sich im Cuprizon-Modell während der Demyelinisierung eine vermehrte Anzahl von Mikroglia-Zellen feststellen, die sowohl zur Entmarkung beitragen (Hiremath et al. 1998) als auch durch die Beseitigung der Myelinfragmente die Remyelinisierung erleichtern (McMahon et al. 2002). Da die Demyelinisierung –im Gegensatz zu den Typen III und IV nach Lucchinetti– beinahe vollständig reversibel ist (Irvine und Blakemore 2006), eignet sich das Cuprizon-Modell dazu, die Vorgänge der Remyelinisierung zu untersuchen (Skripulez et al. 2008). So gelang der Nachweis, dass eine umgehende Wiederherstellung der Myelinscheiden den axonalen Schaden, der während der Demyelinisierung entsteht, gering halten kann (Irvine und Blakemore 2008). Auch konnte im Cuprizon-Modell gezeigt werden, dass die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*; OPC) zu reifen Oligodendrozyten durch das Zytokin LIF (Leukämie-inhibierender Faktor) und den Wachstumsfaktor PDGF- α (*Platelet derived growth factor- α*) gefördert wird (Kerschensteiner et al. 2003). Zudem unterstützt das, u.a. auch von T-Zellen produzierte, Zytokin LIF eine vermehrte Myelinproduktion im Cuprizon-Modell (Kipp et al. 2009).

1.3 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

1.3.1 Vorkommen und Bedeutung der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren

1990 wurden die vier Homodimere NGF (*Nerve growth factor*), BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), Neurotrophin-3 (NT-3) sowie Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) erstmals von Barde et al. 1983 als Neurotrophine beschrieben. Alle werden als Proneurotrophine synthetisiert und anschließend proteolytisch von Plasmin und Matrix-Metalloproteinasen zu reifen Neurotrophinen gespalten (Hempstead 2002). Neurotrophine werden sowohl von peripheren und zentralen Neuronen als auch vom Immunsystem synthetisiert und weisen in ihrer aktiven Form strukturelle Ähnlichkeiten untereinander auf (Lewin und Barde 1996). Die Homodimere können an zwei verschiedene Rezeptorarten binden: Einerseits Tropomyosin-verwandte Kinasen (*tropomyosin-related kinases*; Trks) und andererseits an einen den TNF-Rezeptoren strukturell ähnlichen Rezeptor namens $p75^{NT}$ -Rezeptor. Beide Rezeptor-Typen kommen im zentralen und peripheren Nervensystem vor (Bothwell 1995). Jedes Neurotrophin geht bevorzugt eine Interaktion mit einem Trk-Subtyp ein. So bindet beispielsweise NGF nur an TrkA, wohingegen BDNF und NT-4/5 an TrkB und NT-3 an TrkC binden. Alle Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) und ihre Pro-Formen (Pro-NGF/BDNF/NT-3/NT-4/5) binden an den $p75^{NTR}$ (Friedman und Greene 1999; Chao 2003).

Neurotrophine unterstützen während der neuronalen Entwicklung die Differenzierung von Neuronen und fördern das Zellüberleben (Snider 1994) sowie das axonale Wachstum (Huang und Reichardt 2001). Protektive Effekte der Neurotrophine umfassen bei adulten Neuronen neben der Begrenzung des axonalen Schadens über BDNF bzw. NT-3/TrkB (Weibel et al. 1995) auch die Unterstützung der axonalen Regeneration über BDNF/TrkB-Bindung (Kobayashi et al. 1997). Zusätzlich wird ihnen eine Verzögerung der axonalen Degeneration bei MS zugeschrieben (Kerschensteiner et al. 2003).

Weiterhin beeinflussen Neurotrophine synaptische Übertragungen (Thoenen 1995) nicht nur durch Förderung der *long-term depression* (LTD) über proBDNF/ $p75^{NTR}$, sondern auch durch die *long-term potentiation* (LTP) über BDNF/TrkB-Bindung (Woo et al. 2005). Die zur Remyelinisierung notwendige Oligodendrozytenproliferation wird von NGF (Althaus et al. 1992) bzw. von NT-3 und BDNF gefördert (Mc Tighe et al. 1998).

Die Neurotrophine haben auch immunmodulatorische Wirkungen. So bewirkt die NT-3/ $p75^{NTR}$ - bzw. NGF/ $p75^{NTR}$ - und NGF/TrkA-Bindung über reduzierte $IFN-\gamma$ und verstärkte IL-10-Ausschüttung eine geringere Expression von MHC-II-Molekülen auf Mikroglia-Zellen (Neumann et al. 1998). Dadurch werden weniger entzündungsfördernde

Th₁-Zellen aktiviert (Villoslada et al. 2000). Des Weiteren stimuliert NGF sowohl die Proliferation von B-Zellen über den p75^{NTR}- und TrkA-Rezeptor als auch deren Antikörper-Synthese (Kerschensteiner et al. 2003). Auch BDNF/TrkB wird als weiteres Neurotrophin von T- und B-Zellen in entzündlichen Läsionen produziert und ist mit neuronalem (Kerschensteiner et al. 1999) und B-Zellüberleben assoziiert (Torcia et al. 1996), wohingegen eine proBDNF/Sortilin/p75^{NTR}-Bindung apoptotisch auf B-Zellen und Plasmazellen wirkt (Fauchais et al. 2008).

Im Gegensatz zum p75^{NT}-Rezeptor weisen die Trk-Rezeptoren eine enzymatische Aktivität auf (Blöchl et al. 2004), die sie nach Bindung der dimerischen Neurotrophin-Liganden zur Konformationsänderung und damit zu ihrer Aktivierung nutzen, sodass sie neuronales Zellüberleben fördern können (Chao 2003). Allerdings gibt es auch Unterschiede zwischen den Trk-Rezeptoren: TrkA fördert neuronales Zellüberleben über einen *second-messenger*, nämlich die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Pi-3K), wohingegen TrkB zusätzlich zu Pi-3K diese Wirkung noch über die *mitogen-activated protein-Kinase* (MAP-Kinase) entfaltet. Des Weiteren bewirkt BDNF durch Bindung an TrkB eine reduzierte Expression dieses Rezeptors, NGF-Bindung an TrkA im Gegensatz dazu nicht (Lee F et al. 2001).

1.3.2 Die verschiedenen Interaktionen des p75^{NTR}

Die Größe von 75 kDa hat dem Transmembranprotein seinen Namen gegeben (Bothwell 1995), das als Vertreter der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie in seinem extrazellulären Teil cysteinreiche Bindungsstellen für (Pro)Neurotrophine enthält. Daran können alle vier Neurotrophine mit gleicher Affinität binden, wobei ihre Vorläufer, die Proneurotrophine, die stärkste Bindungsaffinität zu dem p75^{NTR} aufweisen. Da der p75^{NT}-Rezeptor physiologischerweise nicht nur von Blutgefäßen und glatten Muskelzellen exprimiert wird, sondern auch von Nervenzellen sowohl im ZNS als auch im PNS, ergeben sich daraus vielfältige Zielstrukturen (Barker 2004).

Apoptose vermittelt der p75^{NTR} durch verschiedene Effektormoleküle wie Ceramide, Caspasen und c-jun-N-terminale Kinasen (JNK). Im Falle einer Bindung von reifen Neurotrophinen, wie einer NGF/p75^{NTR}-Bindung bzw. einer BDNF/p75^{NTR}-Bindung (Ham et al. 2000; Lu et al. 2005; Roux et al. 1999; Chao 2003), kann die Apoptose JNK-vermittelt ablaufen (Casaccia-Bonofil et al. 1996). Dabei wird JNK über Rac (ein G-Protein der Rho-Familie) aktiviert, sobald ein aktiver p75^{NT}-Rezeptor zur Verfügung steht (Harrington et al. 2002; Yamashita et al. 2002). Eine andere Möglichkeit stellt die Aktivierung der Caspase 1 durch den NGF/p75^{NTR}-Komplex dar (Gu et al. 1999). Aber auch Neurotrophin-Vorstufen wie

proNGF oder proBDNF können durch Bindung an den $p75^{\text{NTR}}$ Apoptose auslösen. Dafür wird zusätzlich der Korezeptor Sortilin benötigt, der die Prodomäne der Vorstufen abspaltet. Dadurch können auch Komplexe, bestehend aus proNGF/Sortilin/ $p75^{\text{NTR}}$ und proBDNF/Sortilin/ $p75^{\text{NTR}}$, den Zelltod vermitteln (Nykjaer et al. 2004). Auf diesem Weg kann der $p75^{\text{NTR}}$ während der Entwicklung Apoptose nicht nur für überschüssige Neurone im ZNS (Bentley und Lee K 2000), sondern auch für Schwannzellen im PNS vermitteln (Miller F und Kaplan 2001).

Generell binden die Proformen der Neurotrophine bevorzugt an den $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor mit konsekutiver Apoptose, während reife Neurotrophine Zellüberleben durch zusätzliche Bindung an Trk-Rezeptoren vermitteln (Lee F et al. 2001). Dies gelingt über den Komplex bestehend aus NGF/TrkA/ $p75^{\text{NTR}}$, der im Gegensatz zu einer reinen NGF/ $p75^{\text{NTR}}$ -Bindung eine höhere Affinität aufweist (Lad et al. 2003; Chao 2003). Allerdings gilt dies lediglich für NGF. Falls stattdessen das Neurotrophin BDNF an den Komplex bindet, kommt es über die erwähnte Ceramid-Kaskade, mit konsekutiver Inaktivierung von Pi-3K, zur Apoptose (Huang und Reichardt 2001). Durch diese Selektion verhindert der $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor, dass eine unspezifische Ligandenbindung Zellüberleben fördert (Barker 1998). Die Apoptose wird im Falle des NGF/TrkA/ $p75^{\text{NTR}}$ -Komplexes durch Supprimierung von JNK durch TrkA verhindert. Dadurch kommt es nicht zur Hydrolyse von Sphingomyelin und somit nicht zur Ceramid-Produktion (Blöchl A und Blöchl R 2007). Dieser Ablauf wurde für das Überleben sowohl von Oligodendrozyten als auch von Neuronen beobachtet (Yoon et al. 1998). Aber auch eine singuläre NGF/ $p75^{\text{NTR}}$ -Bindung kann neuronales Zellüberleben sowohl im ZNS als auch im PNS über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bewirken (Carter et al. 1996; Gentry et al. 2000). Im PNS bindet dafür zusätzlich noch die Proteinkinase der Schwannzellen (*Receptor interacting protein*; Rip2) an die intrazelluläre $p75^{\text{NTR}}$ -Todesdomäne (Khursigara et al. 2001).

Neben der Förderung des neuronalen Zellüberlebens wurden für den $p75^{\text{NTR}}$ auch Einflüsse auf Zellwachstum und Migration beschrieben: So fördert ein aktivierter $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor über Ras (ras Sarkoma) das Zellwachstum und die Organisation der regelrechten Zellmigration (Blöchl A und Blöchl R 2007; Miller F und Kaplan 2001), wohingegen die inaktive Form des $p75^{\text{NTR}}$ über Rho hemmend wirkt - auch auf das Wachstum von Tumoren (Blöchl A und Blöchl R 2007). Zusätzlich kann neuronales Wachstum über den NogoR/ $p75^{\text{NTR}}$ /Lingo-1-Komplex (Neuriten-wachstumshemmendes Protein; *neurite outgrowth inhibitory protein*; Nogo) nach Bindung von Liganden, wie beispielsweise Nogo-66, Myelin-assoziiertes Glykoprotein, (*myelin-associated glycoprotein*; MAG) oder Oligodendrozyten-Myelin-

Glykoprotein (*Oligodendrocyte myelin glycoprotein*; OMGP), limitiert werden (Lu et al. 2005).

Die Effekte des p75^{NT}-Rezeptors auf axonales Wachstum sind vielfältig und teilweise sogar gegenläufig: Einerseits fördert eine NGF/p75^{NTR}-Bindung, durch Supprimierung der GTPase Rho, axonales Wachstum. Andererseits kann MAG über den p75^{NTR} Rho aktivieren und dadurch axonalem Wachstum, aber sogar axonaler Regeneration entgegenwirken (Dechant und Barde 2002). Neben MAG können auch OMGP oder Nogo-A an den Rezeptorkomplex Nogo-R/p75^{NTR}/Lingo binden und ebenfalls die axonale Regeneration inhibieren (Domeniconi et al. 2005).

Im PNS vermittelt der p75^{NTR} auf Schwannzellen eine effektive Myelinisierung während der Entwicklung (zweite Schwangerschaftshälfte bis erstes Lebensjahr; Ende nach dem 20. Lebensjahres (Stangel und Hartung 2002)) nach Bindung von BDNF (Cosgaya et al. 2002). Auch exprimieren Schwannzellen den p75^{NTR} wieder vermehrt nach einem axonalen Schaden (Syroid et al. 2000), sodass nach Bindung von BDNF/NGF an p75^{NTR} eine erfolgreiche Remyelinisierung ermöglicht wird (Tomita et al. 2007). Diese relativ hohe Expression des p75^{NT}-Rezeptors im ZNS ist im adulten Zustand physiologischerweise nur noch in großen kortikalen Projektionsneuronen des basalen Vorderhirns zu finden (Barker 1998). Hier ist der p75^{NT}-Rezeptor an der synaptischen Plastizität beteiligt: Die Bindung von proBDNF an p75^{NTR} resultiert in einer LTD im Hippokampus (Woo et al. 2005), die zur Synapsenrückbildung führen kann (Lu et al. 2005).

Analog zu den Vorgängen im PNS wird derzeit ein möglicherweise fördernder Einfluss des p75^{NT}-Rezeptors auf die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen und damit auf die Remyelinisierung diskutiert (Coprav et al. 2005). Die Remyelinisierung ist nicht nur für die saltatorische Erregungsleitung essentiell, sondern bietet auch einen Schutz vor weiterer axonaler Degeneration (Dubois-Dalcq et al. 2005): Demyelinisierte Axone weisen über die umgekehrte Wirkung der Na⁺-K⁺-ATPase eine hohe intrazelluläre Konzentration von Natrium auf, die zur Akkumulation von axonschädigendem Calcium führt. Bei remyelinisierten Axonen sind hingegen sowohl Natrium- als auch Calcium-Konzentration in normalen, nicht schädlichen Bereichen detektierbar (Smith 2006; Black et al. 2006).

Bei MS nimmt der p75^{NTR} eine sehr heterogene Rolle ein: so agiert er einerseits als Entzündungsmediator durch Induktion einer vermehrten Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (*inter-cellular adhesion molecule 1*; ICAM1) an Endothelzellen, das die Leukozytenmigration durch die BHS erlaubt und so wesentlich zur Entstehung von

entzündlichen Plaques beiträgt (Akassoglou et al. 2003). Andererseits scheint eine NGF/p75^{NTR}-Bindung auch einen Entzündungsrückgang zu bewirken. So wiesen Copray et al. (2004) eine erhöhte Letalität bei Mäusen nach, denen der p75^{NT}-Rezeptor in dem Modell der EAE fehlte.

Des Weiteren konnte der p75^{NT}-Rezeptor in MS-Läsionen neben Oligodendrozyten (Hohlfeld et al. 2006) auch auf geschädigten Neuronen nachgewiesen werden. Gegenüber den geschädigten Zellen scheint der p75^{NTR} Apoptose zu vermitteln, falls Proneurotrophine an ihn binden (Dechant und Barde 2002). Bei Expression des p75^{NTR} auf gesunden adulten Oligodendrozyten (Ladiwala et al. 1998) oder ihren Vorläuferzellen scheint dieser jedoch das Zellüberleben und ihre Differenzierung zu fördern (Chang et al. 2000).

Zusammenfassend gilt, dass die pro- bzw. antiapoptotische Wirkung des p75^{NTR} wesentlich davon abhängt, welche Zellen ihn exprimieren, in welchem (Entwicklungs)Zustand sich diese befinden und wie die Verfügbarkeit seiner Korezeptoren und deren Liganden ist (Hempstead 2002).

1.3.3 p75^{NTR} im Cuprizin-Modell

Cuprizin-Gabe bewirkt über selektive Oligodendrozytenapoptose axonale Demyelinisierung und führt darüber zur Aktivierung von Mikroglia-Zellen und zur Astroglieose in weitestgehender Abwesenheit von inflammatorischen T-Zellen.

Beobachtungen von Copray et al. (2005) zeigen, dass nach initialer Cuprizin-Aufnahme die Oligodendrozyten der C57BL/6-Mäuse sehr früh den pro-apoptotisch-wirkenden p75^{NTR} exprimierten. Allerdings wiesen auch Tiere ohne den p75^{NTR} in gleichem Maße degenerierte Oligodendrozyten auf. Daher scheint der p75^{NTR} für den frühen, Cuprizin-induzierten Zelltod der Oligodendrozyten nicht erforderlich zu sein, sondern lediglich als eine Art Stressrezeptor als Antwort auf die Cuprizin-Gabe exprimiert zu werden. Dies bestätigt Beobachtungen, bei denen der p75^{NTR} bislang lediglich bei Patienten mit MS, jedoch nicht bei gesunden Probanden nachgewiesen werden konnte. Welche Wirkung über eine Ligation des p75^{NTR} vermittelt wird, also ob überlebensfördernd oder pro-apoptotisch, scheint demnach vom Zeitraum abzuhängen, in dem er exprimiert wird. Zu Beginn der Cuprizin-Gabe werden ihm überlebensfördernde Eigenschaften nachgesagt, bei im Verlauf schon degenerierten Zellen hingegen eher die Vermittlung von Apoptose, vor allem in Anwesenheit eines inflammatorischen Milieus.

In der Cuprizin-Pause beobachteten Copray et al. 2005 das Auftreten von OPC neben einem reduzierten Ausmaß an aktivierten Mikroglia-Zellen bei Wildtyp (wt)- und auch bei $p75^{NTR}$ -knockout-Tieren. Jedoch zeigten sich in der Remyelinisierungsphase keine Unterschiede zwischen beiden Vergleichsgruppen, sodass der $p75^{NTR}$ auch nicht für die Proliferation von OPCs zuständig zu sein scheint.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Der axonale Schaden im ZNS wird derzeit als Hauptursache der irreversiblen Beeinträchtigungen bei MS erachtet (Schirmer et al. 2012). Im PNS wurde nach einer Schädigung eine vermehrte Expression des $p75^{NTR}$ auf Schwannzellen beobachtet, die sich förderlich auf die axonale Regeneration auswirkte (Zhou X und Li H 2007). Daher war ein Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob es unter Entmarkungsbedingungen zu einer vermehrten axonalen Schädigung im ZNS bei Abwesenheit des $p75^{NTR}$ kommt. Als Modell verwendete ich die Cuprizin-induzierte Entmarkung in der Maus; die axonale Schädigung wurde immunhistochemisch dargestellt und quantifiziert. Ebenfalls wurde das Ausmaß der axonalen Schädigung in Abhängigkeit von der $p75^{NT}$ -Rezeptorexpression während der Remyelinisierung untersucht.

Der $p75^{NTR}$ wird auf Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimiert und hat möglicherweise protektive Wirkungen auf das Oligodendrozytenüberleben, die Oligodendrozytenvorläuferzellendifferenzierung und die Remyelinisierung. Daher wurde ebenfalls im Cuprizin-Modell das Ausmaß der De- und Remyelinisierung in Abhängigkeit von der $p75^{NTR}$ -Expression quantifiziert.

Zusätzlich wurde untersucht, ob ein Fehlen des $p75^{NT}$ -Rezeptors die BHS-Integrität sowohl nach Cuprizin-induzierter Demyelinisierung als auch nach erfolgter Remyelinisierung stört und diese somit durchlässiger für entzündungsfördernde $CD3^+$ -T-Lymphozyten wird.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimente

2.1.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden die auf Lee K et al. (1992) zurückgehenden p75^{NTR}-knockout-Mäuse verwendet, die von der Firma The Jackson Laboratory (The Jackson Laboratory; Bar Harbor, Maine, USA) vertrieben werden. Diesen Mäusen fehlt das Exon 3, das für die extrazelluläre Bindungsdomäne des p75^{NT}-Rezeptors kodiert. Somit können bei diesen Mäusen keine extrazellulären Liganden mehr an den p75^{NT}-Rezeptor binden. Abgesehen von reduzierten peripheren Sensibilitätsstörungen, durch ein Fehlen der NGF-Wirkung, weisen die Mäuse in jungem Alter bis zu vier Monaten keine weiteren Auffälligkeiten auf (Lee KF et al. 1994).

Die Vergleichsgruppe setzte sich aus Mäusen des Stammes C57Bl/6 zusammen, die von der Firma Charles River (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Dabei handelt es sich um 1920 von Little entwickelte Inzuchtmäuse, die auf Pathogene mit einer Th₁-Antwort reagieren (Sharrer 2007). Schon Hiremath et al. (1998) wiesen erfolgreich Demyelinisierung im Cuprizone-Modell bei diesem Mausstamm nach. Um den von Li W et al. (2006) beschriebenen Einfluss von hormonellen Faktoren auf die Remyelinisierung zu vermeiden, wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet.

Nach dem Eintreffen der Mäuse in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der medizinischen Fakultät Göttingen gewöhnten sich die Tiere mehrere Tage an Normalfutter, Wasser und einen 12h/12h Hell-/Dunkel-Zyklus. Die Tierhaltung und Durchführung der Experimente mit den acht bis zehn Wochen alten Mäusen erfolgte nach den Richtlinien der tierexperimentellen Einrichtung der Universität Göttingen. Die Genehmigung für die Tierversuche erfolgte durch die Bezirksregierung Braunschweig (G97/08).

Um statistisch korrekte Aussagen treffen zu können, wurden mindestens 15 Tiere pro Experiment und pro Gruppe eingesetzt, wobei die Experimente drei- bis vierfach wiederholt wurden. Dabei wurde folgende Anzahl von Mäusen verwendet:

Experiment	Genotyp		
	Anzahl p75 ^{NTR} -/- Tiere	Anzahl p75 ^{NTR} +/- Tiere	Anzahl Wildtyp-Tiere
DM	22	4	37
RM	28	-	15

Tabelle 2.1: Auflistung der Anzahl homozygoter und heterozygoter p75^{NTR} -/- Mäuse sowie der Wildtyp-Mäuse pro Versuchsreihe.

2.1.2 Cuprizon-Tiermodell

Orale Cuprizon-Gabe bewirkt eine reproduzierbare Demyelinisierung mit hoher regionaler Variabilität, die sowohl Anteile der grauen als auch der weißen Substanz des Gehirns betrifft (Kipp et al. 2009; Gudi et al. 2009). Als Vertreter der weißen Substanz wurde in der Arbeit das Corpus callosum untersucht, das nachweislich auf eine Cuprizon-Gabe gut anspricht (Kipp et al. 2009). Hier beginnt die Demyelinisierung nach zweiwöchiger Cuprizon-Gabe und erreicht ihr Maximum nach sechswöchiger Cuprizon-Gabe.

Für die Experimente der Demyelinisierung (Exp.1-3) wurde beiden Maus-Gruppen für sechs Wochen 0,25% Cuprizon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) ihrem ad libitum Futter in pulverisierter Form beigemischt. Diese Zeitspanne wurde gewählt, um den Vorgang der Demyelinisierung untersuchen zu können und um in etwa das Maximum der Cuprizon-induzierten Demyelinisierung zu erhalten (Kipp et al. 2009).

Um die Remyelinisierung (Exp.1-4) zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Teil der Mäuse im Anschluss an die Cuprizon-Gabe für eine Woche auf Normalfutter gesetzt. Innerhalb dieser Zeitspanne findet eine gut quantifizierbare Remyelinisierung statt (Wergeland et al. 2012; Matsushima und Morell 2001). Zu beachten ist allerdings, dass Beobachtungen von Gudi et al. 2009 einen Beginn der Remyelinisierung der Corpora callosa schon in der fünften Woche unter Cuprizon-Gabe zeigten.

2.1.3 Gewebeasservation

Nach Durchführung der Experimente wurden die Gehirne der p75^{NTR}-defizienten- und Wildtyp-Gruppen zeitgleich histologisch aufbereitet. Um dies tiergerecht und schonend durchzuführen, erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Narkose mittels Chloralhydrat. Erst nachdem diese zum Erlöschen sowohl der Schmerzreaktion als auch der Kornealreflexe geführt hatte, wurde die Narkose als erfolgreich angesehen.

Perfusion für die lichtmikroskopischen Präparate

Dieses Verfahren wurde durch eine Thorakotomie an den tief narkotisierten Mäusen eingeleitet, um einen Zugang zum linken Ventrikel zu erhalten. Darüber konnten die Versuchstiere mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) perfundiert werden, was über den zuvor eröffneten rechten Vorhof zu einem Herausspülen des Blutes führte. Durch die nachfolgende Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA) gelöst in PBS kam es zur Gewebefixierung. Anschließend wurden Gehirn und Wirbelsäule in 4% PFA in PBS über Nacht bei 4°C nachfixiert.

Präparation der lichtmikroskopischen Präparate

Durch Spülung des Gewebes mit PBS wurde die überschüssige Fixierlösung herausgewaschen. Nach Präparation des Gehirns wurden koronare dünne Scheiben angefertigt. Das Gewebe wurde anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (siehe Tabelle 2.2), in Xylol überführt und in Paraffin eingebettet. Ca. 1µm dünne histologische Schnitte wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt (Hiremath et al. 1998).

Perfusion für die elektronenmikroskopischen Präparate

Hierbei wurden die Tiere nach der Thorakotomie in Narkose mit einer Lösung aus 2,5% Glutaraldehyd und 4% PFA in PBS perfundiert. Anschließend wurden die Gehirne in 4%iger PFA-Lösung für einen Tag nachfixiert.

Präparation der elektronenmikroskopischen Präparate

Nach der Gewebefixierung erfolgte die Nachfixierung zum Erhalt der Myelinscheiden in 1%igem Lipid schwarz-färbenden Osmiumtetroxid für 1h bei 4°C; anschließend zweimaliges Spülen in PBS für jeweils 5Min (Mulisch und Welsch 2010 S.98).

Materialien

Material	Hersteller
Chloralhydrat 14% in NaCl;	Merck ¹
Isopropanol (50%, 70%, 90%, 100%)	Merck ¹
Glutaraldehyd 2,5% (PBS)	Merck ¹
Mikrotom	Leica ²
Osmiumtetroxid 1%	Roth ³
Paraffin	Paraplast Plus ⁴
PBS	AppliChem ⁵
PFA 4% <ul style="list-style-type: none"> • 40g PFA in 500 ml Aqua bidest. lösen, auf 60°C erhitzen • 1M NaOH bis zur Auflösung der Trübung hinzugeben • 100ml PBS zugeben • 400ml H₂O bidest. zugeben 	Merck ¹ Merck ¹ AppliChem ⁴
Xylol	Merck ¹

Tabelle 2.2: Verwendete Materialien für die Gewebeasservation.

¹ Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland² Leica, Wetzlar, Deutschland³ Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland⁴ Paraplast Plus, Tyco Healthcare GmbH, Neustadt a.d. Donau⁵ AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland**2.2 Histologische Aufarbeitung der Präparate**

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl histologische (LFB/PAS) als auch immunhistochemische (APP, CD3, Syn.) Färbungen sowie elektronenmikroskopische Methoden angewandt, um die Corpora callosa der Mäuse nach verschiedenen Gesichtspunkten zu untersuchen.

2.2.1 Histologische Färbung

Die histologische Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff-Färbung (LFB/PAS) wurde zur Myelindarstellung verwendet (Scholz 1977): sie stellt Markscheiden türkisblau dar, während die Zellkerne eine blau-violette Farbe erhalten. Polysaccharide sowie die graue Substanz des Gehirns und demyelinisierte Regionen färben sich rosa an. Für die folgenden Schritte lagen die Präparate in einer Schnittdicke von ca. 1µm auf den Objektträgern vor.

Luxol-Fast-Blue (LFB)–Färbung (Arnett et al. 2002; Mulisch und Welsch 2010 S.263-264)

- Entparaffinierung durch Abschmelzen des Paraffins von den Objektträgern im Wärmeschrank bei 58°C für 30Min. sowie durch vier aufeinanderfolgende Bäder in Xylol für jeweils 3Min.
- Inkubation in 100%igem und 90%igem Isopropanol
- Inkubation der Objektträger über Nacht in LFB-Lösung bei 60°C mit folgender Entfärbung der überschüssigen Menge an LFB auf den Schnitten durch kurzes Eintauchen in 90%igem Isopropanol
- Auswaschung von überschüssigem LFB und selektive Blaufärbung des Myelins durch Bäder in Lösung aus 0,05% Lithiumcarbonat und H₂O bidest. sowie 70%igem Isopropanol und abschließend in H₂O dest.

Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) –Färbung (Mulisch und Welsch 2010 S.227-228)

- Färbung von Glykogen und Proteoglykanen (Parenchym)
Inkubation der Schnitte für 5Min. in 1%iger Perjodsäure in H₂O bidest.
Bläuen (unter fließendem Leitungswasser) für 5Min.
Spülen mit H₂O bidest.
- Einstellen in Schiffsches-Reagenz (Reaktion mit Leitungswasser) für 20Min.
- Erneutes Spülen für 5Min. unter fließendem Leitungswasser
- Kernfärbung
Bad in Hämalun-Lösung für 2Min.
Kurzes Eintauchen in H₂O
Differenzieren in 1% HCl-Alkohol-Lösung: dreimaliges Eintauchen
Bläuen (unter fließendem Leitungswasser) für 5Min.
- Dehydrierung der Schnitte durch kurzes Eintauchen in 50%, 70%, 90%, 100% Isopropanol, 100% Isopropanol/Xylol (1:1) und Überführung in Xylol (dreimaliges Bad in Xylol für jeweils 5Min.)
- Eindeckeln in DePex.

2.2.2 Immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten

In der vorliegenden Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen gegen das Amyloid-Precursor-Protein (APP) sowie gegen den CD3-Rezeptor (CD3) und gegen das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin angefertigt. Diese beruhen auf der folgenden Vorgehensweise: Der Primärantikörper (anti-APP und anti-Synaptophysin aus der Maus; anti-CD3 aus der Ratte) bindet spezifisch über seine F_{ab}-Teile an das darzustellende Antigen. An den F_c-Teil

des Primärantikörpers bindet ein spezifischer Sekundärantikörper (Schaf-anti-Maus Antikörper für APP und Syn.; Ziege anti-Ratte für CD3), der über den F_c-Teil kovalent an Biotin -eine prosthetische Gruppe vieler Enzyme, die auch Vitamin H genannt wird-gekoppelt ist. Da Biotin eine starke Affinität zum basischen Hühnereiweiß Avidin aufweist, binden die hinzugegebenen Avidin-Peroxidase-Komplexe an die biotinylierten Sekundärantikörper. Durch die Zugabe des Substrats H₂O₂ und des Elektronendonators Diaminobenzidin (DAB) kommt es genau dort zur Oxidation von DAB, wo der primäre Antikörper spezifisch das entsprechende Antigen im Gewebe gebunden hat. Das oxidierte DAB präzipitiert, was zu einem braunen Niederschlag führt und so das zu detektierende Molekül sichtbar macht. Dieses Signal wird zum einen dadurch verstärkt, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können, und zum anderen, da ein Biotin-Molekül vier Avidin-Moleküle bindet (Mulisch und Welsch 2010 S.395).

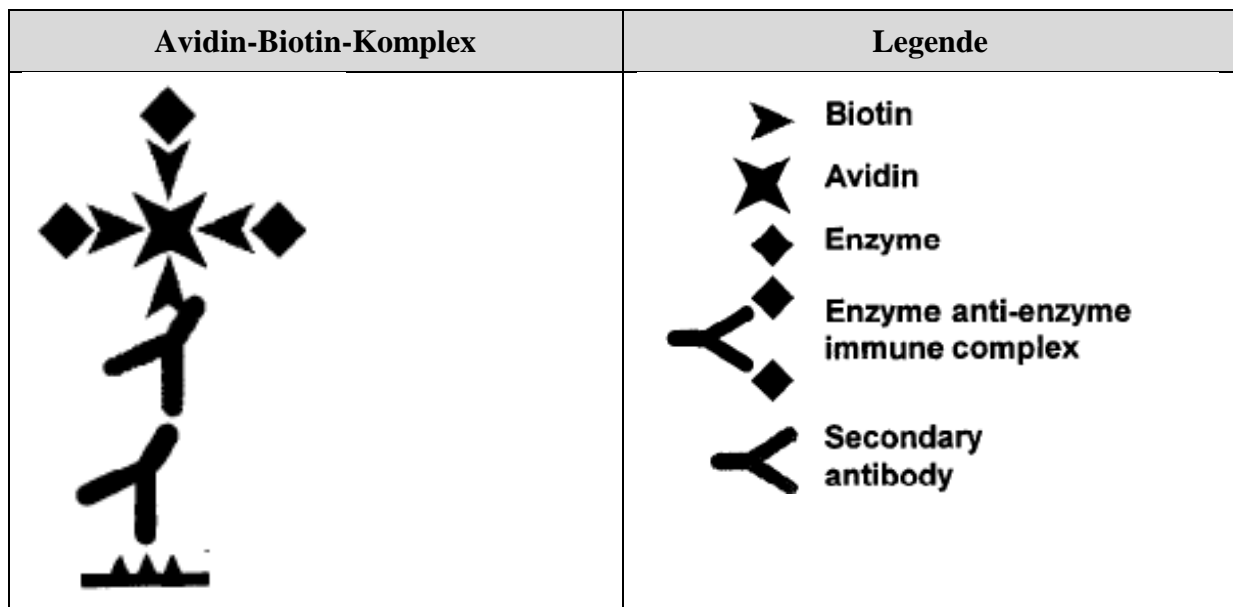


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC-Methode). Aus Burnett et al. 1997 S.84.

β-Amyloid-Precursor-Protein (Amyloidvorläuferprotein; APP)–Immunhistochemie

APP ist ein neuronales Membranprotein, das in Axonen anterograd transportiert wird. Da es sowohl prä- als auch postsynaptisch nachweisbar ist, scheint es für die regelrechte Synapsenfunktion eine essentielle Rolle zu besitzen. Physiologischerweise wird an der Synapse APP zu β-Amyloidprotein gespalten, das anschließend sezerniert wird. Bei axonaler Schädigung kommt es zu Transportstörungen und daher zu einer Akkumulation von APP im Axon. Dies ist lichtmikroskopisch an der charakteristischen Form der Sphäroide erkennbar (Gentleman et al. 1993). Antikörper gegen APP dienen als Marker früher axonaler Schäden bei MS-Patienten (Ferguson et al. 1997). Diese Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit

verwendet, um den axonalen Schaden sowohl unter Cuprizon-Gabe als auch in der Remyelinisierungsphase in Abhängigkeit von der Expression des p75^{NT}-Rezeptors beurteilen zu können.

Synaptophysin-Immunhistochemie

Synaptophysin ist ein Transmembranprotein sowohl in endokrinen Synapsen (Sudhof 1995) als auch in präsynaptischen neuronalen Vesikelmembranen (Wiedenmann und Franke 1985). Nach seiner Synthese in der Nähe des Zellkörpers wird Synaptophysin anterograd Richtung Synapse transportiert. Falls währenddessen ein axonaler Schaden auftritt, akkumuliert Synaptophysin ähnlich wie APP, und lässt sich mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen und dient somit indirekt als Marker für axonale (Transport-) Störungen. Neueste Studien zeigten, dass sich vermehrt Synaptophysin in regenerierenden Ranvierschen-Schnürringen und –Axonen befindet. Somit kann Synaptophysin evtl. auch im Rahmen von Regenerationsprozessen vermehrt nachgewiesen werden (Okajima et al. 1993; Schirmer et al. 2012).

CD3- Immunhistochemie

CD3 wird als Oberflächenrezeptor von allen von T-Zellen exprimiert (Chetty und Gatter 1994). Nach ihrer antigenspezifischen Aktivierung spielen T-Zellen eine wichtige Rolle in der Antigenbeseitigung und Steuerung der Entzündungsreaktion, daher sind sie im Rahmen von entzündlichen Infiltraten vermehrt anzutreffen (Hickey 2001).

Durch die Anwendung des anti-CD3-Antikörpers konnte spezifisch die Anzahl der eingewanderten T-Zellen im Corpus callosum unter Cuprizon-Gabe und bei intakter BHS quantifiziert werden (McMahon et al. 2002).

Durchführung (Mulisch und Welsch 2010 S.403-404)

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte (von 100%, über 90%, 70% auf 50%iges Isopropanol).
- Antigen-Demaskierung: Durch die Fixierung des Gewebes bilden manche Antigenepitope sogenannte Querverbindungen aus, die eine Bindung zwischen dem Antigen und dem ursprünglich passenden Antikörper unmöglich machen. Um diese Querverbindungen aufzubrechen, wurden die Präparate in Citratpuffer (10mM) bei pH=6.0 für 5x 3Min. in der Mikrowelle erhitzt: Nach jeweils 3Min. wurde abwechselnd mit Citratpuffer und H₂O bidest. die verdunstete Menge ersetzt. Die Abkühlung der Schnitte erfolgte für 30Min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal mit H₂O dest. und PBS gespült.

-
- Hemmung der endogenen Peroxidasen: Peroxidasen spalten enzymatisch H_2O_2 . Um falsch positive Signale zu vermeiden, wurde ein Überschuss an H_2O_2 zu den Schnitten gegeben (3% H_2O_2 in PBS bei $4^\circ C$ für 20Min.), wodurch eine Hemmung der Peroxidasen erfolgt und sich inaktive Substrat-Enzym-Komplexe ausbilden. Anschließend wurde mit PBS gespült. Bei der CD3-Immunhistochemie: zusätzliches Hinzufügen von Triton-X in den PBS-Puffer, um eine verbesserte Penetration der Ak in das Gewebe zu ermöglichen.
 - Vorinkubation der Schnitte mit 10% FCS für 20Min. bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bewirkt eine Blockierung von unspezifischen Antigenbindungsstellen.
 - Nach dem Dekantieren des FCS: Auftragen des Primär-Antikörpers; über Nacht in einer feuchten Kammer bei $4^\circ C$ inkubieren.
 - Dreimaliges Spülen mit PBS und anschließendes Auftragen des sekundären biotinylierten Antikörpers (für 60Min. bei Raumtemperatur).
 - Spülen mit PBS
 - Anschließendes Inkubieren mit Peroxidase-konjugiertem Avidin (1:1000 in 10% FCS für 60Min. in einer feuchten Kammer), das eine kovalente Bindung zu dem, am sekundären Antikörper lokalisierten, Biotin herstellt.
 - Spülen mit PBS
 - Entwicklung der Präparate in einer DAB/ H_2O_2 Lösung: Dabei wird DAB von H_2O_2 oxidiert, sodass es zur Präzipitation des chromogenen DAB kommt. Da die Peroxidase am sekundären Antikörper gebunden ist, stellt sich das gesuchte Antigen in einer bräunlichen Färbung dar. (Bei CD3-Färbung: zusätzliches Kupfersulfat-Bad mit anschließender Spülung in Aqua dest.; verstärkt die Färbung)
 - Beendigung der Reaktion durch Inkubation in PBS
 - Durchführen der Häkalaun-Gegenfärbung zur Zellkern-Detektion
 - Kurzes Spülen mit dest. H_2O
 - Einstellen in Häkalaun für 1Min.
 - Eintauchen in dest. H_2O
 - Eintauchen in Isopropanol
 - Bläuen (in Leitungswasser inkubieren) für 10Min.
 - Spülen mit dest. H_2O
 - Entwässerung der Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe
 - Xylol-Bad und anschließendes Eindeckeln.

Materialien

Material	Hersteller
Citratpuffer 10mM	Merck ¹
3-3Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) - 49ml PBS - 1ml DAB - 20µl 30% H ₂ O ₂	AppliChem ⁸ Sigma-Aldrich ² Merck ¹
DePex	Serva ³
Eosin-G Certistain	Merck ¹
Essigsäure	Merck ¹
Extravidin gekoppelt an Peroxidase	Sigma-Aldrich ²
Fetales Kälber-Serum (FCS); 10% - 1ml FCS - 9ml PBS	Biochrom ⁴ AppliChem ⁸
Isopropanol	Merck ¹
Isoxylol	Merck ¹
Kupfersulfat	Merck ¹
Lithiumcarbonat	Merck ¹
LFB-Lösung • 1g Luxol-Fast Blue in 1000ml 96% EtOH lösen • 5ml 10% Essigsäure dazugeben	BDH Laboratory Supplies ⁶ Merck ¹ Merck ¹
Mayers-Hämalaunlösung	Merck ¹
Objektträger	Menzel ⁷
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4	AppliChem ⁸
Perjodsäure	Merck ¹
Salzsäure 1M Lösung 25% in Aqua bidest	Merck ¹
Schiffsches Reagenz	Merck ¹
Triton (Octylpheonpolyethylenglycolether)	Merck ¹
Wärmeschrank	Memmert ⁹
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30% , 3%	Merck ¹
Xylol	Merck ¹

Tabelle 2.3: Verwendete Materialien für die lichtmikroskopischen Präparate.

¹ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland² Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland³ Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Tropic, Bedford USA⁴ Biochrom AG, Berlin, Deutschland⁵ BDH Laboratory Supplies; VWR International Ltd, Poole, Großbritannien⁶ Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland⁷ AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland⁸ Memmert, GmbH, Schwabach, Deutschland

Verwendete Primärantikörper

Antigen	Ursprungsspezies	Klon	Kat.- Nr.	Hersteller	Verdünnung in 10% FCS/PBS
APP	Maus	22C11	MAB 348	Millipore ¹	1:3000
CD3	Ratte	CD3-12	MCA 1477	AbD Serotec ²	1:50
Synaptophysin	Maus	SY38	M 0776	Dako ³	1:10

Tabelle 2.4: Primärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen.

¹ Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA² Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, UK³ Dako Cytomation; Glostrup, DänemarkVerwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Konjugiert mit	Kat.Nr.	Hersteller	Verdünnung in 10% FCS/PBS
Schaf-anti-Maus IgG (für APP/Syn.)	Biotin	RPN 1001	Amersham ¹	1:200
Ziege-anti-Ratte-IgG (für CD3)	Biotin	RPN 1005	Amersham ¹	1:200

Tabelle 2.5: Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen.

¹ Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland**2.2.3 Elektronenmikroskopische Präparate**

Im Anschluss an die Nachfixierung mit 4% PFA wurden die Schnitte dehydriert:

- 50% Ethanol für 10Min.
- Negativkontrastierung der Präparate mit 0,5% Uranylacetat in 70% Ethanol für 1h bei 4°C
- 80% Ethanol für 10Min.
- 96% Ethanol für 10Min.
- zweimalig 100% Ethanol für jeweils 15Min.
- zweimalig Propylenoxid für jeweils 20Min.

Darauf erfolgte das Einbetten der Präparate unter dem Abzug in:

- Araldit und Propylenoxid im Verhältnis 1:1 für 35Min.
- Araldit und Propylenoxid im Verhältnis 2:1 für 35Min.
- Araldit für 1h im Abzug
- Ausrichten der Proben quer zum Verlauf der Fasern des Corpus callosum mit Hilfe eines Stereomikroskopes.

Anschließend wurden die Präparate als Semidünnschnitte (360nm), nach Richardson gefärbt (Mulisch und Welsch 2010 S.139):

- Trocknen der Objektträger mit den Semidünnschnitten auf einer Wärmeplatte (60°C) für 60Min.
- Auftragen der Farbstofflösung nach Richardson auf die Präparate und ca. 3Min. einwirken lassen
- Farbstofflösung mit Aqua dest. abspülen und den Objektträger wieder auf der Wärmeplatte trocknen lassen.

Zum Schluss wurden aus den Harzblöcken Ultradünnschnitte (70nm) mit einer Diamantklinge angefertigt und diese mit Bleicitrat-Lösung kontrastiert.

- Na⁺-Hydroxid-Plätzchen in die geschlossene Petrischale geben
- Nach Filtration der Bleicitratlösung 1 Tropfen Bleicitrat pro Grid in die Petrischale pipettieren
- 10Minütige Inkubation der Schnitte in den Grids
- Grids in Aqua bidest. spülen und mit Filterpapier an der Unterseite trocknen.

Materialien

Material	Hersteller
Araldit	SERVA ¹
Bleicitrat-Lösung <ul style="list-style-type: none"> • 1,4g Bleicitrat in 10ml Aqua bidest. lösen • 8ml 1n NaOH sowie • 32ml Aqua bidest. dazu geben 	SERVA ¹ Merck ²
Dehydrierung 50% zu 80 % zu 96% zu 100%igem Isopropanol	Merck ²
Elektronenmikroskop	Zeiss ³
Farbstofflösung nach Richardson 2 Teile 1% Azur II 1 Teil 2% Methylenblau 1 Teil 1% Borax= Di-Natrium-Tetraborat-10- hydrat	Merck ² Merck ² Merck ²
PBS	AppliChem ⁴
Propylenoxid	SERVA ¹
Stereomikroskop	Zeiss ²
Uranylacetat	Merck ¹

Tabelle 2.6: Verwendete Materialien zur Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate.

¹ SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland² Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland³ Carl- Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland⁴ AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland**2.3 Auswertung**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse des p75^{NT}-Rezeptors auf Remyelinisierungseffizienz, axonalen Schaden sowie lymphozytäre entzündliche Infiltration während der De- und Remyelinisierung des Corpus callosum untersucht. Das Corpus callosum gilt als gut reproduzierbare Prädilektionsstelle für Cuprizon-induzierte Entmarkung (Morell et al. 1998). Für die Auswertung der vorliegenden Arbeit wurde das Corpus callosum in einen medialen und zwei laterale Teile gegliedert. Den Übergang markierten die Außengrenzen der Seitenventrikel (siehe Abbildung 2.2).

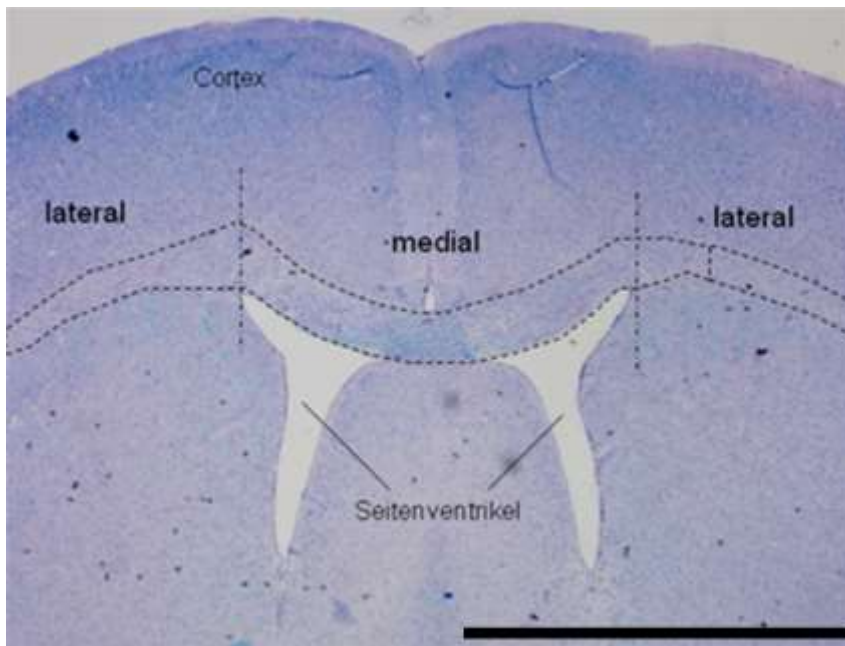


Abbildung 2.2 Anatomische Einteilung des Corpus callosum. Darstellung des medialen und der beiden lateralen Anteile des Corpus callosum in der LFB/PAS-Färbung eines frontalen Schnitts durch das Mäusegehirn. Lichtmikroskopische Aufnahme bei 20-facher Originalvergrößerung. Balkengröße 2000 μm .

2.3.1 Mikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte unter 200-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop von Olympus (Olympus BX-41; Olympus, Hamburg, Deutschland). Die bildliche Dokumentation entstand mit Hilfe einer Digitalkamera (Olympus DP-71; Olympus, Hamburg, Deutschland) und wurde durch die Bildanalyse-Software Cell-F (Cell-F; Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) sowie durch die Photoshop-Software (Adobe Photoshop; Adobe Systems GmbH München, Deutschland) vervollständigt.

Quantifizierung des Ausmaßes der Entmarkung in der LFB/PAS-Färbung

Entsprechend dem Protokoll von Hiremath et al. (1998) wurde folgende Skalierung verwendet:

- 0:** keine sichtbare Demyelinisierung im Corpus callosum; entspricht also einem unbehandelten/naiven oder voll remyelinisierten Tier
- 1:** bis 1/3 der Fläche des Corpus callosum ist demyelinisiert
- 2:** 1/3 bis 2/3 der Fläche des Corpus callosum sind demyelinisiert
- 3:** mehr als 2/3 der Fläche des Corpus callosum sind demyelinisiert

Diese Skalierung wurde bei jedem Präparat für den medialen sowie für die beiden lateralen Anteile des Corpus callosum angewandt. Die Auswertung wurde geblindet und wiederholt durchgeführt. Es wurde auch darauf geachtet, dass alle Präparate in vergleichbaren Ebenen vorlagen und ähnliche Färbeintensitäten aufwiesen.

Quantifizierung der axonalen Schädigung (APP/Synaptophysin) und der T-Zell-Infiltration (CD3)

Für die Auswertung dieser immunhistochemischen Färbungen wurde ein Zählgitter der Firma Olympus (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet. So konnte die Anzahl der APP- bzw. Syn.⁺-Axone bzw. der CD3⁺-T-Zellen pro mm² errechnet werden. Dies wurde für den medialen Teil der Corpora callosa durchgeführt. Auch hier wurde darauf geachtet, dass alle Präparate in vergleichbaren Ebenen und ähnlichen Färbeintensitäten vorlagen.

Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Cell-F-Software. Dabei wurde von jedem Tier anhand von jeweils fünf repräsentativen Schnittbildern aus dem Corpus callosum jeweils die G-ratio berechnet. Die G-ratio errechnet sich als Quotient von Axondurchmesser zu Faserdurchmesser. Der Faserdurchmesser beinhaltet den Durchmesser der Axone mit der zweifach gemessenen Myelindicke (Mason et al. 2001) (siehe Abbildung 2.3). Remyelinisierte Axone zeigen daher eine erhöhte G-ratio; vollständig entmarkte bzw. unmyelinisierte Axone haben eine G-ratio von 1.

EM-Präparat p75^{NTR} -/-

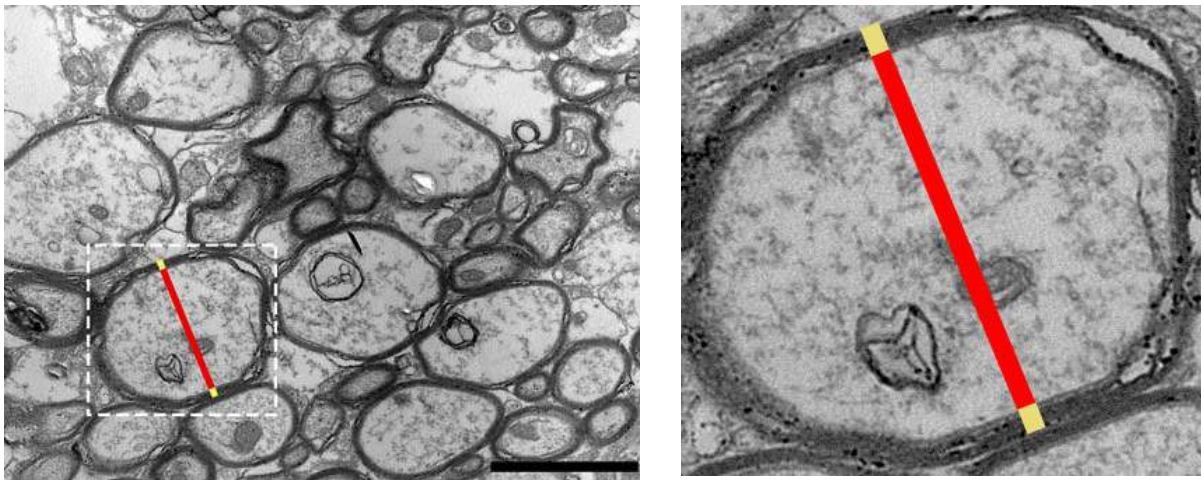


Abbildung 2.3: Vermessung der Axondurchmesser und ihrer zugehörigen Myelinscheiden in den elektronenmikroskopischen Auswertungen. Dabei stellt der rote Balken den kleinsten axonalen Durchmesser dar; die gelben Balken zeigen die Vermessung der Dicke der Myelinscheiden. Balkenlänge 2µm.

Eine veränderte G-ratio findet sich bei der De- und Remyelinisierung; höhere G-ratio-Werte sprechen für dünnere Myelinscheiden, die im Rahmen der Remyelinisierung auftreten (Lindner et al. 2008). Beim Messen der Axondurchmesser wurde jeweils der kleinste Durchmesser eines Axons sowie die Dicke der umgebenden Myelinscheiden vermessen und in eine Excel-Tabelle übertragen. Anschließend erfolgte sowohl die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen von Axondurchmesser und Myelindicken als auch die Berechnung der G-ratio.

2.3.2 Statistische Darstellung der Ergebnisse

Die mikroskopischen Ergebnisse wurden anhand von Excel-Tabellen (Microsoft Deutschland-GmbH; Unterschleißheim) festgehalten.

Die Berechnung der Signifikanz erfolgte für den Vergleich zwischen zwei Gruppen bei Werten ordinaler Skalierung (in den Färbungen APP, CD3 und Syn.) durch den ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur. Dabei handelt es sich um einen Korrekturfaktor, der angewandt wird, wenn die zu vergleichenden Gruppen unterschiedliche Varianzen haben.

Bei nominalen Werten und dem Vergleich zweier unabhängiger Gruppen, wie sie in den LFB/PAS-Färbungen vorkommen, wurde der Mann-Whitney-Test angewandt. Dieser war allerdings bei einem Versuch während der Remyelinisierung (Exp.1 lateral) nicht durchführbar, da eine Gruppe identische Werte aufwies. In diesem Fall wurde der Wilcoxon-Rank-Test verwendet. Dabei wurden p-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Beim Vergleich von drei Gruppen bzgl. der Färbungen LFB/PAS, APP, CD3 und Syn. wurde eine Varianzanalyse (*analysis of variance*; ANOVA) durchgeführt und anschließend die Bonferroni-Korrektur verwendet. Dafür wurden folgende Signifikanzniveaus verwendet:

- * für p-Werte von 0,05-0,01
- ** für p-Werte von 0,01-0,001
- *** für p-Werte kleiner als 0,001
- ns für nicht signifikante p-Werte.

Vereinfachend wird bei der Darstellung der Ergebnisse jeweils der oberste Grenzwert angegeben.

Anschließend erfolgte zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit eine Graphenerstellung mit dem Programm GraphPad PRISM 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

3 Ergebnisse

3.1 De- und Remyelinisierungseffizienz in Abwesenheit des p75^{NTR}

Die Untersuchungen, welche Rolle der p75^{NT}-Rezeptor für die Demyelinisierung und Remyelinisierung unter bzw. nach Cuprizin-Gabe spielt, erfolgten zur Validierung der Ergebnisse sowohl lichtmikroskopisch, durch die LFB/PAS-Färbung, als auch elektronenmikroskopisch.

Anhand der LFB/PAS-Färbungen wurde das Corpus callosum entsprechend der in Kapitel 2.3 erläuterten Auswertungsskala nach Hiremath et al. (1998) mit den Ziffern 0 bis 3 mikroskopisch beurteilt. Dabei wurde 0 für vollständig erhaltenes Myelin und 3 für eine Demyelinisierung des Corpus callosum von mehr als 2/3 seiner Fläche vergeben. Die Zuordnung der Werte erfolgte durch wiederholtes visuell-vergleichendes Abschätzen.

3.1.1 Ausmaß der Demyelinisierung

Durch die sechswöchige Cuprizin-Gabe wurde eine Demyelinisierung hauptsächlich der Corpora callosa bei den Mäusen induziert. Die Auswertung zeigte in zwei von drei Versuchen vergleichbare Entmarkungen bei den p75^{NTR}-knockout-Mäusen und den Wildtyp-Tieren (wt-Tieren) und dies sowohl für den medialen als auch für den lateralen Teil des Corpus callosum. Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die erzielten Ergebnisse (siehe Tabelle 3.1).

Exp. 1	medial [MW+/-SD]	p medial	lateral [MW+/-SD]	p lateral
p75 ^{NTR} -/-	2,3 ± 0,9	1,000	2,8 ± 0,5	0,587
wt	2,3 ± 1,0		2,9 ± 0,4	

Exp. 3	medial [MW+/-SD]	p medial	lateral [MW+/-SD]	p lateral
p75 ^{NTR} -/-	2,9 ± 0,4	1,000	2,6 ± 0,4	0,285
wt	2,8 ± 0,4		2,8 ± 0,4	

Tabelle 3.1: Semiquantitative Analyse der LFB/PAS-Färbungen zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp. 1 und 3 [MW+/-SD]. Die medialen und lateralen Anteile der Corpora callosa von p75^{NTR} -/- und wt-Mäusen zeigen vergleichbare Demyelinisierungsgrade (Mann-Whitney-Test). Auswertung nach Hiremath et al. 1998.

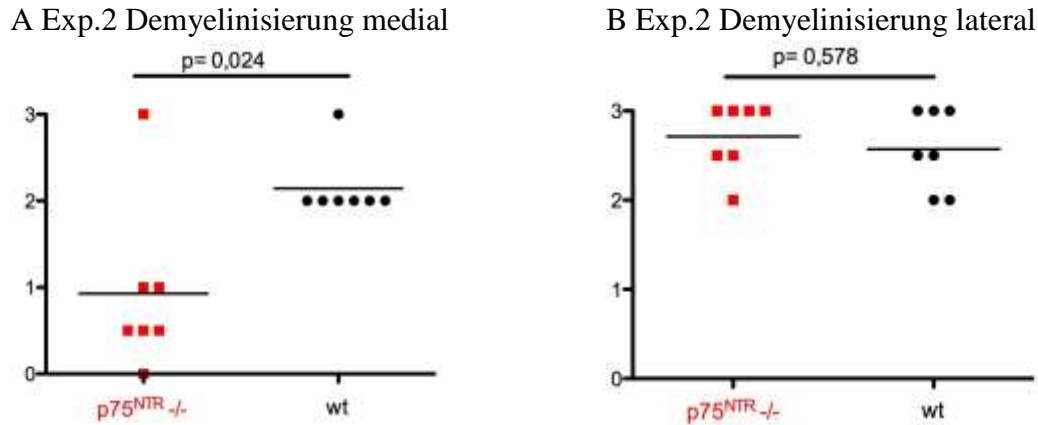
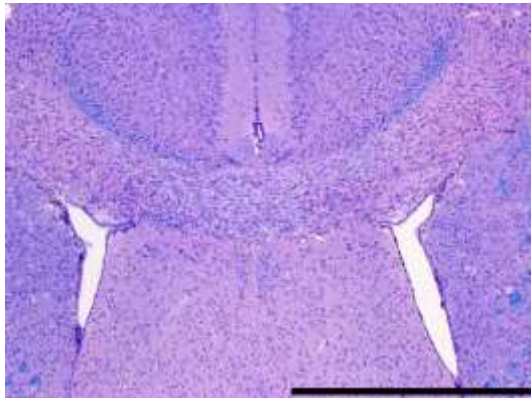
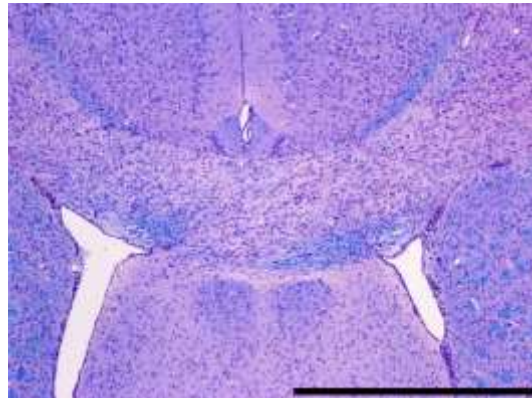


Abbildung 3.2: Semiquantitative Auswertung des Demyelinisierungsgrades zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.2. Dabei wird eine signifikant geringer ausgeprägte Demyelinisierung ($p=0,024$) im medialen Corpus callosum der $p75^{NTR-/-}$ -Tiere ($0,9 \pm 1$ [MW \pm SD]) im Vergleich zu den wt-Tieren ($2,1 \pm 0,4$) sichtbar. Im lateralen Teil des Corpus callosum konnten keine signifikanten Unterschiede ($p=0,578$) zwischen den beiden Gruppen fest-gestellt werden ($p75^{NTR-/-}$: $2,7 \pm 0,4$; wt: $2,6 \pm 0,4$; Mann-Whitney-Test). Skala der y-Achse von 0-3 nach Hiremath et al. 1998.

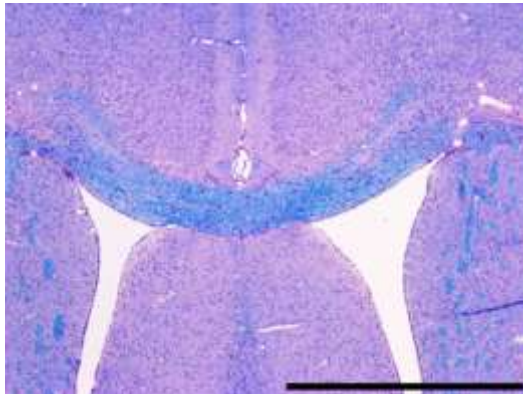
A Exp.1 $p75^{NTR-/-}$



B Exp.1 wt



C Exp. 2 $p75^{NTR-/-}$



D Exp.2 wt

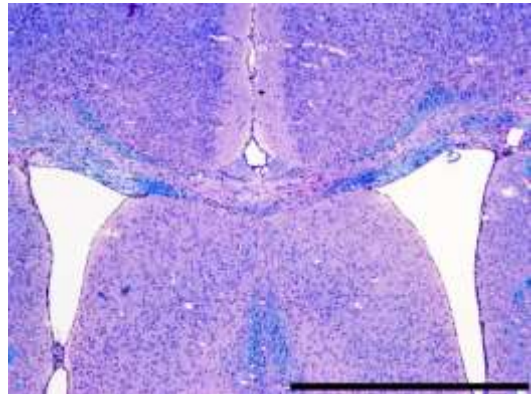


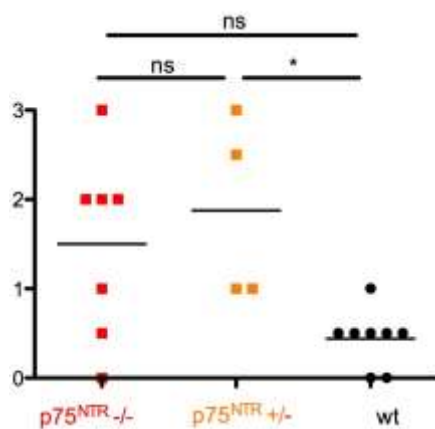
Abbildung 3.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen der medialen Corpora callosa in der LFB/PAS-Färbung zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 2. Das Exp.1 (A, B) zeigte wie auch das Exp.3 keinen signifikanten Unterschied in der Entmarkung zwischen den $p75^{NTR-/-}$ -Tieren (A) und den wt-Tieren (B). Im Exp.2 hingegen wiesen die $p75^{NTR-/-}$ Mäuse medial eine deutlich geringer ausgeprägte Demyelinisierung (C) im Vergleich zu den wt-Tieren auf (D) ($p=0,024$; Mann-Whitney-Test); 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 1000 μ m.

3.1.2 Ausmaß der Remyelinisierung

Nach Cuprizon-Gabe über sechs Wochen wurden die Tiere anschließend für eine Woche auf Normalfutter gesetzt, sodass die Remyelinisierung einsetzen konnte. Dieses Vorgehen wurde bei vier Experimentreihen angewandt.

Ein Experiment zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den heterozygoten $p75^{\text{NTR}}$ -Tieren und den Wildtyp-Tieren sowohl im medialen als auch im lateralen Teil des Corpus callosum. Hier wiesen die heterozygoten $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten Mäuse eine schlechtere Remyelinisierungskapazität im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren auf ($p75^{\text{NTR}}^{-/-}$ medial: $1,5 \pm 1,0$ [MW \pm -SD]; $p75^{\text{NTR}}$ +/- medial: $1,9 \pm 1,0$; wt medial: $0,4 \pm 0,3$; p medial < 0,050 ANOVA; $p75^{\text{NTR}}^{-/-}$ lateral: $2,1 \pm 0,7$; $p75^{\text{NTR}}$ +/- lateral: $2,2 \pm 0,4$; wt lateral: 1 ± 0 ; p lateral < 0,001). Zusätzlich konnte auch ein signifikanter Unterschied zwischen den homozygoten $p75^{\text{NTR}}$ -knockout-Mäusen und den Wildtyp-Tieren im lateralen Teil des Corpus callosum festgestellt werden (p lateral < 0,001). Im medialen Teil des Corpus callosum zeigte der ungepaarte t-Test mit Welch-Korrektur zwischen den $p75^{\text{NTR}}^{-/-}$ und den wt-Tieren einen signifikanten Unterschied ($p = 0,046$).

A Exp.2 Remyelinisierung medial



B Exp.2 Remyelinisierung lateral

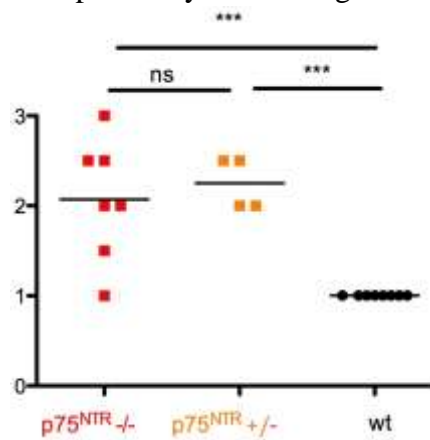


Abbildung 3.4 Semiquantitative Auswertung des Remyelinisierungsausmaßes zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2. Die Grafik veranschaulicht, dass bei den Wildtyp-Tieren ein stark remyelinisiertes Corpus callosum anzutreffen war, wohingegen dieser Wiederaufbau der Myelinschichten bei den Mäusen ohne den $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor deutlich eingeschränkt war ($p75^{\text{NTR}}^{-/-}$ vs. wt; $p < 0,001$ laterales Corpus callosum). Die für den $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor heterozygoten Tiere zeigten im medialen- und lateralen Teil des Corpus callosum einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ($p75^{\text{NTR}}$ +/- vs. wt: p medial < 0,05; p lateral < 0,001 ANOVA). Skala der y-Achse von 0-3 nach Hiremath et al. 1998.

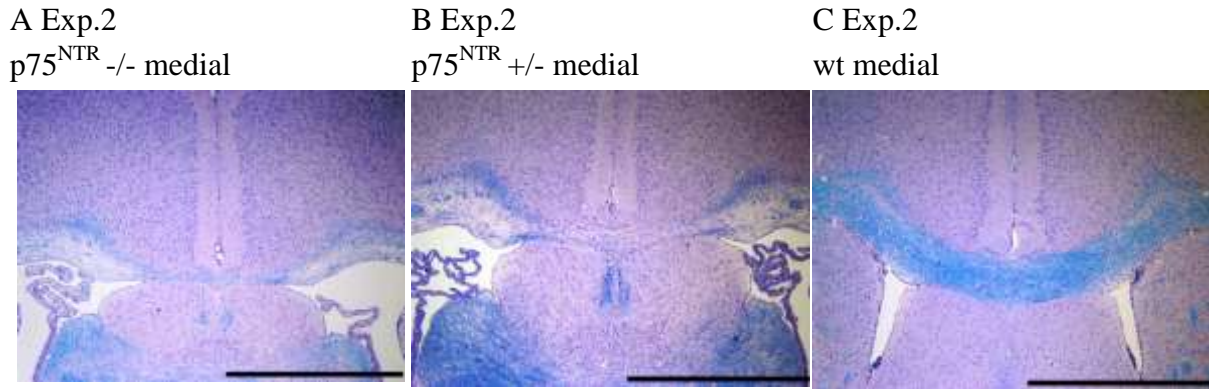


Abbildung 3.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen in der LFB/PAS-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2. Bei 50%igem Fehlen des $p75^{NTR}$ -Rezeptors kam es zu einer wesentlich schwächer ausgeprägten Remyelinisierung (B) als bei der Vergleichsgruppe der wt-Tiere (C) nach siebentägiger Cuprizin-Pause. 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 1000 μ m.

Von den insgesamt vier Versuchen wurde in einem weiteren Experiment (Exp.4) kein signifikanter Unterschied im medialen Teil zwischen den $p75^{NTR}$ -knockout- und wt-Tieren festgestellt ($p=0,939$; Mann-Whitney-Test). Insgesamt ergaben sich dort ähnliche Werte sowohl für die $p75^{NTR}$ -knockout-Tiere ($p75^{NTR} -/-$ medial: $2,2 \pm 0,8$ [MW+/-SD]) als auch für die Wildtypen (wt medial: $2,1 \pm 1,2$).

Der laterale Teil zeigte jedoch auch im Exp.4 eine Signifikanz auf (p lateral= $0,012$; Mann-Whitney-Test; siehe Abbildung 3.6). Hier wiesen die $p75^{NTR}$ -knockout-Tiere deutlich weniger Remyelinisierung als die Wildtypen auf ($p75^{NTR} -/-$ lateral: $2,6 \pm 0,5$; wt lateral: $1,6 \pm 0,5$).

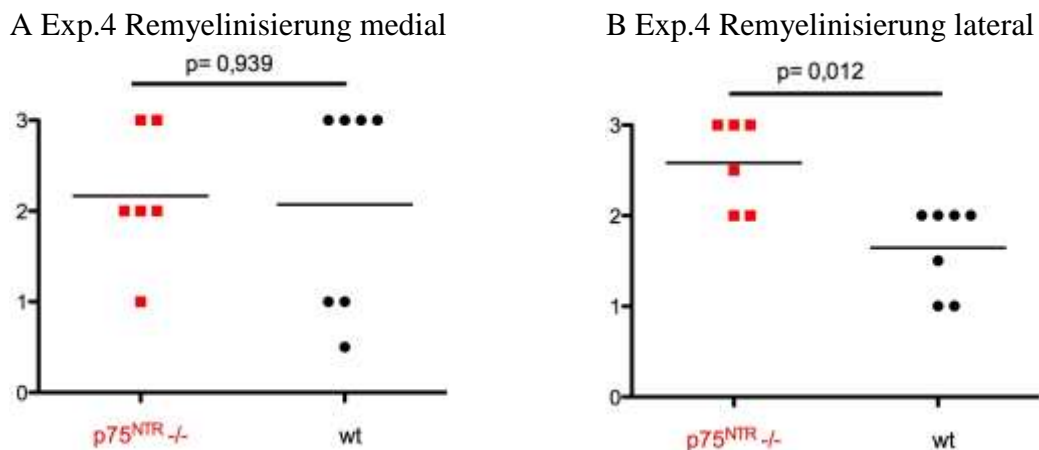
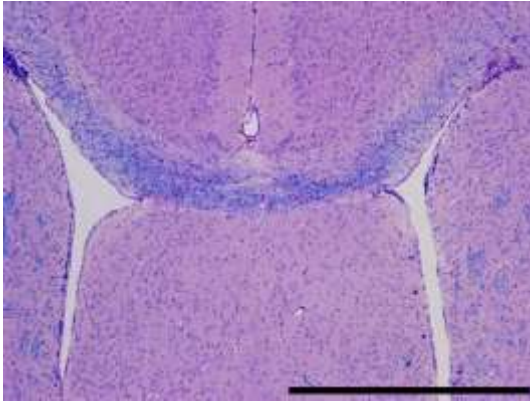


Abbildung 3.6: Semiquantitative Auswertung des Remyelinisierungsmaßes zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.4. In den medialen Anteilen der Corpora callosa wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den $p75^{NTR}$ -knockout-Tieren und den Wildtypen festgestellt ($p=0,939$). Im lateralen Teil kam es bei Mäusen ohne den $p75^{NTR}$ allerdings zu einer wesentlich schlechteren Remyelinisierung ($p=0,012$ Mann-Whitney-Test). Skala der y-Achse von 0-3 nach Hiremath et al. 1998.

A Exp.4 p75^{NTR} -/- medial

B Exp.4 wt medial

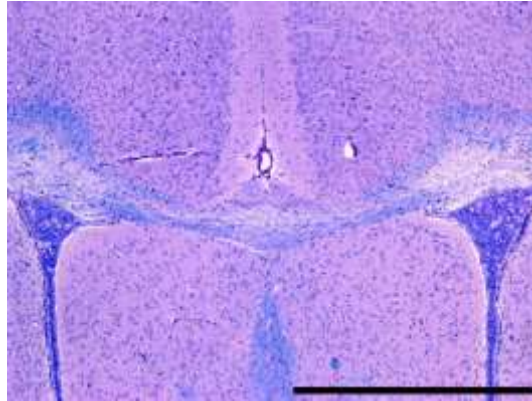
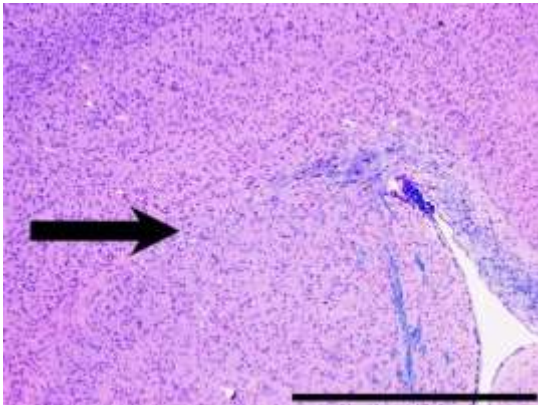


Abbildung 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der medialen Corpora callosa in der LFB-PAS-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.4. Hierbei lassen sich bei 40-facher Originalvergrößerung ähnliche Remyelinisierungsausmaße ($p=0,939$ Mann-Whitney-Test) nach einwöchiger Cuprizin-Pause erkennen, jeweils für die medialen Anteile der Corpora callosa der p75^{NTR}-knockout-Mäuse (A) im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen (B). Balkengröße 1000 μ m.

A Exp.4 p75^{NTR} -/- lateral

B Exp.4 wt lateral

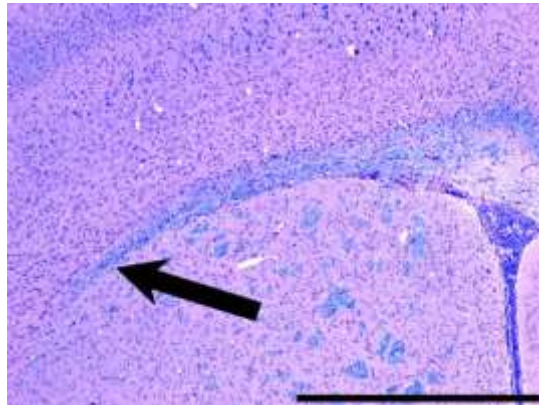
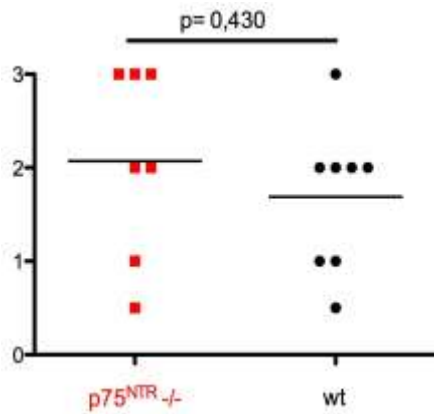


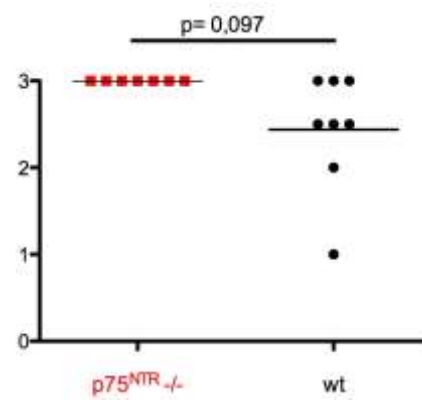
Abbildung 3.8: Lichtmikroskopische Aufnahmen der lateralen Corpora callosa in der LFB/PAS-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.4. (A) veranschaulicht, dass es bei Abwesenheit des p75^{NTR} im lateralen Teil des Corpus callosum (siehe Pfeil) zu einer geringeren Remyelinisierung kommt als bei dessen regelrechter Expression (B). 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 1000 μ m.

Zwei Versuchsreihen wiesen sogar durchgängig keine signifikanten Unterschiede sowohl im medialen ($p_{\text{medial}}=0,430$ für Exp.1 bzw. $0,288$ für Exp.3) als auch im lateralen Corpus callosum-Anteil auf ($p_{\text{lateral}}=0,097$ für Exp.1; Mann-Whitney-Test bzw. $0,431$ für Exp.3; Wilcoxon-Rank-Test). Allerdings zeigte Exp.1 im lateralen Corpus callosum eine tendenziell schlechtere Remyelinisierung bei den p75^{NTR}-knockout-Tieren.

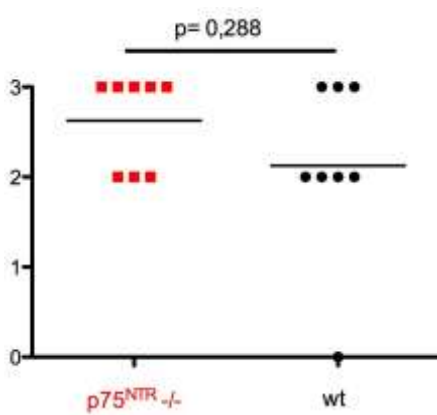
A Exp.1 Remyelinisierung medial



B Exp.1 Remyelinisierung lateral



C Exp.3 Remyelinisierung medial



D Exp.3 Remyelinisierung lateral

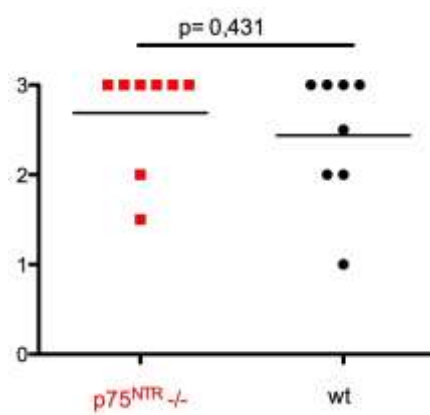
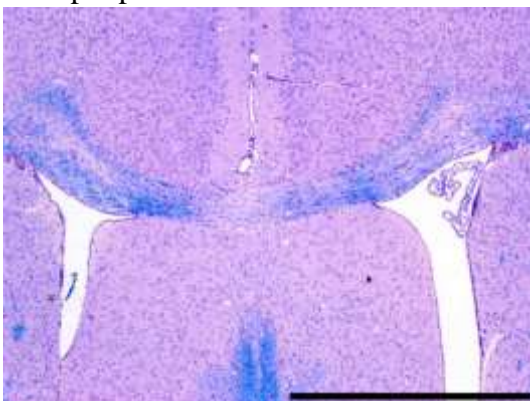


Abbildung 3.9: Semiquantitative Auswertung des Remyelinisierungsmaßes zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 3. Nicht signifikante Unterschiede während der Remyelinisierung medial ($p=0,430$ für Exp.1 bzw. $0,288$ für Exp.3) und lateral ($p=0,097$ für Exp.1 Mann-Whitney-Test bzw. $0,431$ für Exp.3; Wilcoxon-Rank-Test) im Corpus callosum bei An- und Abwesenheit des $p75^{NTR}$. Skala der y-Achse von 0-3 nach Hiremath et al. 1998.

A Exp.1 $p75^{NTR} -/-$ medial

B Exp.1 wt medial

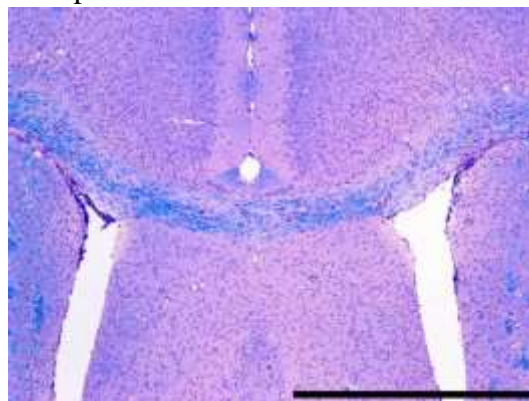


Abbildung 3.10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der medialen Corpora callosa in der LFB-PAS-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.1. Ähnliche Remyelinisierungsgrade im medialen Balkenabschnitt unabhängig von der Expression des $p75^{NT}$ -Rezeptors (A: $p75^{NTR} -/-$; B: Wildtyp-Tier) nach Absetzen des Cuprizon-versetzten Futters für eine Woche. 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße $100\mu\text{m}$.

Zusammenfassend zeigt die Analyse der LFB/PAS-Färbung, dass es ohne den p75^{NT}-Rezeptor tendenziell zu einer schlechteren Remyelinisierung kommt: in einem Experiment sowohl medial als auch lateral (Exp.2), in einem Experiment hingegen nur lateral (Exp.4). Die Exp.1 und 3 wiesen sowohl medial als auch lateral keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen auf. Allerdings ließ sich ein tendenzieller Unterschied in den lateralen Anteilen der Corpora callosa in Exp. 1 feststellen.

3.2 Elektronenmikroskopische Analyse in p75^{NTR} -/- Mäusen

Analog zur lichtmikroskopischen LFB/PAS-Färbung wurden die Mäuse für die Elektronenmikroskopie ebenfalls nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe (für die Analyse der Demyelinisierung) und nach einwöchiger Cuprizin-freier Diät (zur Quantifizierung der Remyelinisierung) perfundiert. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich zwischen beiden Genotypen (p75^{NTR}-knockout-Tiere und wt-Tiere) unter Cuprizin-Gabe mit Kontroll-Tieren der jeweiligen Gruppe, die kein Cuprizin erhalten hatten.

Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Auswertung wurde die G-ratio berechnet. Die G-ratio ist definiert als Quotient von Axondurchmesser zu Faserdurchmesser. Dieser setzt sich aus dem Durchmesser der myelinisierten Axone zusammen bzw. aus der Summe von Axondurchmesser und der zweifachen Myelindicke (Mason et al. 2001). Eine veränderte G-ratio ist indikativ für Vorgänge der De- und Remyelinisierung; insbesondere spricht eine höhere G-ratio für dünnere Myelinscheiden, die im Rahmen der Remyelinisierung beobachtet werden (Lindner et al. 2008; Bradl und Lassmann 2010).

Pro Tier wurden jeweils fünf Präparate aus der gleichen anatomischen Region des Corpus callosum ausgewertet: Dabei wurden pro Axon jeweils der kleinste Axondurchmesser und die umgebenden Dicken der Myelinscheiden mit der Cell-F-Software vermessen. Die G-ratio wurde anhand dieser gewonnenen Daten mit Hilfe von Excel berechnet.

3.2.1 Analyse zum Demyelinisierungszeitpunkt

Die elektronenmikroskopische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Axondurchmesser und der Myelindicken zwischen den Gruppen der wt- und der p75^{NTR} -/- Tiere während der Demyelinisierung unter Cuprizin-Gabe. Da in der vorliegenden Arbeit sowohl myelinisierte als auch nicht-myelinisierte Axone vermessen wurden, entspricht das Ausmaß der demyelinisierten Fasern in den p75^{NTR} -/- Mäusen dem der Wildtypen, was ich schon in der LFB/PAS-Färbung zeigen konnte (Vgl. 3.1). Auch zeigen meine Daten, dass sich die G-ratios der p75^{NTR}-knockout-Tiere nicht wesentlich von denen der Wildtypen unterscheiden (G-ratio p= 0,364; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur; p75^{NTR} -/-: $0,879 \pm 0,021$ [MW \pm SD]) bzw. wt: $0,904 \pm 0,053$).

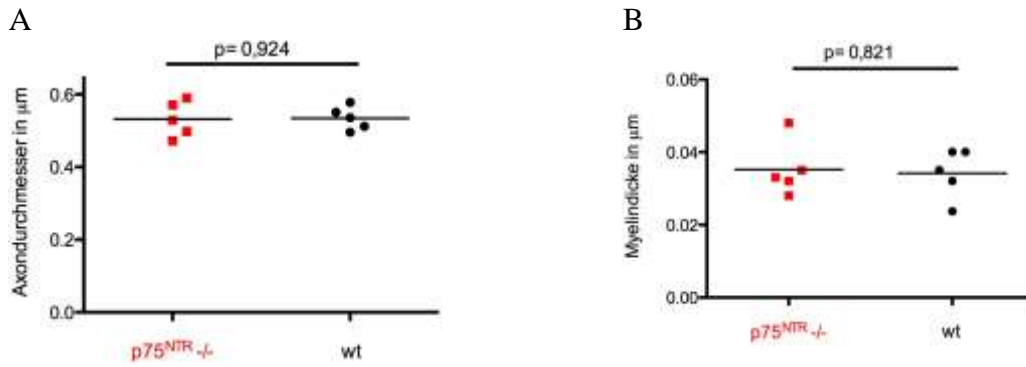
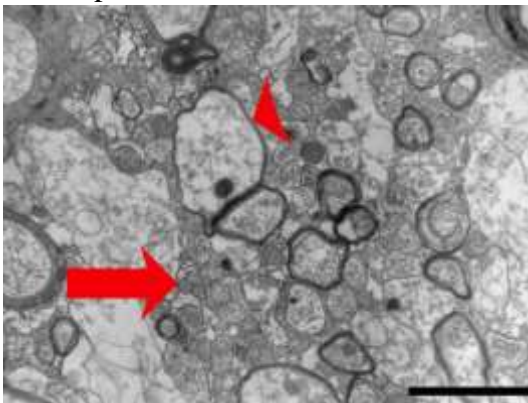


Abbildung 3.11: Vergleich der Axondurchmesser und Myelindicken zwischen den $p75^{NTR-/-}$ -Tieren und den wt-Tieren zum Demyelinisierungszeitpunkt. Dabei ergaben sich ähnliche Werte für Axondurchmesser (A; $p75^{NTR-/-}$: $0,530 \pm 0,230\mu\text{m}$ [MW \pm -SD]; wt: $0,530 \pm 0,250\mu\text{m}$) und Myelindicken (B; $p75^{NTR-/-}$: $0,040 \pm 0,020\mu\text{m}$; wt: $0,030 \pm 0,020\mu\text{m}$) für die $p75^{NTR}$ -knockout-Tiere und die Wildtypen in der elektronenmikroskopischen Auswertung unter Cuprizin-Gabe.

A DM $p75^{NTR-/-}$



B DM wt

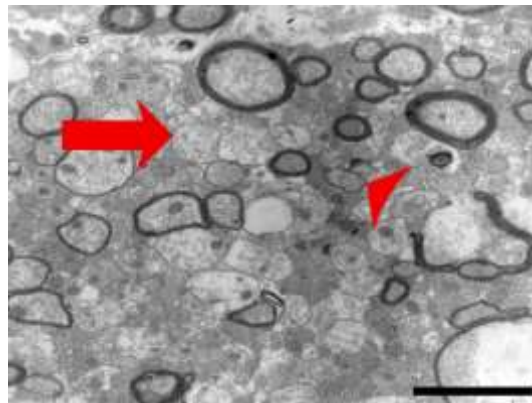


Abbildung 3.12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen je eines $p75^{NTR-/-}$ und wt-Tieres zum Demyelinisierungszeitpunkt. Die Myelinscheiden waren bei beiden Tieren ($p75^{NTR-/-}$ -Tier (A) sowie wt-Tier (B)) größtenteils nicht mehr vorhanden (Pfeil) bzw. waren trotz anhaltender Cuprizin-Gabe schon wieder sehr dünn remyelinisiert (Pfeilkopf). Balkengröße $2\mu\text{m}$.

Sowohl axonale Durchmesser als auch die Dicken der Myelinscheiden von unbehandelten Kontroll-Tieren zeigten im Vergleich zu wt-Tieren bzw. den $p75^{NTR}$ -knockout-Tieren nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe keine signifikanten Unterschiede. Allerdings lassen sich sowohl visuelle als auch zahlenmäßig tendenzielle Unterschiede erkennen ($p=0,082$ für G-ratio naive Kontrolle wt vs. DM wt bzw. $p=0,061$ für G-ratio naive Kontrolle $p75^{NTR-/-}$ vs. DM $p75^{NTR-/-}$; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur). Die trotz andauernder Cuprizin-Gabe nachweisbaren Myelinscheiden können, wie von Mason et al. 2001 beschrieben, im Rahmen der Remyelinisierung, die schon unter Cuprizin-Gabe beginnt, entstanden sein.

Beim Vergleich von unbehandelten $p75^{NTR}$ Kontroll-Tieren mit unbehandelten wt Kontroll-Tieren konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der G-ratio festgestellt werden ($p= 0,309$; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur; ohne graphische Darstellung, siehe Tabelle 3.2).

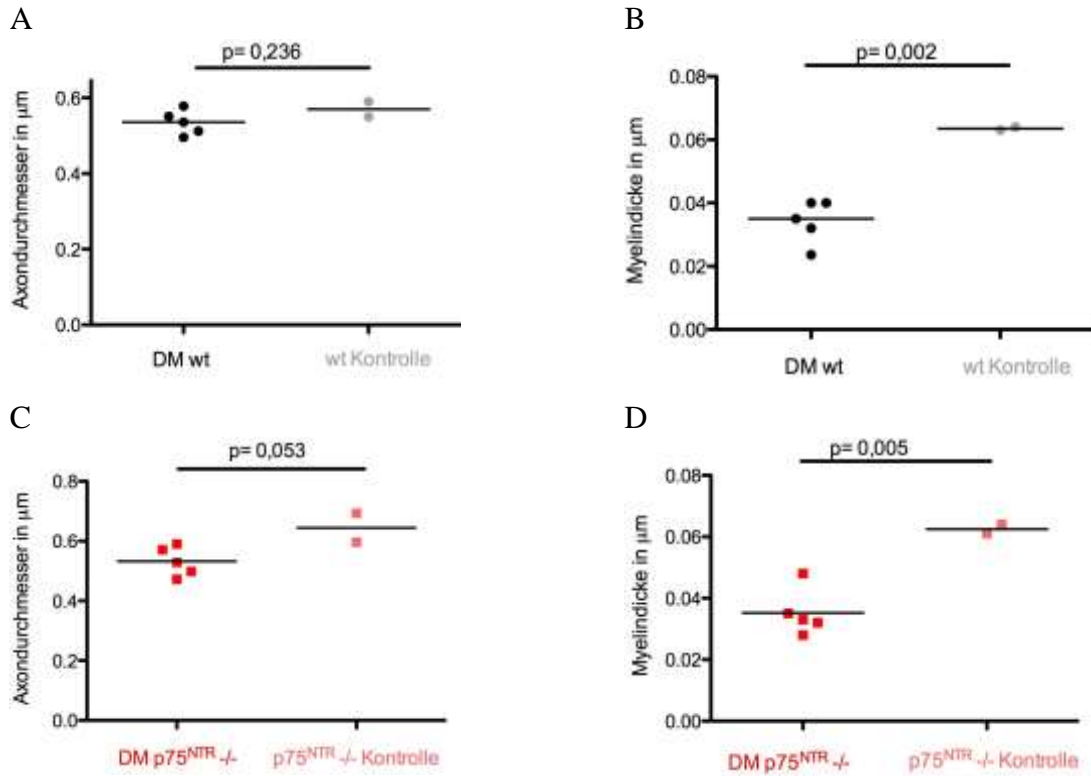
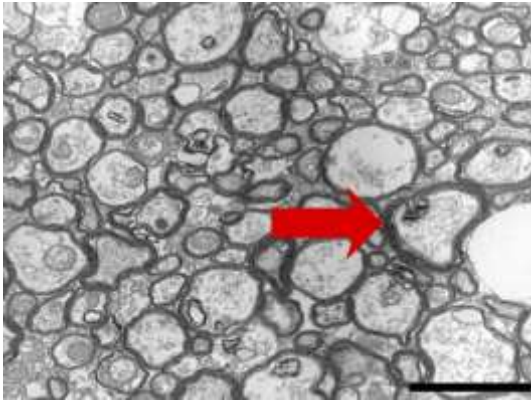


Abbildung 3.13 Vergleich der Axondurchmesser und Myelindicken zwischen den $p75^{NTR}$ -knockout-Tieren und den Wildtyp-Tieren unter Cuprizon-Gabe mit unbehandelten Kontroll-Tieren zum Demyelinisierungszeitpunkt. Dabei wurden jeweils signifikante Unterschiede zwischen den Cuprizon-gefütterten Tieren und unbehandelten Kontrollen bei der Dicke der Myelinscheiden sichtbar ($p=0,002$ für DM wt vs. wt Kontrolle bzw. $p=0,005$ für DM $p75^{NTR-/-}$ vs. $p75^{NTR-/-}$ Kontrolle).

A unbehandelte Kontrolle wt



B DM wt

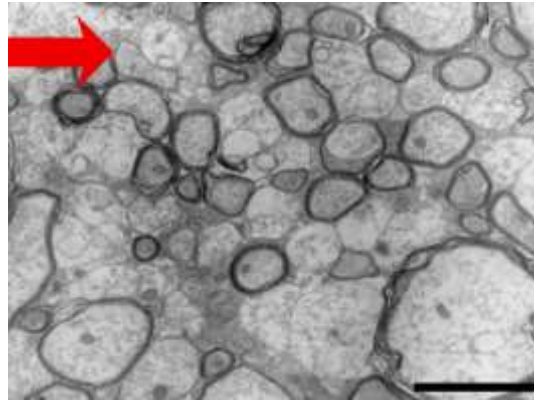
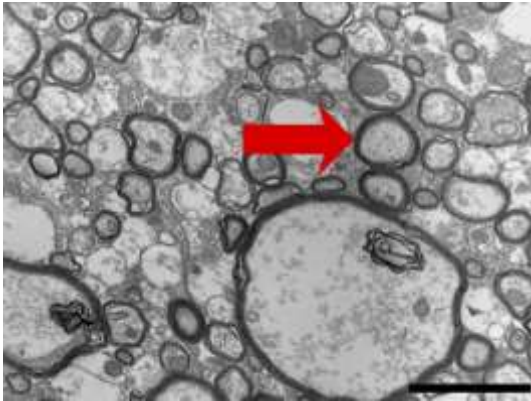
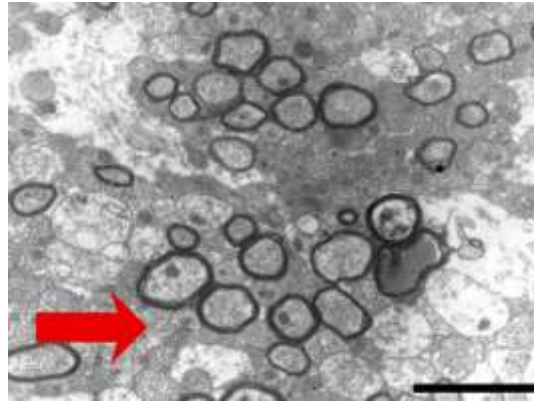
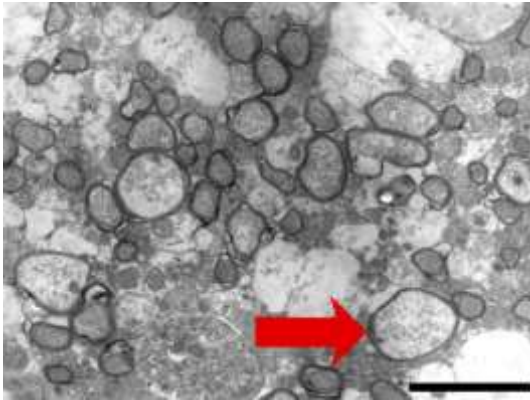
C unbehandelte Kontrolle p75^{NTR}^{-/-}D DM p75^{NTR}^{-/-}

Abbildung 3.14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen je eines unbehandelten Kontroll-Tieres der p75^{NTR}^{-/-} und wt-Gruppe und ihrer Cuprizon-behandelten Vergleichsgruppe zum Demyelinisierungszeitpunkt. Sichtbare Demyelinisierung (Pfeile in B und D zeigen auf entmarkte Axone) im Vergleich zu den naiven Kontroll-Tieren (Pfeile in A und C zeigen myelinisierte Axone). Die quantitative Analyse ließ jedoch nur eine Tendenz erkennen ($p=0,082$ für G-ratio Kontrolle wt vs. DM wt; Bild A und B; bzw. $p=0,061$ für G-ratio Kontrolle p75^{NTR}^{-/-} vs. DM p75^{NTR}^{-/-}; Bild C und D). Auch sichtbar sind die kleineren axonalen Durchmesser nach Cuprizon-Gabe sowohl bei dem p75^{NTR}^{-/-} Tieren (D; $0,530 \pm 0,230\mu\text{m}$ [MW \pm -SD]) als auch bei den wt-Tieren (B; $0,530 \pm 0,250\mu\text{m}$) im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (A; $0,570 \pm 0,280\mu\text{m}$ und C; $0,644 \pm 0,358\mu\text{m}$). Balkengröße $2\mu\text{m}$.

3.2.2 Analyse zum Remyelinisierungszeitpunkt

Der Vergleich bezüglich der G-ratios in der Remyelinisierungsphase zwischen den Wildtypen und den p75^{NTR}-knockout-Tieren ergab keinen signifikanten Unterschied (RM wt vs. RM p75^{NTR}^{-/-}: $p=0,506$; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) zwischen den Axondurchmessern und Myelindicken. Somit konnten die von mir gewonnenen Ergebnisse der lichtmikroskopischen LFB/PAS-Färbung hinsichtlich einer schlechteren Remyelinisierung bei Mäusen ohne p75^{NT}-Rezeptor elektronenmikroskopisch nicht ohne weiteres bestätigt werden.

A $p75^{NTR-/-}$ 

B wt

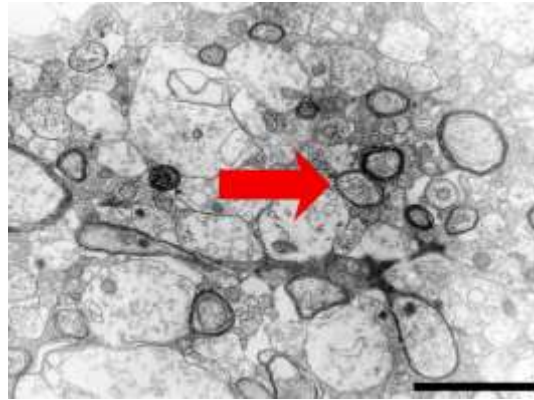
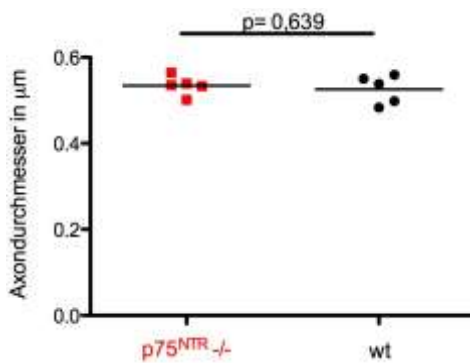


Abbildung 3.15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen je eines $p75^{NTR-/-}$ und wt-Tieres zum Remyelinisierungszeitpunkt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,506$; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) hinsichtlich der G-ratios zwischen den $p75^{NTR-/-}$ Tieren (A) und den Wildtypen (B). Die Pfeile in (A) und (B) deuten auf die neugebildeten Myelinfasern nach der Remyelinisierungsphase. Balkengröße $2\mu\text{m}$.

A



B

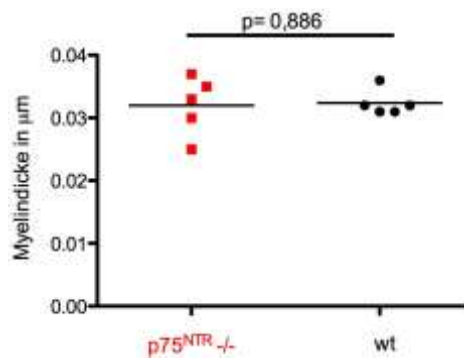
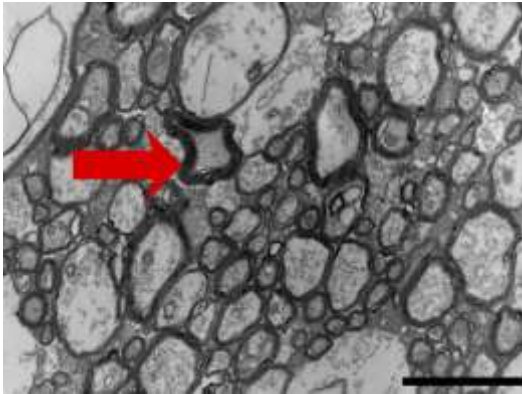
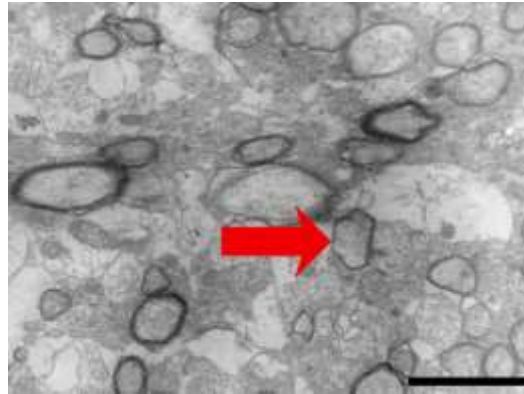
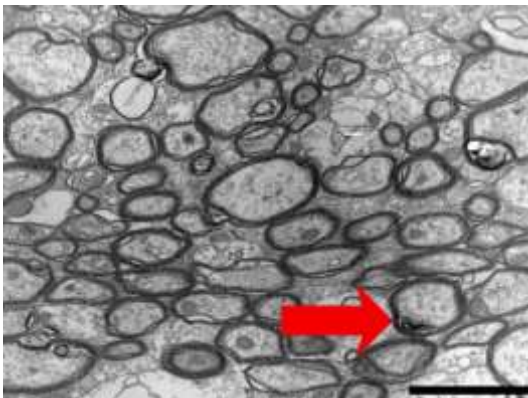


Abbildung 3.16: Vergleich der Axondurchmesser und Myelindicken zwischen den $p75^{NTR-/-}$ und wt-Tieren zum Remyelinisierungszeitpunkt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Axondurchmessers (A) bei den $p75^{NTR-/-}$ -knockout-Tieren ($0,530 \pm 0,250\mu\text{m}$ [MW \pm SD]) im Vergleich zu den wt-Tieren ($0,530 \pm 0,240\mu\text{m}$) feststellen. Auch für die Myelindicke (B) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den $p75^{NTR-/-}$ -knockout-Tieren ($0,030 \pm 0,020\mu\text{m}$) und den wt-Tieren ($0,030 \pm 0,020\mu\text{m}$).

Beim Vergleich zwischen den Wildtypen ohne Cuprizin-Gabe (sog. Kontrollgruppe) und den Wildtypen nach Cuprizin-Gabe zeigten sich jedoch wie erwartet signifikante Unterschiede (Kontrolle wt vs. RM wt: $p=0,0001$). Diese stellte ich ebenso für die $p75^{NTR-/-}$ -knockout-Tiere ohne Cuprizin-Gabe (sog. Kontrollgruppe) und die $p75^{NTR-/-}$ -knockout-Tieren nach Cuprizin-Gabe fest (Kontrollgruppe $p75^{NTR-/-}$ vs. RM $p75^{NTR-/-}$: $p=0,003$ ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur).

A Unbehandelte Kontrolle p75^{NTR}-/-B p75^{NTR} -/-

C Unbehandelte Kontrolle wt



D wt

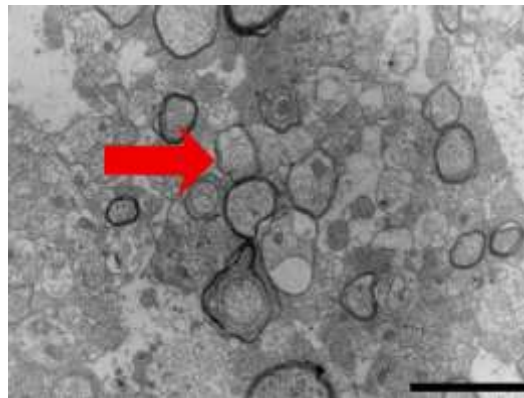


Abbildung 3.17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen je eines Kontroll-Tieres und je eines Cuprizon-gefütterten Tieres der p75^{NTR} -/- und wt-Gruppe zum Remyelinisierungszeitpunkt. Im Vergleich zu den Kontroll-Tieren, die mit Normalfutter ernährt wurden (A und C), lassen sich bei den Cuprizon-gefütterten Mäusen sowohl für die p75^{NTR}-knockout-Mäuse (B) als auch für die Wildtyp-Mäuse (D) dünnere Myelinscheiden sowie kleinere Axondurchmesser erkennen. Die Pfeile weisen auf den signifikanten Unterschied zwischen Myelindicke und Axondurchmesser zwischen Kontroll-Tieren und Cuprizon-gefütterten Tiere in der Remyelinisierungsphase hin. Balkengröße 2µm.

	Axondurchmesser in μm [MW+/-SD]	Myelindicken in μm [MW+/-SD]	G-ratio [MW+/-SD]
Naive Kontrollen			
p75^{NTR}-/-	0,644 \pm 0,358	0,062 \pm 0,029	0,836 \pm 0,020
Wildtypen	0,570 \pm 0,280	0,063 \pm 0,023	0,816 \pm 0,010
Demyelinisierung			
p75^{NTR} -/-	0,530 \pm 0,230	0,040 \pm 0,020	0,880 \pm 0,022
Wildtypen	0,530 \pm 0,250	0,030 \pm 0,020	0,900 \pm 0,054
Remyelinisierung			
p75^{NTR} -/-	0,530 \pm 0,250	0,030 \pm 0,020	0,890* \pm 0,011
Wildtypen	0,530 \pm 0,240	0,030 \pm 0,020	0,890* \pm 0,010

Tabelle 3.2: Axondurchmesser und Myelindicken der verschiedenen Gruppen im Vergleich [MW+/-SD]. Die G-ratio wurde als Quotient aus Axondurchmesser zu Faserdurchmesser (= Summe aus Axondurchmesser und der zweifachen Myelindicke) berechnet. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den p75^{NTR}-knockout-Mäusen und den Wildtypen während der De- und Remyelinisierung festgestellt. * Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den p75^{NTR}-knockout-Mäusen während der Remyelinisierung im Vergleich zu ihrer unbehandelten Kontrollgruppe (p= 0,003) als auch zwischen den wt-Mäusen während der Remyelinisierung und ihrer unbehandelten Kontrollgruppe (p=0,0001; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur). Auch wird in der Tabelle ersichtlich, dass die naiven p75^{NTR}-knockout-Kontroll-Tiere im ZNS vergleichbare Axon- und Myelindicken zu den Wildtypen aufwiesen. Angaben in μm .

3.3 Axonale Schädigung bei p75^{NTR}-defizienten-Mäusen im Cuprizin-Modell

Durch die Anwendung immunhistochemischer Verfahren konnten axonales APP sowie Synaptophysin, die im Rahmen einer axonalen Transportstörung bzw. Schädigung akkumulieren, sichtbar gemacht werden. Ich verglich hierbei Mäuse ohne den p75^{NTR}-Rezeptor mit Wildtyp-Mäusen nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe für drei Experimentreihen sowie nach einer weiteren Cuprizin-freien Woche für vier Experimentreihen.

Quantifiziert wurde der axonale Schaden im medialen Teil des Corpus callosum durch standardisiertes und wiederholtes Auszählen am Mikroskop. Ein Zählgitter diente dazu, die Anzahl der geschädigten Axone pro mm² zu berechnen.

3.3.1 Ausmaß des axonalen Schadens im demyelinisierten Corpus callosum nach Cuprizin-Gabe in der APP-Färbung

Zwei von drei Experimenten (Exp.2 und Exp.3) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen bezüglich der Anzahl APP⁺-Axone und damit des axonalen Schadens im Corpus callosum.

Exp.2	APP ⁺ axonale Sphäroide/mm ² [MW+/-SD]	p-Wert
p75 ^{NTR} -/-	64,1 ± 22,5	0,834
wt	61,6 ± 20,9	

Exp.3	APP ⁺ axonale Sphäroide/mm ² [MW+/-SD]	p-Wert
p75 ^{NTR} -/-	18,7 ± 7,1	0,513
wt	20,7 ± 2,9	

Tabelle 3.3: APP⁺-Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.2 und 3. Kein signifikanter Unterschied zwischen den p75^{NTR}-/- Tieren und den Wildtypen nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe detektierbar (ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur).

Trotz gleicher Vorgehensweise wies das Exp.2 einen deutlich höheren durchschnittlichen axonalen Schaden auf (62,8 ± 20,9 APP⁺ axonale Sphäroide/mm² [MW+/-SD]) als das Exp.3 (19,5 ± 5,6 APP⁺ axonale Sphäroide/mm²).

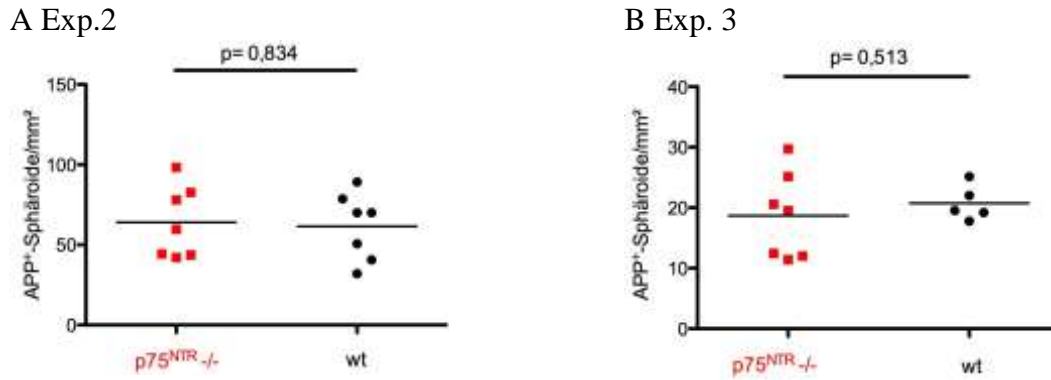
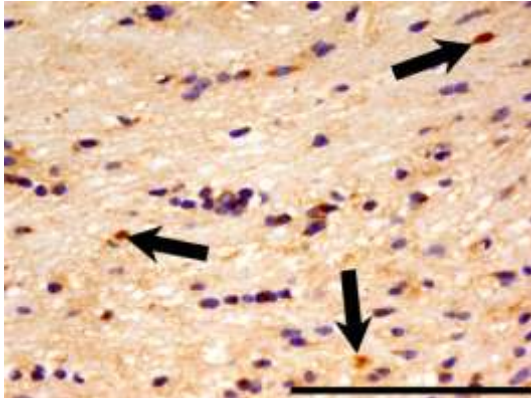
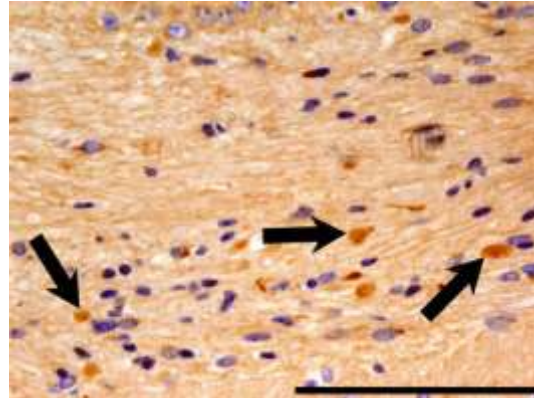


Abbildung 3.18: Quantifizierung der APP⁺-Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.2 und 3. Hier zeigten sich zwischen beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes des axonalen Schadens. Insgesamt höhere durchschnittliche Absolutwerte in Exp.2 ($62,8 \pm 20,9$ APP⁺ axonale Sphäroide/mm² [MW \pm -SD]) im Vergleich zum Exp.3 ($19,5 \pm 5,6$ APP⁺ axonale Sphäroide/mm²).

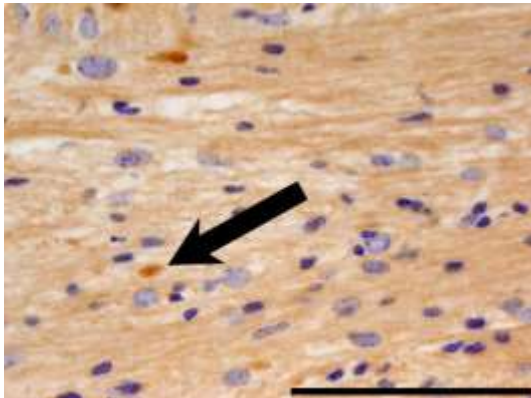
A Exp.2 p75^{NTR} -/-



B Exp.2 wt



C Exp.3 p75^{NTR} -/-



D Exp.3 wt

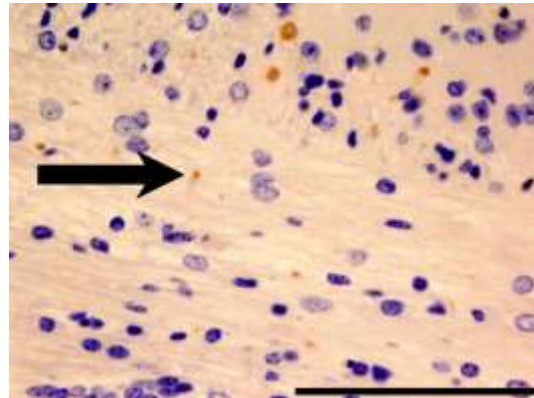


Abbildung 3.19: Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.2 und 3. Kein signifikanter Unterschied zwischen den p75^{NTR} -/- (A und C) und den wt-Mäusen (B und D) in der APP-Färbung ($p = 0,834$ bzw. $p = 0,513$ ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur). Insgesamt niedrigeres Niveau an axonalem Schaden (siehe Pfeile) im Exp.3 (C, D) im Vergleich zum Exp.2 (A, B). 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100 μ m.

Das Exp.1 hingegen wies einen signifikant höheren axonalen Schaden bei den $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf ($p75^{\text{NTR}}^{-/-}$: $72,2 \pm 18,9$ axonale Sphäroide/ mm^2 [MW \pm -SD]; wt: $47,9 \pm 15,4$ APP $^+$ axonale Sphäroide/ mm^2 ; $p= 0,020$; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur).

Exp.1

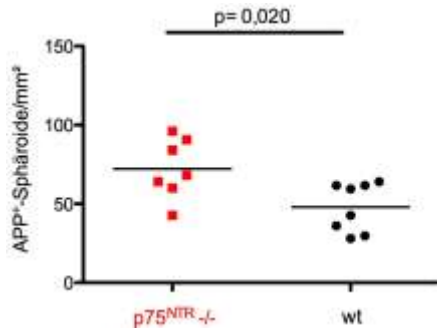
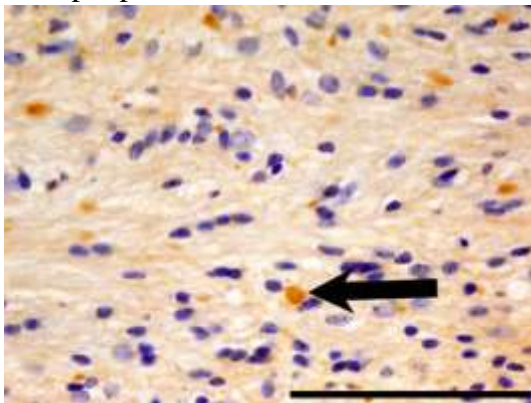


Abbildung 3.20: Quantifizierung der APP $^+$ -Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.1. Die Abb. zeigt eine signifikant höhere Anzahl an geschädigten Axonen bei den $p75^{\text{NTR}}$ -knockout-Tieren im Gegensatz zu den Wildtypen nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe in der lichtmikroskopischen APP-Färbung ($p= 0,020$ ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur).

A Exp.1 $p75^{\text{NTR}}^{-/-}$



B Exp.1 wt

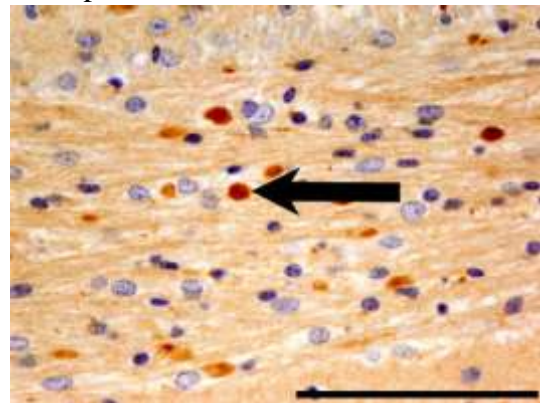


Abbildung 3.21: Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.1. Signifikant mehr APP $^+$ -Sphäroide (siehe Pfeile) bei den $p75^{\text{NTR}}$ -knockout-Mäusen (A) gegenüber den Wildtyp-Mäusen (B) in der APP-Immunhistochemie. 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100 μm .

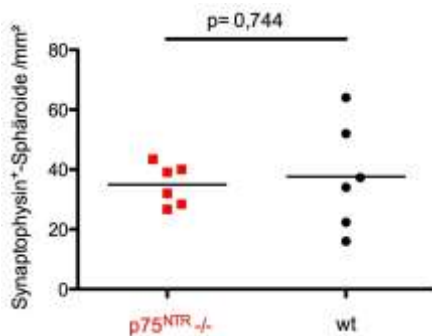
3.3.2 Ausmaß des axonalen Schadens im demyelinisierten Corpus callosum nach Cuprizone-Gabe in der Synaptophysin-Färbung

Die Synaptophysin-Immunhistochemie stellt ebenfalls axonale Sphäroide dar, zumal auch dieses Protein mittels schnellen anterograden axonalen Transports in Richtung Synapse befördert wird. Es diente zur Validierung der mittels der APP-Immunhistochemie gefundenen Ergebnisse.

Ähnlich der APP-Auswertungen wurden auch hier nach sechswöchiger Demyelinisierung bei zwei von insgesamt drei Experimenten (Exp.2, Exp.3) keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden ($p=0,744$ für Exp.2 und $p=0,069$ für Exp.3; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur).

Beim Exp.3 zeigten die Tiere mit Expression des $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptors (wt-Tiere) tendenziell jedoch einen höheren axonalen Schaden (wt: $16,1 \pm 5,1$ Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm² [MW \pm -SD]) als die Wildtyp-Tiere ($p75^{\text{NTR}}^{-/-}$: $10,3 \pm 4,1$ Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm²; $p=0,069$). In diesem Experiment ergaben sich insgesamt sehr niedrige Absolutwerte für den axonalen Schaden in beiden Vergleichsgruppen ($p75^{\text{NTR}}^{-/-}$: $10,3 \pm 4,1$; wt: $16,1 \pm 5,1$ Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm²) im Vergleich zum Exp.2 ($p75^{\text{NTR}}^{-/-}$: $34,9 \pm 6,8$; wt: $37,6 \pm 18,0$ Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm²).

A Exp.2



B Exp.3

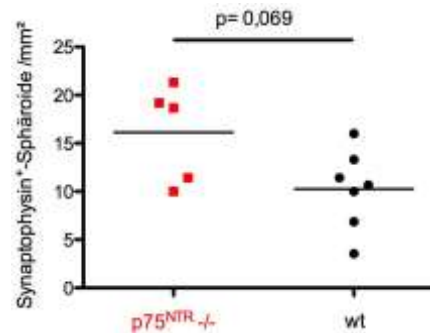


Abbildung 3.22: Quantifizierung der Syn.⁺-Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.2 und 3. Kein signifikanter Unterschied ($p=0,744$ ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) hinsichtlich des axonalen Schadens in Exp.2 (A). Tendenziell höherer axonaler Schaden ($p=0,069$) in Exp.3 (B) zwischen den Tieren ohne den $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor ($p75^{\text{NTR}}^{-/-}$) im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nach sechswöchiger Cuprizone-Gabe.

Das Exp.1 hingegen wies mehrere Besonderheiten auf: zunächst zeigte es ungleich zur APP⁺-Auswertung weder signifikante noch tendenzielle Unterschiede zwischen den p75^{NTR}-knockout- und wt-Tieren (p= 0,110; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur). Des Weiteren kam es in diesem Experiment zu einem deutlich höheren Niveau von axonaler Schädigung (p75^{NTR} -/-: 115,6 ± 33,7; wt: 81,6 ± 36,7 Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm² [MW+/-SD]) im Vergleich zum Exp.2 (p75^{NTR} -/-: 34,9 ± 6,8; wt: 37,6 ± 18,0 Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm²) bzw. zum Exp.3 (p75^{NTR} -/-: 10,3 ± 4,1; wt: 16,1 ± 5,1 Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm²).

Exp.1

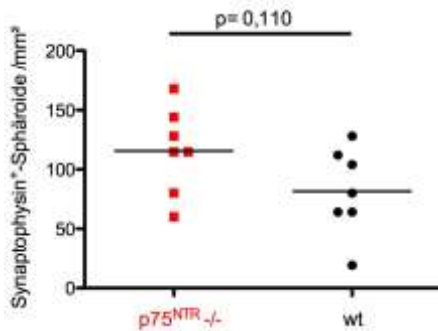
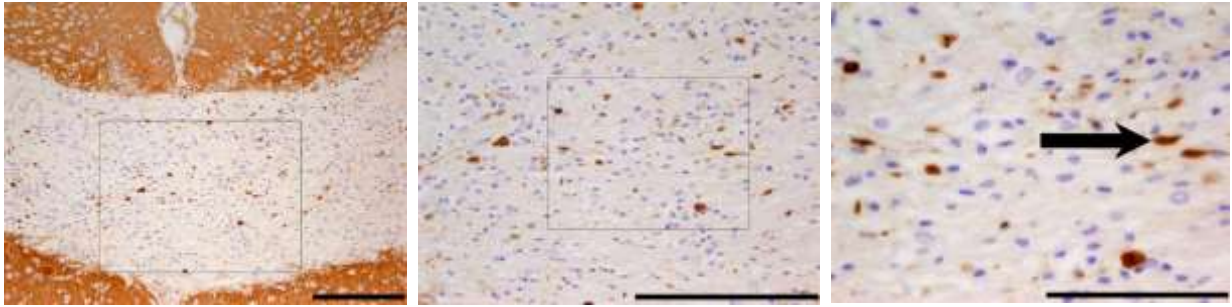


Abbildung 3.23: Quantifizierung der Syn.⁺-Sphäroide zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.1. Nicht signifikanter Unterschied bezüglich der axonalen Schädigung (p= 0,110; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) bei den p75^{NTR}-knockout-Tieren (p75^{NTR} -/-: 115,6 ± 33,7 Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm² [MW+/-SD]) im Vergleich zu den Wildtypen im medialen demyelinisierten Corpus callosum (wt: 81,6 ± 36,7 Syn.⁺ axonale Sphäroide/mm²).

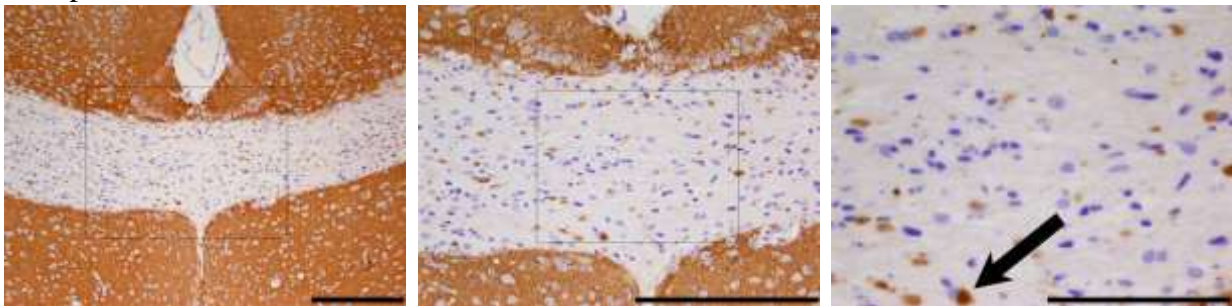
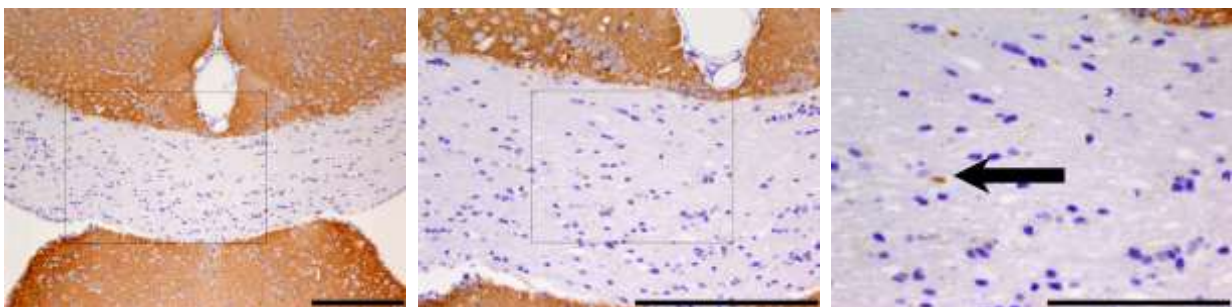
100-fache Vergrößerung

200-fache Vergrößerung

400-fache Vergrößerung

A Exp.1 p75^{NTR} -/-

B Exp.1 wt

C Exp.2 p75^{NTR} -/-

D Exp.2 wt

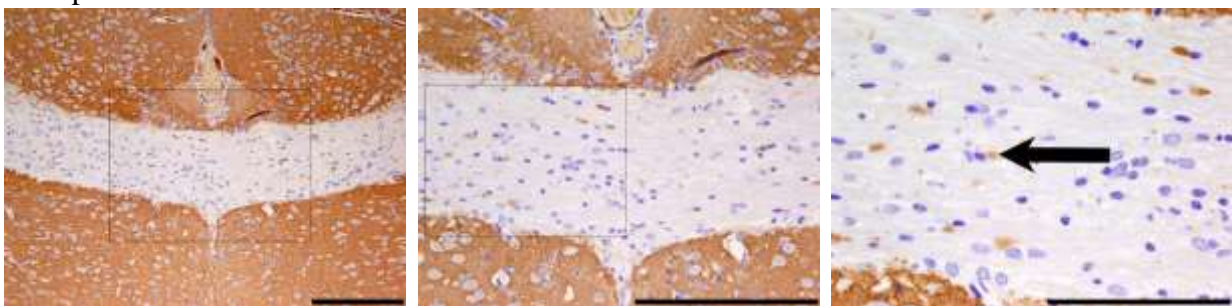
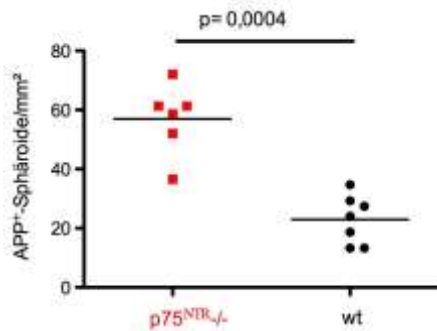


Abbildung 3.24: Immunhistologie des axonalen Schadens in der Syn.-Färbung zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 2. Dabei fällt tendenziell ein höherer axonaler Schaden bei den p75^{NTR}-/-Tieren (A) im Vergleich zu den wt-Tieren (B) während der Demyelinisierung in Exp.1 auf. Exp.2 zeigt hingegen eine vergleichbare Anzahl von Synaptophysin⁺ axonalen Sphäroiden (siehe Pfeile in der 400-fachen Originalvergrößerung) zwischen den p75^{NTR}-/-Tieren (C) und den Wildtypen (D) auf. Der schwarze Rahmen zeigt jeweils das vergrößert dargestellte Areal. Balkengröße 200µm für 100- und 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100µm für 400-fache Originalvergrößerung.

3.3.3 Ausmaß des axonalen Schadens im remyelinisierten Corpus callosum nach Cuprizon-Absetzung in der APP-Immunhistochemie

Hinsichtlich der Remyelinisierung wies die Mehrheit der vier Versuche einen signifikanten Unterschied ($p=0,0004$ für Exp.1 bzw. $p=0,024$ für Exp.4; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) zwischen den $p75^{NTR}$ -defizienten Mäusen (Exp.1: $p75^{NTR} -/-$: $57,0 \pm 11,9$; Exp.4: $p75^{NTR} -/-$: $45,4 \pm 6,1$) und den wt-Tieren auf (wt: $23,0 \pm 8,2$ für Exp.1; bzw. wt: $35,8 \pm 4,0$ für Exp.4; siehe Abbildung 3.25). Angaben in APP^+ -Sphäroiden/ mm^2 [MW \pm SD].

A Exp.1



B Exp. 4

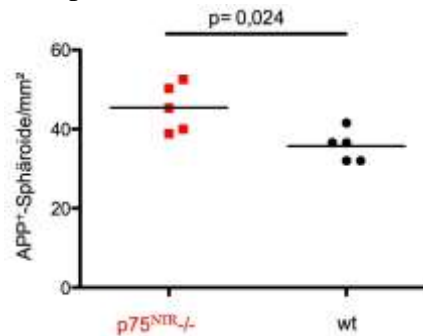
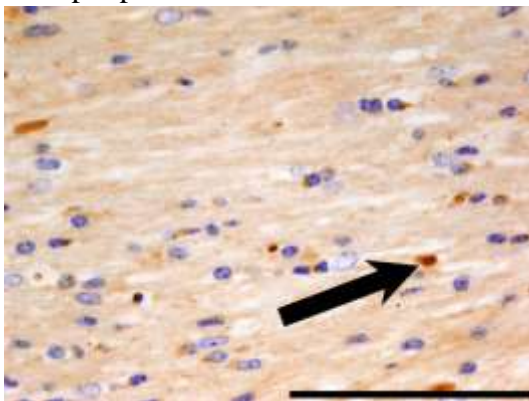


Abbildung 3.25: Quantifizierung der APP^+ -Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 4. Deutlich erhöhtes Ausmaß an axonalem Schaden bei den $p75^{NTR}$ -knockout-Tieren im Gegensatz zu der Vergleichsgruppe in zwei Versuchsreihen ($p=0,0004$ in Exp.1 bzw. $p=0,024$ in Exp.4; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) eine Woche nach Absetzung der Cuprizon-Diät.

A Exp.4 $p75^{NTR} -/-$ 

B Exp.4 wt

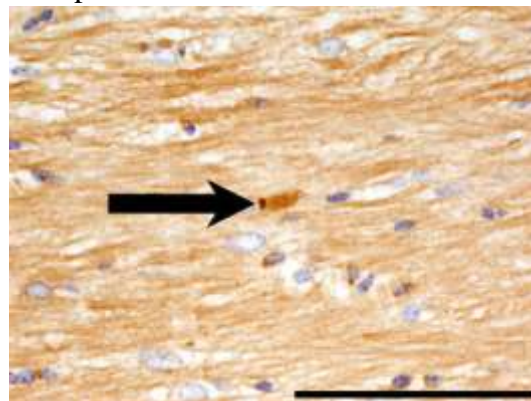


Abbildung 3.26: Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.4. Mehr APP^+ -Sphäroide (siehe Pfeile) für $p75^{NTR} -/-$ Tiere (A) im Vergleich zu den Wildtypen (B) derselben Versuchsreihen. 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100 μ m.

Dieser signifikante Unterschied konnte sowohl für homozygote $p75^{NTR} -/-$ Tiere ($p<0,001$; $p75^{NTR} -/-$: $23,6 \pm 7$; wt: $6,0 \pm 5,1$ [MW \pm SD]) als auch für heterozygote Mäuse in einem weiteren Experiment nachgewiesen werden ($p<0,01$; ANOVA; $p75^{NTR} +/-$: $21,0 \pm 2,7$ APP^+ Sphäroide/ mm^2 ; siehe Abbildung 3.27).

Exp.2

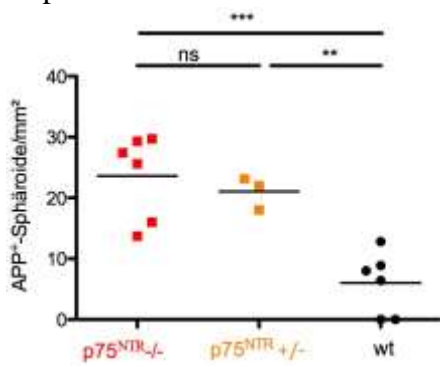
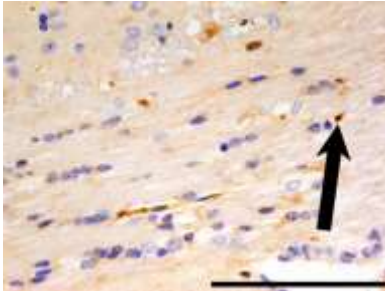
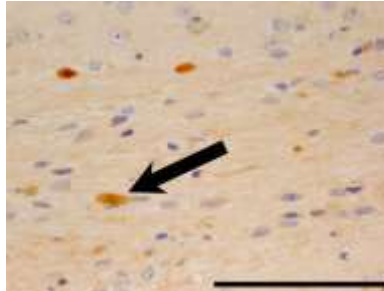


Abbildung 3.27: Quantifizierung der APP⁺-Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2. Heterozygote- und homozygote p75^{NTR}-knockout-Tiere wiesen einen höheren axonalen Schaden im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf ($p < 0,001$ für p75^{NTR} -/- vs. wt und $p < 0,01$ für p75^{NTR} +/- vs. wt; ANOVA mit Bonferroni-Post-Test). Kein signifikanter Unterschied (ns) für p75^{NTR} -/- vs. p75^{NTR} +/- nachweisbar.

A Exp.2 p75^{NTR} -/-B Exp.2 p75^{NTR} +/-

C Exp.2 wt

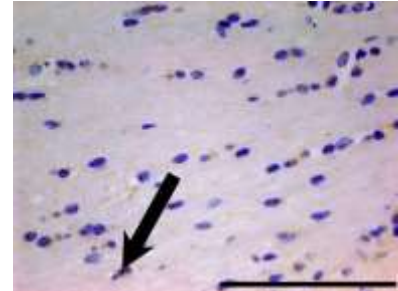


Abbildung 3.28: Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2. Hochgradig ausgeprägter axonaler Schaden sowohl bei den homozygoten (A) als auch bei den heterozygoten p75^{NTR} -/- Mäusen (B) im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen (C). 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100µm.

Im Experiment 3 konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,169$; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p75^{NTR-/-}$: $37,6 \pm 7,7$; wt: $29,4 \pm 11,4$ APP⁺ Sphäroide/mm² [MW \pm -SD]).

Exp.3

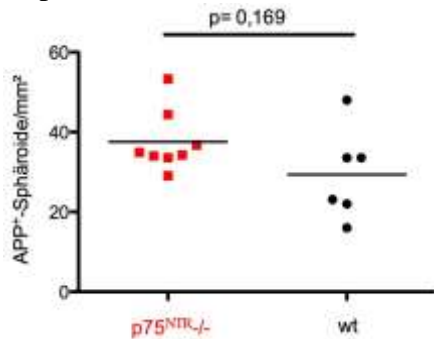
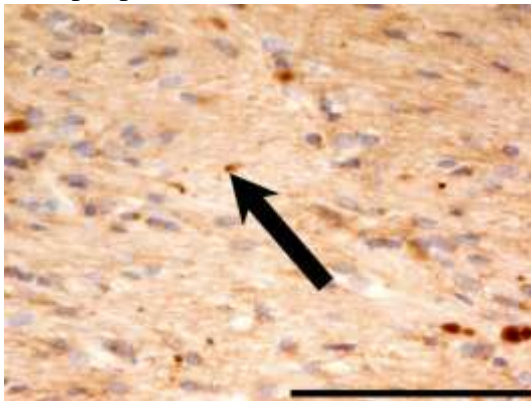


Abbildung 3.29: Quantifizierung der APP⁺-Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.3. Kein signifikanter Unterschied bezüglich des axonalen Schadens zwischen den beiden Vergleichsgruppen, ($p=0,169$ ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur; wt: $29,4 \pm 11,4$ [MW \pm -SD]) im Vergleich zu den $p75^{NTR-/-}$ Tieren ($37,6 \pm 7,7$ APP⁺-Sphäroide/mm²).

A Exp.3 $p75^{NTR-/-}$



B Exp.3 wt

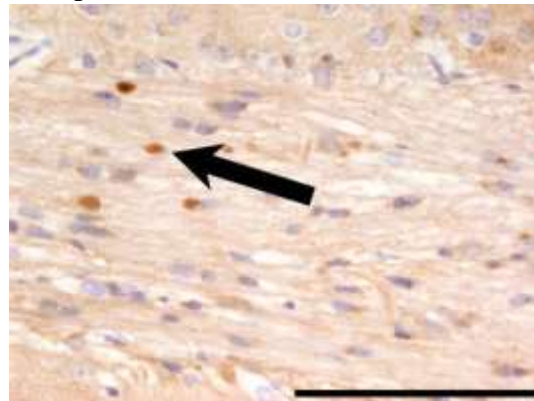
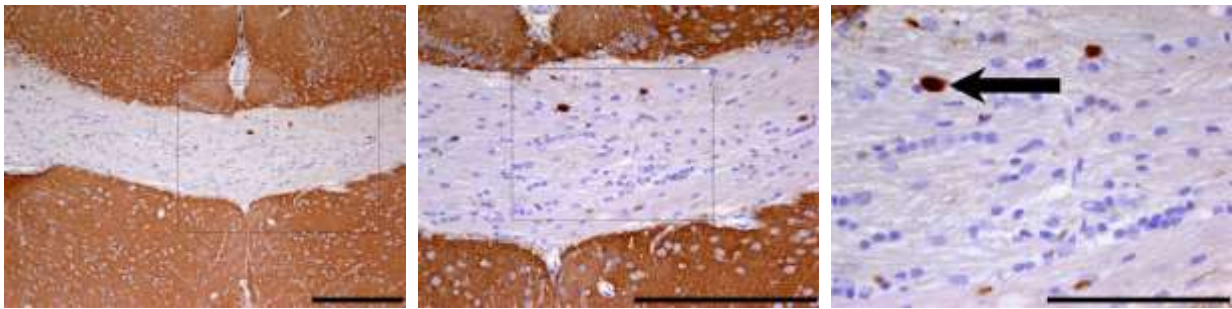
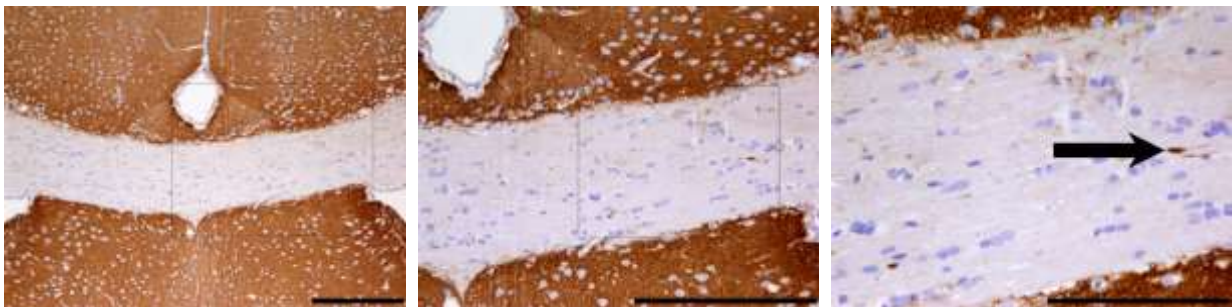


Abbildung 3.30: Immunhistologie des axonalen Schadens in der APP-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.3. Ähnlich hoher axonaler Schaden (Pfeile) bei den $p75^{NTR-/-}$ -knockout- (A) und den Wildtyp-Mäusen (B) nach sechswöchiger Cuprizone-Gabe und anschließender einwöchiger Erholungsphase. 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100 μ m.

100-fache Vergrößerung

200-fache Vergrößerung

400-fache Vergrößerung

A Exp.2 p75^{NTR} -/-B Exp.2 p75^{NTR} +/-

C Exp.2 wt

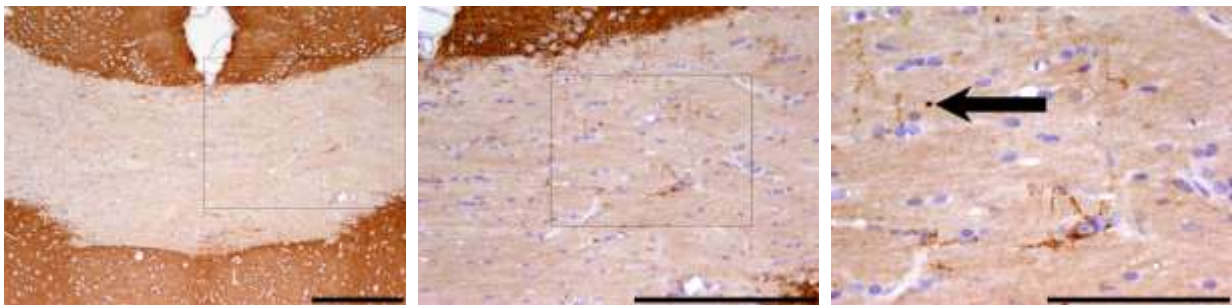
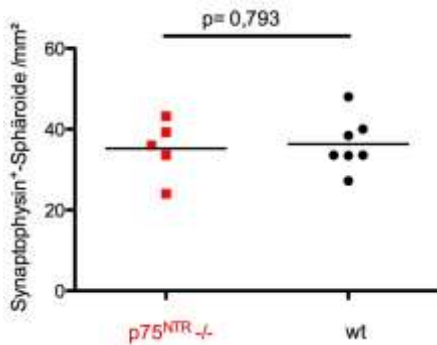


Abbildung 3.32: Immunhistologie des axonalen Schadens in der Syn.-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.2. Die lichtmikroskopische Färbung zeigt einen deutlich höheren axonalen Schaden (siehe Pfeile in 400-facher Originalvergrößerungen) bei den heterozygoten p75^{NTR} +/- Tieren (B) im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (C). Der schwarze Rahmen zeigt jeweils das vergrößert dargestellte Areal. Balkengröße 200µm für 100- und 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100µm für 400-fache Originalvergrößerung.

In zwei weiteren Experimenten wurde dieser Unterschied allerdings nicht bestätigt (Exp.3: $p=0,793$ bzw. Exp.4: $p=0,595$ ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur). Exp.4 wies insgesamt ein höheres Niveau an axonaler Schädigung auf sowohl für die $p75^{NTR-/-}$ ($51,3 \pm 12,6 \text{ Syn.}^+$ Sphäroide/ mm^2 [MW \pm -SD]) als auch für die Wildtypen ($45,6 \pm 16,7 \text{ Syn.}^+$ Sphäroide/ mm^2) im Vergleich zu Exp.3 ($p75^{NTR-/-}$: $35,2 \pm 7,2$; wt: $36,3 \pm 6,6 \text{ Syn.}^+$ axonale Sphäroide/ mm^2).

A Exp. 3



B Exp. 4

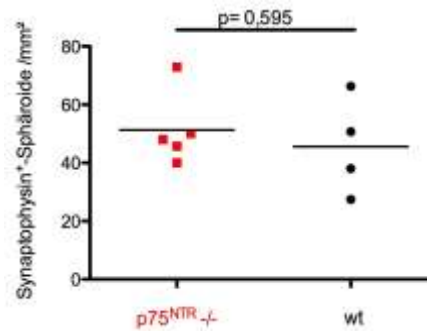
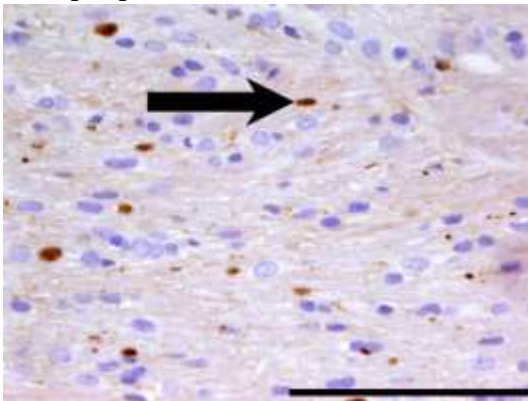


Abbildung 3.33: Quantifizierung der Syn.^+ -Sphäroide zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.3 und 4. Es ist kein signifikanter Unterschied im axonalen Schaden in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit des $p75^{NT}$ -Rezeptors nachweisbar.

A Exp.3 $p75^{NTR-/-}$ 

B Exp.3 wt

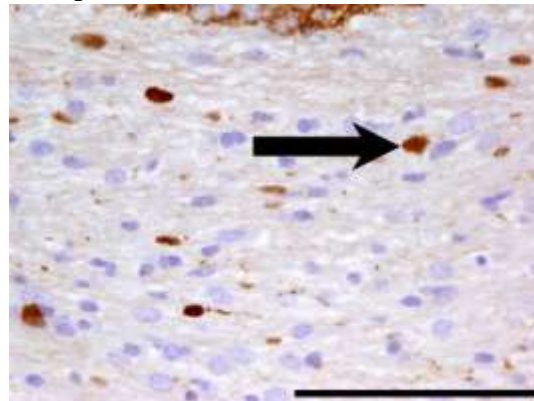


Abbildung 3.34: Immunhistologie des axonalen Schadens in der Syn.-Färbung zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.3. Vergleichbares Ausmaß an axonalem Schaden (siehe Pfeile) zwischen den $p75^{NTR}$ -knockout-Tieren (A) und den Wildtypen (B). 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße $100\mu\text{m}$.

3.4 Entzündungsreaktion bei p75^{NTR}-knockout-Mäusen im Cuprizon-Modell

Antikörper gegen das CD3-Molekül markieren T-Zellen und stellen damit ein immunhistochemisches Korrelat des Ausmaßes an Entzündungszellinfiltration dar. Cuprizon-induzierte Entmarkung gilt zwar als nicht T-Zell-mediert, trotzdem sind in der Regel einzelne T-Zellen in den entmarkten Arealen nachweisbar (McMahon et al. 2002). Anhand des Zählgitters wurden die positiv-markierten CD3-Zellen im medialen Teil der Corpora callosa quantifiziert.

3.4.1 Ausmaß der Entzündungsreaktion zum Demyelinisierungszeitpunkt

Nach sechswöchiger Cuprizon-Gabe konnte in keinem der drei Experimente ein signifikanter Unterschied zwischen den p75^{NTR}-knockout-Mäusen und ihrer Vergleichsgruppe detektiert werden. Insgesamt ergab das Exp.3 ein niedrigeres Niveau an T-lymphozytärer Infiltration im Vergleich zu den Exp.1 und 2 (siehe Tabelle 3.4).

	p75 ^{NTR} -/- [MW+/-SD]	wt [MW+/-SD]	p-Wert
Exp.1	41,8 ± 11,7	40,0 ± 17,5	0,825
Exp.2	25,9 ± 3,6	24 ± 5,4	0,543
Exp.3	10,1 ± 3,9	10,3 ± 1,7	0,881

Tabelle 3.4: T-Zell-Infiltration zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1-3. Keine signifikanten Unterschiede in allen drei Experimentreihen zwischen den p75^{NTR}-knockout-Tieren und den Wildtyp-Tieren feststellbar (ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur; Angaben in CD3⁺-T-Zellen/mm² [MW+/-SD]).

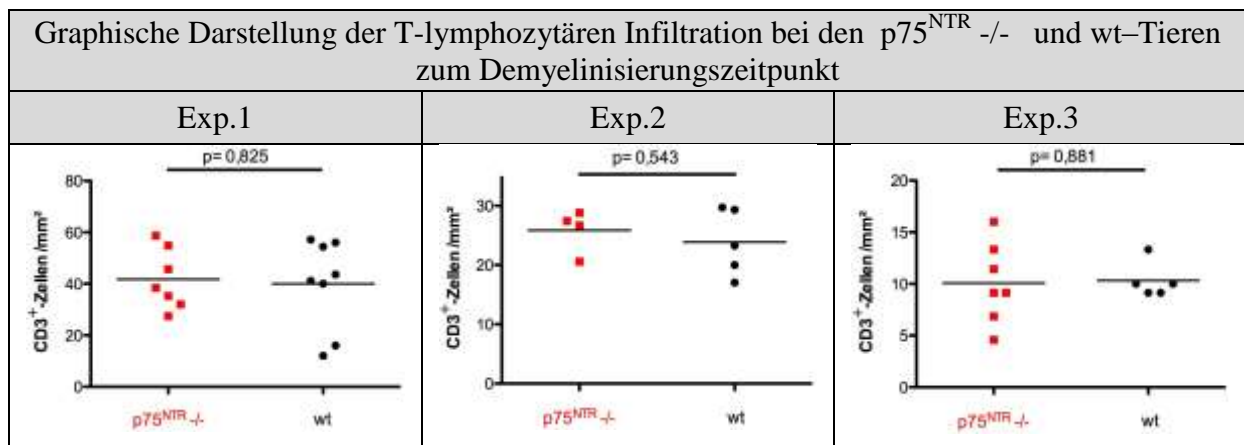
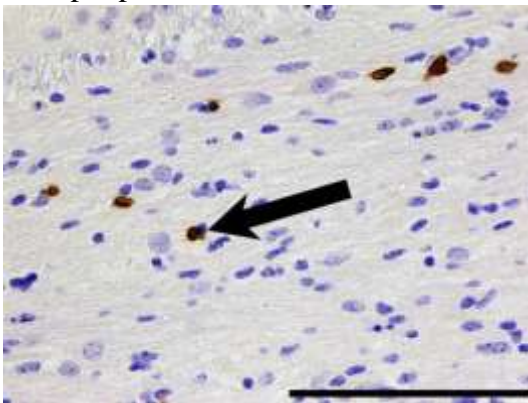


Abbildung 3.35: Anzahl der T-Zellen zum Demyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1-3. Kein signifikanter Unterschied zwischen den p75^{NTR}-knockout-Tieren und den Wildtypen bezüglich der T-Zell-Dichte nach sechswöchiger Cuprizon-Gabe detektierbar.

A Exp.1 p75^{NTR} -/-

B Exp.1 wt

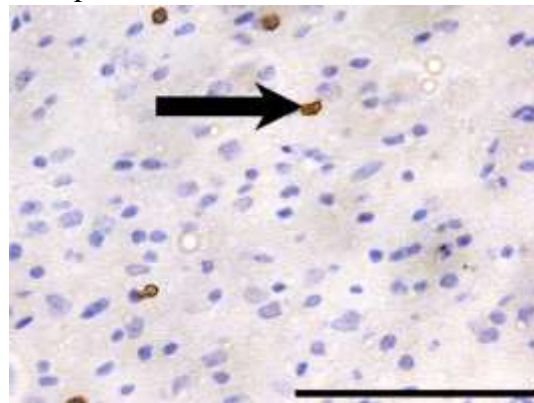


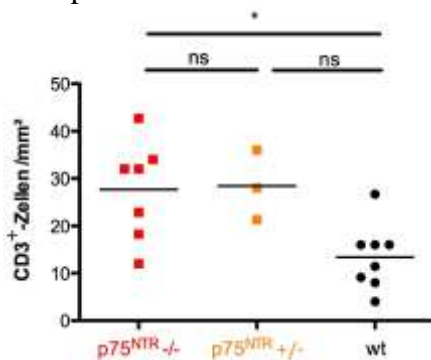
Abbildung 3.36: Lichtmikroskopische Aufnahmen der T-Zellinfiltration zum Demyelinisierungszeitpunkt in Exp.1. Die mikroskopischen Aufnahmen der CD3-immunohistochemischen Färbung zeigen ähnliche T-Zell-Infiltration für die Vergleichsgruppen p75^{NTR} -/- (A) und Wildtypen (B) bei 400-facher Originalvergrößerung; Balkengröße 100µm.

3.4.2 Ausmaß der Entzündungsreaktion zum Remyelinisierungszeitpunkt

Analog zu den anderen immunohistochemischen Färbungen führte ich die CD3-Immunhistochemie ebenfalls in vier Experimentreihen nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe mit anschließender einwöchiger Cuprizin-Pause durch. Hierbei wurde bei zwei Experimenten ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$ für Exp.2; ANOVA mit Bonferroni-Post-Test bzw. $p = 0,042$ für Exp.3; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) gefunden.

Die Mittelwerte lagen in Exp.2 sowohl für p75^{NTR} +/- ($28,4 \pm 7,3$) als auch für p75^{NTR} -/- ($27,7 \pm 10,5$) und wt ($13,4 \pm 6,9$) etwas niedriger als im Exp.3 (p75^{NTR} -/-: $42,2 \pm 14,8$; wt: $27,4 \pm 10,3$). Angaben in CD3⁺-T-Zellen/mm² [MW+/-SD].

A Exp.2



B Exp. 3

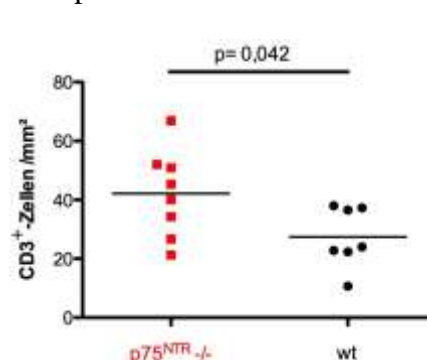
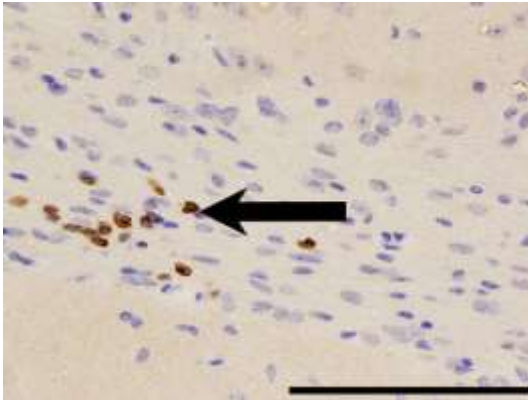


Abbildung 3.37: Anzahl der T-Zellen zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.2 und 3. Signifikanter Unterschied (A: $p < 0,05$ ANOVA mit Bonferroni-Post-Test bzw. B: $p = 0,042$; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) zwischen beiden Vergleichsgruppen: die p75^{NTR} -/- Tiere zeigten eine höhere Anzahl von T-Zellen während der Remyelinisierungsphase im Vergleich zu den Wildtypen in zwei Versuchsreihen (Exp.2 und Exp.3). Der Vergleich zwischen den p75^{NTR}-heterozygoten-Tieren mit den Wildtypen (A: ns= nicht signifikant) zeigte, dass die 50%ige Reduktion des p75^{NT}-Rezeptors nicht zu einer erhöhten Anzahl an T-lymphozytären Zellen während der Remyelinisierung führt.

A Exp.3 p75^{NTR} -/-

B Exp.3 wt

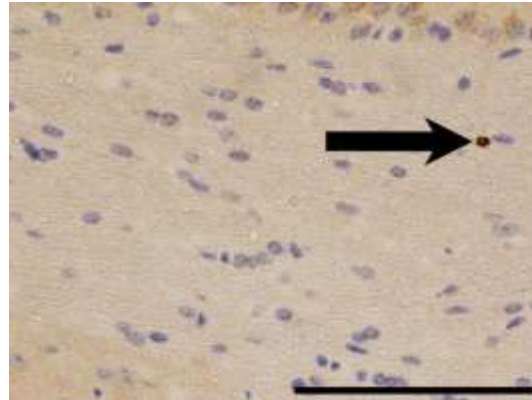
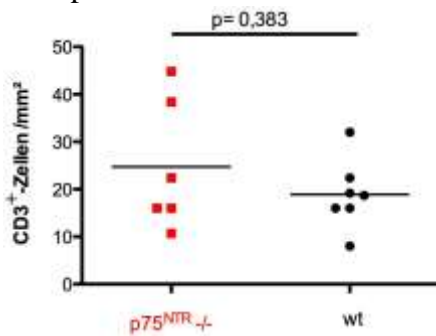


Abbildung 3.38: Lichtmikroskopische Aufnahmen der T-Zell-Infiltration zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.3. Signifikant mehr CD3⁺-Zellen (siehe Pfeile) bei den p75^{NTR}-homozygoten-knockout-Tieren (A) nach einwöchiger Cuprizin-Pause im Vergleich zu den Wildtypen (B). 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100µm.

In den beiden weiteren Experimenten konnte dieser Unterschied allerdings nicht bestätigt werden ($p=0,383$ für Exp.1 und $p=0,741$ für Exp.4; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur). Hier lieferten beide Experimente ähnliche Entzündungswerte für p75^{NTR} -/-: $24,7 \pm 13,7$; wt: $18,9 \pm 7,3$ in Exp.1; bzw. p75^{NTR} -/-: $13,5 \pm 3,6$ sowie wt: $14,1 \pm 3,0$ in Exp. 4). Angaben in CD3⁺-T-Zellen/mm² [MW \pm SD].

A Exp.1



B Exp.4

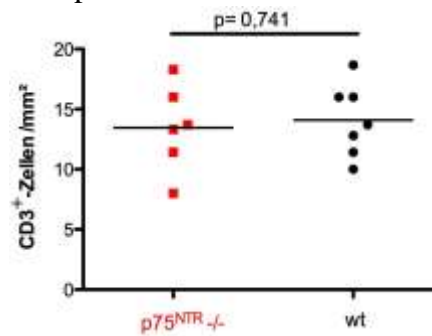
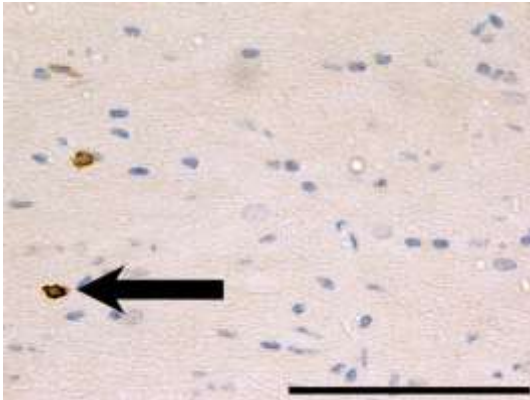


Abbildung 3.39: Anzahl der T-Zellen zum Remyelinisierungszeitpunkt in den Exp.1 und 4. Keine signifikanten Unterschiede ($p=0,383$ bzw. $p=0,741$; ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) zwischen den beiden Vergleichsgruppen bezüglich der Anzahl der T-Zell-Infiltration nach einwöchiger Cuprizin-Pause.

A Exp.1 p75^{NTR} -/-

B Exp.1 wt

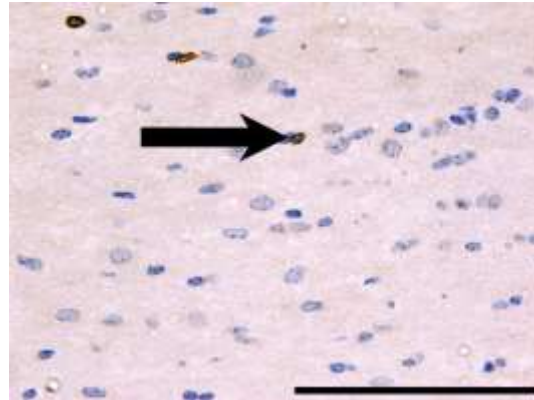


Abbildung 3.40: Lichtmikroskopische Aufnahmen der T-Zell-Infiltration zum Remyelinisierungszeitpunkt in Exp.1. Vergleichbare Anzahl von CD3⁺-Lymphozyten (Pfeile) unabhängig von der Ab- (A) oder Anwesenheit (B) des p75^{NTR}-Rezeptors. 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100µm.

4 Diskussion

Der $p75^{\text{NTR}}$ wird nicht nur von vielen verschiedenen Zellarten wie Entzündungszellen, Endothelzellen sowie Neuronen exprimiert, sondern ist auch für vielfältige, teilweise entgegengesetzte Aufgaben von Apoptose-Vermittlung bis hin zur Förderung des Zellüberlebens verantwortlich (Hempstead 2002). Bislang wurden schwerpunktmäßig seine protektiven Aufgaben im Rahmen von Regenerationsvorgängen vor allem im PNS untersucht (Gentry et al. 2000). Um etwaig bestehende Parallelen analog zum PNS auch im ZNS aufzudecken, wurden die Effekte des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors im Cuprizin-Modell nach De- und Remyelinisierung in der vorliegenden Arbeit betrachtet. Dabei ging es hauptsächlich um die Frage, ob das Ausmaß des axonalen Schadens durch die Expression des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors reduziert werden kann und ob der Neurotrophinrezeptor möglicherweise durch die Stabilitätsförderung der BHS der Einwanderung von entzündungsfördernden T-Zellen entgegenwirkt.

4.1 Die Bedeutung des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors für die De- und Remyelinisierung im Cuprizin-Modell

4.1.1 Beeinflussung der Demyelinisierung durch den $p75^{\text{NTR}}$

Um den Einfluss des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors bzw. die Auswirkungen seines Fehlens auf die Remyelinisierungseffizienz systematisch zu untersuchen, quantifizierte ich den Myelingeht im Corpus callosum von Mäusen nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe sowohl lichtmikroskopisch anhand der LFB/PAS-Färbung als auch elektronenmikroskopisch. Dazu verglich ich in drei Experimenten den Vorgang der akuten Demyelinisierung zwischen $p75^{\text{NTR}}$ -knockout- und Wildtyp-Tieren.

Dabei zeigten zwei Experimente (Exp.1, Exp.3) lichtmikroskopisch, dass die Abwesenheit des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Demyelinisierungsausmaßes der Corpora callosa unter Cuprizin-Gabe, sowohl im medialen als auch im lateralen Teil, bewirkte. Zu diesem Ergebnis kommen auch Copray et al. 2005, die ebenfalls in der LFB/PAS-Färbung $p75^{\text{NTR}}$ -knockout- mit Wildtyp- Mäusen verglichen hatten.

Ein Experiment (Exp.2) wies jedoch lichtmikroskopisch signifikant weniger Entmarkung bei den Tieren ohne den $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren auf; allerdings nur in den medialen Anteilen der Corpora callosa. In der Gesamtschau der erhobenen Daten scheint also ein Fehlen des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors das Ausmaß der Entmarkung durch Cuprizin nicht wesentlich zu beeinflussen. Insgesamt könnten die heterogenen Ergebnisse dieser Experimentreihe durch geringe Schwankungen im experimentellen Aufbau begründet sein.

So genügt beispielsweise ein Cuprizin-Gehalt von 0,1% bei den C57BL/6 Mäusen nicht für eine Demyelinisierung (Hiremath et al. 1998). Falls also eine Mausgruppe zu wenig Cuprizin durch das Futter aufgenommen hat, könnte dies zu einer nicht ausreichenden oligodendrozytenschädigenden TNF- α -Synthese von Mikroglia und Astrozyten geführt haben (Pasquini et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diese Schwankungen durch mehrfaches Durchführen der Experimente weitestgehend auszuschließen. Da das Ergebnis einer geringeren Entmarkung in den $p75^{\text{NTR}}/-$ nur in einem Durchgang und nur im medialen Anteil des Corpus callosum nachweisbar war, ist es im Kontext am ehesten als „Ausreißer-Ergebnis“ zu interpretieren.

Quantitative Aussagen über den Myelingeht im Corpus callosum können neben der LFB/PAS-Färbung (Scholtz 1977) auch über elektronenmikroskopische Untersuchungen erhalten werden. Analog zu den lichtmikroskopischen Ergebnissen konnte ich in den elektronenmikroskopischen Auswertungen, wie auch Mason et al. 2001, ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der Entmarkung zwischen den $p75^{\text{NTR}}$ -knockout-Mäusen und den Wildtyp-Tieren nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe nachweisen. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass die Aussagekraft der elektronenmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse durch die kleine untersuchte Fläche limitiert ist. Aus meiner Sicht bestätigen die licht- und elektronenmikroskopischen Experimente daher, dass die Abwesenheit des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors weder einen protektiven noch einen schädigenden Einfluss auf die durch Cuprizin induzierte Oligodendrozytenschädigung und Demyelinisierung hat.

4.1.2 Beeinflussung der Remyelinisierung durch den $p75^{\text{NTR}}$

Anschließend wurden vier Experimente durchgeführt, um den Einfluss des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor-Systems auf die Effizienz der Remyelinisierung zu untersuchen. Die Remyelinisierung trägt im Cuprizin-Modell, aber auch bei der MS, maßgeblich zur motorischen Symptomrückbildung bei (Liebetanz und Merkler 2006; Bodini et al. 2012). Die Wiederherstellung der Myelinscheiden beginnt mit der Vermehrung von OPCs in entmarkten Gebieten und angrenzenden, noch myelinisierten Arealen, aus denen sich dann reife Oligodendrozyten entwickeln, welche die Axone (re)myelinisieren können (Irvine und Blakemore 2006).

Die Ergebnisse meiner Experimente differieren hier deutlicher: Einerseits scheint der $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor für die Remyelinisierung förderlich zu sein, sodass seine Abwesenheit zu signifikant schlechteren Remyelinisierungsergebnissen führt (Exp.2 medial und lateral, Exp.4 lateral). Dies bekräftigt die Hypothese von Lu et al. 2005, dass der $p75^{\text{NTR}}$ im ZNS nicht nur zur Myelinisierung während der Entwicklung, sondern auch im adulten Zustand zur Defekt-

Regeneration benötigt wird: so konnten beispielsweise Petratos et al. 2004 zeigen, dass die für die Remyelinisierung essentiellen OPCs den $p75^{\text{NTR}}$ nach Cuprizon-induzierter Demyelinisierung exprimieren.

Auch lassen die von mir durchgeführten Experimente vermuten, dass die möglicherweise durch den $p75^{\text{NTR}}$ geförderte Remyelinisierung im medialen Teil des Corpus callosum beginnt: hier ließen sich durchgehend höhere Mittelwerte der (Re-)Myelinisierungsintensität nachweisen im Vergleich zu den lateralen Anteilen der Corpora callosa, sowohl bei den knockout-Mäusen als auch bei ihren Kontrollgruppen (Exp.1, 2, 3).

Andererseits zeigten drei meiner Versuche, dass der $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor möglicherweise für die effiziente Remyelinisierung im ZNS –zumindest im Cuprizon-Modell- nicht benötigt wird (Exp.1 medial und lateral, Exp.3 medial und lateral, Exp.4 medial). Im PNS hingegen scheint der $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor essentiell für die Remyelinisierung zu sein: Song et al. (2006) und Tomita et al. (2007) wiesen nach einem Nervenschaden bei $p75^{\text{NTR}}$ -defizienten Schwanzzellen verminderte axonale Regeneration und dünnere Myelinscheiden im Vergleich zu den Wildtypen nach. Auch wird die Remyelinisierung im PNS $p75^{\text{NTR}}$ -unabhängig durch die Bindung von NT-3 und TrkC gehemmt (Cosgaya et al. 2002). Im Gegensatz dazu kann die Bindung der Neurotrophine BDNF (Rosenberg et al. 2006; Tomita et al. 2007; Zhang et al. 2000) bzw. NGF an den $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor (über NF- κ B-Induktion (Carter et al. 1996; Hirata et al. 2001)) die Remyelinisierung im peripheren Nervensystem fördern (Tomita et al. 2007). Dabei bewirkt BDNF-Bindung an den $p75^{\text{NTR}}$ auf Schwanzzellen eine essentielle Interaktion des G-Protein-gekoppelten Rezeptors Par-3 (*Protease-activated receptor-3*) mit dem $p75^{\text{NTR}}$. Par-3 sorgt anschließend für eine vermehrte Expression des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors auf den Schwanzzellen. So wird, über die BDNF/ $p75^{\text{NTR}}$ -Bindung, dann die Myelinisierung der Axone durch die Schwanzzellen ermöglicht. Nach Abschluss der Myelinisierung zerfällt der Par-3/ $p75^{\text{NTR}}$ -Komplex wieder (Chan et al. 2006). Ein möglicher Grund, warum der $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor nur im PNS, jedoch nicht im ZNS, die RM fördert, könnte sein, dass der $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptor im Gegensatz zu den Oligodendrozyten nach einem Nervenschaden auf den Schwanzzellen vermehrt exprimiert wird (Song et al. 2006).

Insgesamt lassen meine Daten eine leichte Tendenz erkennen, nach welcher der $p75^{\text{NTR}}$ sich auch im ZNS auf die Remyelinisierung günstig auswirkt. Allerdings konnte ich das nicht in dem Maße eindeutig nachweisen, wie es anhand der veröffentlichten Daten aus dem peripheren Nervensystems zu erwarten gewesen wäre. Daher scheint der Vorgang im ZNS möglicherweise empfindlicher auf diverse Störfaktoren zu sein. Zu diesen zählen die Expression von Zytokinen, wie TNF- α und IFN- γ , aber auch von Aminosäuren, wie

Glutamat, die beispielsweise Oligodendrozyten schädigen (Brück et al. 2003). So kann TNF- α als proinflammatorisches Zytokin sowohl Oligodendrozyten und Mikroglia schädigen als auch eine protektive Wirkung auf Neurone gegenüber NO ausüben. Welche dieser ambivalenten Wirkungen von den Zytokinen vermittelt wird, scheint neben dem Freisetzungsort auch vom Freisetzungzeitpunkt abhängig zu sein (Sharief 1998).

Ein weiterer limitierender Faktor für die Remyelinisierung könnte auch die intakte BHS im Cuprizin-Modell sein, die nur eine geringe Immigration von Makrophagen in das ZNS erlaubt. Dadurch kann das defekte Myelin weniger schnell abgebaut werden, und es kommt im Verlauf sowohl zu einer verlangsamten und reduzierten Remyelinisierung als auch zu einem höheren axonalen Schaden, obwohl die OPC nicht direkt betroffen waren (Pohl et al. 2011).

Des Weiteren ist bekannt, dass die Remyelinisierungskapazität mit steigendem Alter abnimmt (Blakemore 1974; Chan et al. 2006). Dies könnte auf die von Shen et al. (2008) im Cuprizin-Modell nachgewiesene geringere Expression der Histon-Deazetylase1 (HDAC1) zurückzuführen sein, die zur Transkription der DNA (*Deoxyribonucleic acid*; Desoxyribonukleinsäure) notwendig ist und somit bei geringer Expression die Remyelinisierungsversuche limitiert. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit alle Versuche mit acht bis zehn Wochen alten Mäusen durchgeführt. Trotzdem kann eine im Verlauf möglicherweise aufgetretene Verminderung der Expression von HDAC1 nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Da anhand der LFB/PAS-Färbung zwar das Ausmaß der Myelinisierung bestimmt werden kann, aber nur bedingt die Unterscheidung zwischen Remyelinisierung und primärer Myelinisierung gelingt (Van der Valk und de Groot 2000), wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Remyelinisierung ist dabei durch eine geringere Myelindicke im Verhältnis zum axonalen Durchmesser, also einer insgesamt höheren G-ratio charakterisiert (Brück et al. 2003). Ein signifikanter Unterschied zwischen den p75^{NTR}-knockout-Mäusen und den Wildtypen nach der Remyelinisierung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigen meine elektronenmikroskopischen Daten, wie erwartet, leicht erhöhte G-ratios sowie dünnere Myelinscheiden in den Experimenten während der Remyelinisierungsphase im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Tieren, wie auch in den Arbeiten von Mason et al. (2001) und Arnett et al. (2002). Auch bestätigen die vorliegenden Daten den Beginn von Remyelinisierungs-Bestrebungen noch unter Cuprizin-Gabe (Gudi et al. 2009): es ergaben sich vergleichbare G-ratio-Werte für beide Gruppen nach sechswöchiger Cuprizin-Gabe und nach einwöchiger Cuprizin-Karenz. Eine

mögliche Ursache, warum die lichtmikroskopischen Tendenzen elektronenmikroskopisch nicht bestätigt werden konnten, mag der kleine Gewebeausschnitt sein, welcher der EM-Untersuchung zugänglich ist.

4.2 Der Einfluss des p75^{NT}-Rezeptors auf die Axonvulnerabilität

4.2.1 Ausmaß des p75^{NTR}-un/abhängigen axonalen Schadens zum Demyelinisierungszeitpunkt

Nach sechswöchiger Cuprizone-Gabe wurde der axonale Schaden durch die zwei Marker APP und Synaptophysin beurteilt. Dabei finden sich APP⁺-axonale Sphäroide vor allem während der Demyelinisierungs-Phase, wie auch die Arbeit von Xie et al. 2010 zeigte.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wiesen während der Demyelinisierung eine vergleichbare Dichte an axonalen Sphäroiden auf, unabhängig von der Expression des p75^{NTR}-Rezeptors (APP: Exp.2 und 3; Syn.: Exp.1-3). Der fehlende Nachweis eines signifikanten Unterschieds könnte auf den insgesamt milden axonalen Schaden unter Cuprizone-Gabe, wie von Stidworthy et al. 2003 sowie Matsushima und Morell 2001 beschrieben, zurückzuführen sein. Dadurch könnten etwaig bestehende Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen möglicherweise nicht erkenntlich geworden sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass der p75^{NTR} keinen Einfluss auf das Ausmaß des axonalen Schadens hat, er also keine axonale Protektion unter Demyelinisierungsbedingungen im Cuprizone-Modell bewirken kann.

Allerdings zeigte ein Experiment (APP: Exp.1), dass es ohne den p75^{NTR} zu einem größeren axonalen Schaden nach der Demyelinisierung kommt. Im Kontext der vorliegenden Arbeit ist dieses Experiment am ehesten als „Ausreißer-Experiment“ anzusehen.

4.2.2 Ausmaß des p75^{NTR}-un/abhängigen axonalen Schadens zum Remyelinisierungszeitpunkt

Auch der axonale Schaden wurde nach einer einwöchigen Remyelinisierungsphase beurteilt. Dabei zeigt die Mehrzahl der jeweils vier Experimentreihen, dass es ohne den p75^{NTR} sowohl in homo- als auch in heterozygoter Ausprägung, zu vermehrtem axonalen Schaden im Vergleich zu den Wildtypen kommt (APP: Exp.1, 2, 4; Syn.: Exp.1, 2).

Interessanterweise war dieser signifikante Unterschied lediglich zum Remyelinisierungszeitpunkt wiederholt nachweisbar, jedoch nicht zum Demyelinisierungszeitpunkt. Eine Vermutung ist daher, dass der Vorgang der Remyelinisierung sich wesentlich stärker auf den axonalen Schaden auswirken könnte bzw. dass Axone in der Remyelinisierungsphase vulnerabler und damit anfälliger für axonale Schädigung sind. Smith (2006) erklärt dies in Bezug auf MS-Läsionen über eine erhöht nachweisbare Konzentration von NO, die über die Behinderung von mitochondrialen Stoffwechselprozessen zu einem reduzierten ATP-Gehalt in Axonen führt. ATP wird von

Axonen zur Aufrechterhaltung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ benötigt, um das während der Depolarisation nach intrazellulär gelangte Na^+ wieder nach extrazellulär zu befördern. Fehlt ATP, steigt die intrazelluläre Natriumkonzentration an, die den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aktiviert und dadurch zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von Ca^{2+} führt, welche zur Aktivierung von Proteasen, zur Zerstörung des axonalen Zytoskeletts und schlussendlich zur axonalen Transektion führt (Bei und Smith 2012; Cambron et al. 2012). Für Smith (2006) führt dieser Mechanismus in MS-Plaques vor allem während der Remyelinisierung zu axonalem Schaden, da es hierbei im Rahmen von Umstrukturierungsprozessen zu einer lokalen Akkumulation von Na^+ -Kanälen kommt und damit zu einer lokal sehr hohen Konzentration von Na^+ bzw. Ca^{2+} , sobald die Axone physiologisch erregt werden. Daher werden derzeit Na^+ -Kanal Blocker, wie Flecainid, Lamotrigen und Phenytoin, in klinischen Studien bei MS-Patienten zur axonalen Protektion eingesetzt. Sobald der Vorgang der Remyelinisierung allerdings beendet ist, stellt diese den besten Schutz vor weiterem axonalem Schaden, bedingt durch zu hohe intrazelluläre Natriumkonzentrationen, dar. Der bei den p75^{NTR} -knockout-Tieren in der Remyelinisierungsphase festgestellte höhere axonale Schaden könnte daher einerseits über eine vermehrte Konzentration von NO bedingt sein. Andererseits basiert eine weitere Hypothese darauf, dass über den p75^{NTR} antioxidative Effekte über die Gewebeexpression eines Transkriptionsfaktors namens Hypoxie-induzierter Faktor-1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α* ; HIF-1 α) vermittelt werden, die einen erhöhten axonalen Schaden bei Abwesenheit des p75^{NT} -Rezeptors erklären würden. Dabei scheint HIF-1 α sowohl über Induktion der Synthese des Signalmoleküls VEGF (*vascular endothelial growth factor*) die Angiogenese im betroffenen Gewebe zu fördern als auch über eine Supprimierung von Entzündungsvorgängen zu wirken (Le Moan et al. 2012). So führt bei Normoxie die Bindung von p75^{NTR} an das Enzym (*ubiquitin-ligase seven in absentia homolog2*) zu ihrer Inaktivierung und damit zum Abbau von HIF-1 α . Unter Hypoxie hingegen wird die γ -Sekretase neurotrophinunabhängig aktiviert und spaltet den intrazellulären Anteil des p75^{NT} -Rezeptors ab. Dies führt ebenfalls zu einer erhöhten Konzentration von Siah2 und damit zu einer Stabilisierung von HIF-1 α . Bei p75^{NTR} -knockout-Mäusen hingegen steht der Transkriptionsfaktor HIF-1 α nicht mehr in diesem Ausmaß zur Verfügung und kann daher nicht zur notwendigen Angiogenese unter dem Auftreten von Hypoxie beitragen. Zusätzlich steht bei Abwesenheit des Neurotrophinrezeptors mit konsekutiv geringerer Expression von HIF-1 α das daran gekoppelte und axonenprotektiv wirkende Erythropoetin (EPO) in geringerem Maße zur Verfügung (Le Moan et al. 2011).

Eine andere Hypothese, die erklären könnte, warum die $p75^{\text{NTR}}$ -knockout-Tiere einen vermehrten axonalen Schaden während der Remyelinisierung aufweisen, bezieht sich auf die Auswirkungen von Cuprizone auf den Leberstoffwechsel. Eine prolongierte Cuprizone-Exposition führt in der Leber zur Bildung von Megamitochondrien und darüber zur Leberschädigung (Kipp et al. 2009). Passino et al. (2007) gelang der Nachweis, dass durch die vermehrte Expression des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors auf geschädigten Hepatozyten deren Regeneration gefördert wird. Den $p75^{\text{NTR}}$ -knockout-Mäusen steht diese Möglichkeit nicht zur Verfügung, sodass sie möglicherweise aufgrund der Cuprizone-induzierten Leberschädigung das bisher aufgenommene Cuprizone nun weniger gut eliminieren können und dieses oder seine Metaboliten somit länger sowohl in der Leber als auch im ZNS wirken können. Dass deutliche Parallelen zwischen Vorgängen im ZNS und in der Leber bestehen, beschreiben auch Schachtrupp et al. 2011. Sie fanden heraus, dass sowohl Astrozyten als auch Hepatozyten den $p75^{\text{NTR}}$ exprimieren. Diese beiden Zellarten sind auch über die Expression von dem Gliafaserprotein (GFAP), einem Zytoskelettbestandteil, für die Narbenbildung im jeweiligen Gewebe verantwortlich.

Insgesamt war lediglich bei einer (APP: Exp.3) bzw. bei zwei (Syn.: Exp.3; Exp.4) der jeweils vier Experimentreihen kein signifikanter Unterschied bzgl. der axonalen Schädigung im Stadium der Remyelinisierung nachweisbar. Daher zeigen die vorliegenden Ergebnisse im Cuprizone-Modell mit diesen Auswertemethoden deutlich, dass es ohne die Expression des $p75^{\text{NT}}$ -Rezeptors während der Remyelinisierung zu einem wesentlich höheren axonalen Schaden im ZNS kommt.

Allerdings legen neue Studien wie die von Schirmer et al. 2012 nahe, dass Synaptophysin-positive Sphäroide nicht nur axonalen Schaden anzeigen, sondern möglicherweise auch indikativ für axonale Regeneration sein können. Daher muss in Betracht gezogen werden, dass die verwendeten Marker nur Hinweise geben und keine singuläre Aussagekraft haben könnten. Des Weiteren wurde bei den von mir untersuchten $p75^{\text{NTR}}$ -knockout-Mäusen dieser Rezeptor sowohl auf Neuronen als auch auf Glia-Zellen im ZNS nicht exprimiert. Im PNS gibt es Hinweise darauf, dass die gliale Expression des $p75^{\text{NTR}}$ die axonale Regeneration über Antagonisierung von NOGO/NGR/LINGO-1 fördern kann, wohingegen sich die Rezeptorexpression auf Neuronen hinderlich auf axonale Regeneration auswirken soll (Zhou X und Li H 2007). Daher könnte es eine Aufgabe zukünftiger Studien sein, diesen Zusammenhang auch im ZNS nachzuweisen.

4.3 Die Bedeutung des p75^{NT}-Rezeptors für die Entzündungsreaktion

4.3.1 Infiltration von CD3⁺-Zellen in Abhängigkeit von der Expression des p75^{NTR} nach der Entmarkung

Die orale Aufnahme von Cuprizone bewirkt eine toxische, aber reversible axonale Demyelinisierung vor allem des Corpus callosum ohne die Beteiligung von T-Zellen (Hiremath et al. 1998; Matsushima und Morell 2001). Daher ist dieses Modell optimal, um Einflüsse des p75^{NT}-Rezeptors hinsichtlich einer Förderung der Migration von T-Zellen in das ZNS zu untersuchen. Trotz intakter Blut-Hirn-Schranke kommt es im Rahmen der axonalen Entmarkung jedoch zu einer eher geringen lokalen Entzündungsantwort (Hiremath et al. 1998). Anhand von immunhistochemischen Färbungen für CD3 habe ich die Anzahl der in die de- bzw. remyelinierten Areale eingewanderten T-Zellen in Abhängigkeit von der An- bzw. Abwesenheit des p75^{NT}-Rezeptors quantifiziert.

Nach sechswöchiger Cuprizone-Gabe stellte ich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Vergleichsgruppen fest (Exp.1-3). Meine Ergebnisse lassen daher darauf schließen, dass die im Rahmen der Demyelinisierung stattfindende Immigration von T-Zellen nicht durch An- bzw. Abwesenheit des p75^{NT}-Rezeptors beeinflusst wird: kein Experiment (Exp.1-3) wies einen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren auf. Allerdings zeigen neueste Studien von Kang et al. 2012, dass die Demyelinisierung im Cuprizone-Modell von der Ausschüttung des inflammatorischen Zytokins IL-17 abhängig zu sein scheint. Dieses wird von CD4⁺-Th₁₇-Helferzellen synthetisiert und trägt über ein entzündliches Milieu zu Oligodendrozytentod und Demyelinisierung bei. Folglich wäre es interessant herauszufinden, ob die Expression des p75^{NTR} Einfluss auf die Synthese von IL-17 hat.

4.3.2 Infiltration von CD3⁺-Zellen in Abhängigkeit von der Expression des p75^{NTR} nach Wiederherstellung der Myelinscheiden

Nach einwöchiger Cuprizone-Pause konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der T-Zellinfiltration zwischen den beiden Vergleichsgruppen in zwei von vier Experimenten festgestellt werden (Exp.1, Exp.4). Zu einer signifikant höheren Dichte von Entzündungszellen bei p75^{NTR}-knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren kam es in zwei Experimenten (Exp.2, Exp.3). Dies unterstützt die Beobachtungen von Copray et al. 2004 im EAE-Modell, bei denen Tiere ohne den p75^{NT}-Rezeptor sowohl eine verstärkte Entzündungsantwort als auch eine Zunahme der klinischen Symptome zeigten. Copray et al. (2004) erklären dies durch die essentielle Rolle des p75^{NT}-Rezeptors zur Aufrechterhaltung der BHS-Integrität und beschreiben zwei mögliche Abläufe: entweder wirkt der p75^{NTR} pro-

apoptotisch auf geschädigte Endothelzellen, sodass diese durch schnellen Ersatz wieder die volle Funktionsfähigkeit der BHS übernehmen können. Im Falle der p75^{NTR}-knockout-Tiere könnte es möglicherweise durch nicht mehr funktionsfähige Endothelzellen zu einer verstärkten Entzündungsreaktion kommen. Eine andere Möglichkeit zielt auf die überlebensfördernde Wirkung des p75^{NT}-Rezeptors nach NGF-Bindung ab. Hierbei kommt es über die geringere Expression von Adhäsionsmolekülen zur verringerten Immigration von Entzündungszellen, d.h. bei p75^{NTR}-knockout-Tieren steht diese adaptive Antwort nicht zur Verfügung, und daraus resultieren dann die verstärkten klinischen Symptome. Eine andere Arbeit von Flügel et al. (2001) wies ebenfalls in der EAE ein reduziertes Entzündungsausmaß durch verringerte Permeabilität der BHS über eine NGF/p75^{NTR}-Bindung allerdings auf peripheren Monozyten nach. Des Weiteren stellte er auch weniger MHC-II-exprimierende Zellen fest, die dadurch zu einer verringerten Anzahl an aktivierten T-Zellen führten (Flügel et al. 2001). Neben NGF scheint auch das Neurotrophin NT-3 durch Bindung an den p75^{NTR} auf Mikroglia-Zellen zu einer geringeren Expression von MHC-II-Molekülen zu führen (Neumann et al. 1998). Der p75^{NTR} scheint also insgesamt im ZNS eher antiinflammatorisch zu wirken.

Allerdings ist derzeit die Meinung verbreitet, dass ein geringes Maß an entzündlicher Aktivität die OPC zur Proliferation anregen und damit die Remyelinisierung fördern kann (Watzlawik et al. 2010) bzw. dass die T-Zellen auch für Krankheitsremission sorgen können (Moalem et al. 1999; Anderton und Liblau 2008). Trotz der nachgewiesenen und teilweise auch gegenläufigen p75^{NTR}-abhängigen Interaktionen, wie Förderung aber auch Inhibierung von Zellwachstum (Blöchl A und Blöchl R 2007; Miller F und Kaplan 2001), Entzündung in MS-Plaques (Akassoglou et al. 2003; Copray et al. 2004), Zellüberleben und Apoptose (Ham et al. 2000; Lee F et al. 2001) bleiben die detaillierten Mechanismen weiter zu erforschen. Dabei scheint auch dem Zeitpunkt der Expression von (Ko)Rezeptoren und Zytokinen eine wichtige Rolle zuzukommen.

5 Zusammenfassung

Charakteristisch für MS sind neben den demyelinisierten Plaques überwiegend in der weißen Substanz auch die teilweise bzw. vollständig ablaufenden Remyelinisierungsvorgänge, welche die Symptomrückbildung zumindest partiell erklären können. Derzeit liegt der Forschungsschwerpunkt auf der Untersuchung der detaillierten Remyelinisierungsmechanismen und ihrer Limitationen, um so die Wiederherstellung der Myelinscheiden gezielt therapeutisch fördern zu können.

Ein etabliertes und reproduzierbares Verfahren zur Untersuchung dieser Re- und Demyelinisierungsvorgänge stellt das Cuprizon-Modell dar, anhand dessen in dieser Arbeit die Vorgänge in An- und Abwesenheit des p75^{NT}-Rezeptors analysiert wurden. Bisherige Studien konnten lediglich im PNS den Nachweis führen, dass die (Wieder)-Expression des p75^{NT}-Rezeptors über eine BDNF/NGF-Bindung die Remyelinisierung nach Entmarkung fördern kann. Um etwaige Parallelen im ZNS nachzuweisen, wurden die vorliegenden Experimente durchgeführt.

Ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass hinsichtlich der Demyelinisierung der p75^{NT}-Rezeptor keine signifikant protektive Rolle zu spielen scheint. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Absetzen des Cuprizons die Tendenz, dass bei Tieren ohne den p75^{NT}-Rezeptor die Remyelinisierung erschwert ablief. Dieser Verlauf konnte sogar für Tiere nachgewiesen werden, die heterozygot für diesen Neurotrophinrezeptor waren.

Anhand der Quantifizierung von APP- sowie Syn.⁺-Sphäroiden erfolgte die Beurteilung des axonalen Schadens. Dabei scheint der p75^{NT}-Rezeptor im ZNS während der Demyelinisierung ebenso weder eine protektive noch eine schädigende Rolle zu spielen. Allerdings zeigte sich während der Remyelinisierungsphase deutlich, dass Tiere ohne den p75^{NT}-Rezeptor einen höheren axonalen Schaden aufwiesen, sowohl in der APP- als auch in der Synaptophysin-Immunhistochemie. Unterstützt wurden diese Daten durch die für den p75^{NT}-Rezeptor heterozygoten Tiere, die selbst bei nur 50%iger Abwesenheit des Rezeptors ebenfalls einen erhöhten axonalen Schaden aufzeigten.

In der vorliegenden Arbeit gelang außerdem der Nachweis, dass CD3⁺-T-Helferzellen in gleichem Maße und unabhängig von der An- oder Abwesenheit des p75^{NT}-Rezeptors während der Demyelinisierung im Cuprizon-Modell detektierbar sind. Zusätzlich ergaben sich Hinweise darauf, dass es ohne den p75^{NT}-Rezeptor zu einer höheren Anzahl von CD3⁺-T-Helferzellen im Rahmen der Remyelinisierung kommt. Dies könnte durch die p75^{NTR}-vermittelte Stabilitätsförderung der BHS bedingt sein.

6 Literaturverzeichnis

- Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L (2003): Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 709–714
- Albert M, Antel J, Brück W, Stadelmann C (2007): Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 17, 129-138
- Althaus H, Kloppner S, Schmidt-Schultz T, Schwartz P (1992): Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. *Neurosci Lett*, 135, 219–223
- Anderton S, Liblau R (2008): Regulatory T cells in the control of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Curr Opin Neurol*, 21, 248–254
- Arnett H, Hellendall R, Matsushima G, Suzuki K, Laubach V, Sherman P, Ting J (2002): The protective role of nitric oxide in a neurotoxicant-induced demyelinating model. *J Immunol*, 168, 427–433
- Ascherio A, Munger K (2010): Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis:a review. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5, 271–277
- Barde Y, Edgar D, Thoenen H (1983): New neurotrophic factors. *Annu Rev Physiol*, 45, 601–612
- Barker P (1998): p75NTR: A study in contrasts. *Cell Death Differ*, 5, 346–356
- Barker P (2004): p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*, 42, 529–533
- Barnett M, Prineas J (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*, 55, 458–468
- Bei F, Smith K (2012): Axonal protection achieved by blockade of sodium/calcium exchange in a new model of ischemia in vivo. *Neuropharmacology*, 63, 405–414
- Bentley C, Lee K (2000): p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci*, 20, 7706–7715
- Bjartmar C, Trapp B (2001): Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis:mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol*, 14, 271–278
- Black J, Liu S, Hains B, Saab C, Waxman S (2006): Long-term protection of central axons with phenytoin in monophasic and chronic-relapsing EAE. *Brain*, 129, 3196–3208
- Blakemore W (1972): Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol*, 1, 413–426
- Blakemore W (1973a): Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. *J Neurol Sci*, 20, 63–72
- Blakemore W (1973b): Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci*, 20, 73–83
- Blakemore W (1974): Remyelination of the superior cerebellar peduncle in old mice following demyelination induced by cuprizone. *J Neurol Sci*, 22, 121–126
- Blakemore W, Keirstead H (1999): The origin of remyelinating cells in the central nervous system. *J Neuroimmunol*, 98, 69–76
- Blöchl A, Blöchl R (2007): A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem*, 102, 289–305
- Blöchl A, Blumenstein L, Ahmadian M (2004): Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci*, 20, 2321–2335
- Bodini B, Cercignani M, Khaleeli Z, Miller D, Ron M, Penny S, Thompson A, Ciccarelli O (2012): Corpus callosum damage predicts disability progression and cognitive dysfunction in primary-progressive MS after five years. *Hum Brain Mapp*, doi: 10.1002/hbm.21499. [Epub; zuletzt geprüft am 10.10.2012]
- Bothwell M (1995): Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 18, 223–253
- Bourdette D, Whitham R (2010): Immunotherapy and multiple sclerosis: The devil is in the details. *Neurology*, 74, 1410–1411
- Bradl M, Lassmann H (2010): Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119, 37–53

- Brown B (2009): Natalizumab in the treatment of multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag*, 5, 585–594
- Brück W, Stadelmann C (2005): The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol*, 18, 221–224
- Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003): Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 206, 181–185
- Burnett R, Guichard Y, Barale E (1997): Immunohistochemistry for light microscopy in safety evaluation of therapeutic agents: an overview. *Toxicology*, 119, 83–93
- Cambron M, D'Haeseleer M, Laureys G, Clinckers R, Debruyne J, Keyser J de (2012): White-matter astrocytes, axonal energy metabolism, and axonal degeneration in multiple sclerosis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32, 413–424
- Capello E, Mancardi G (2004): Marburg type and Baló's concentric sclerosis: rare and acute variants of multiple sclerosis. *Neurol Sci*, 25, 361–363
- Carter B, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Böhm-Matthaei R, Baeuerle P, Barde Y (1996): Selective activation of NF- κ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*, 272, 542–545
- Casaccia-Bonnel P, Carter B, Dobrowsky R, Chao M (1996): Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*, 383, 716–719
- Chan J, Jolicoeur C, Yamauchi J, Elliott J, Fawcett J, Ng B, Cayouette M (2006): The polarity protein Par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science*, 314, 832–836
- Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp B (2000): NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, 20, 6404–6412
- Chao M (2003): Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 4, 299–309
- Chaudhuri A, Behan P (2004): Multiple sclerosis is not an autoimmune disease. *Arch Neurol*, 61, 1610–1612
- Chen S, Wang Y, Fan H, Lo W, Wang C, Sytwu H (2012): Current status of the immunomodulation and immunomediated therapeutic strategies for multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol*, 1–16
- Chetty R, Gatter K (1994): CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *J Pathol*, 173, 303–307
- Compston A (1999): The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354, 1623–1634
- Confavreux C, Vukusic S (2006): Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain*, 129, 595–605
- Confavreux C, Aimard G, Devic M (1980): Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain*, 103, 281–300
- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000): Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343, 1430–1438
- Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P (2003): Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*, 126, 770–782
- Copray S, Kust B, Emmer B, Lin M, Liem R, Amor S, Vries H, Floris S, Boddeke E (2004): Deficient p75 low-affinity neurotrophin receptor expression exacerbates experimental allergic encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *J Neuroimmunol*, 148, 41–53
- Copray J, Kust B, Mantingh-Otter I, Boddeke H (2005): p75NTR independent oligodendrocyte death in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 31, 600–609
- Cosgaya J, Chan J, Shooter E (2002): The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science*, 298, 1245–1248
- Courtney A, Castro-Borrero W, Davis S, Frohman T, Frohman E (2011): Functional treatments in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 24, 250–254
- Dechant G, Barde Y (2002): The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*, 5, 1131–1136
- Delank H; Gehlen W: Neurologie. 11. Auflage. Stuttgart; Thieme, Stuttgart 2006

- Delpech B, Lichtblau E (1972): [Immunochemical estimation of IgG and albumin in cerebrospinal fluid]. *Clin Chim Acta*, 37, 15–23
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie: DGN/KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. AWMF online 2012, zuletzt geprüft am 10.10.2012
- Dhib-Jalbut S (2002): Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*, 58, 3–9
- Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, Hilaire M, Mellado W, Chao M, Filbin M (2005): MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, 46, 849–855
- Dubois-Dalq M, Ffrench-Constant C, Franklin R (2005): Enhancing central nervous system remyelination in multiple sclerosis. *Neuron*, 48, 9–12
- Dutta R, Trapp B (2007): Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology*, 68, 22–31
- Dyment D, Ebers G, Sadovnick A (2004): Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 3, 104–110
- Ebers G (2008): Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 7, 268–277
- Fauchais A, Lalloue F, Lise M, Boumediene A, Preud'homme J, Vidal E, Jauberteau M (2008): Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol*, 181, 3027–3038
- Ferguson B, Matyszak M, Esiri M, Perry V (1997): Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*, 120, 393–399
- Filippi M, Rocca M, Barkhof F, Bruck W, Chen J, Comi G, De Lucq G, De Stefano N, Erickson B, Evangelou N, et al. (2012): Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 11, 349–360
- Flügel A, Matsumuro K, Neumann H, Klinkert W, Birnbacher R, Lassmann H, Otten U, Wekerle H (2001): Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol*, 31, 11–22
- Franklin R, Ffrench-Constant C (2008): Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci*, 9, 839–855
- Friedman W, Greene L (1999): Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res*, 253, 131–142
- Frohman E, Racke M, Raine C (2006): Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*, 354, 942–955
- Galetta K, Calabresi P, Frohman E, Balcer L (2011): Optical coherence tomography (OCT): imaging the visual pathway as a model for neurodegeneration. *Neurotherapeutics*, 8, 117–132
- Gbadamosi J, Buhmann C, Tessmer W, Moench A, Haag F, Heesen C (2003): Effects of mitoxantrone on multiple sclerosis patients' lymphocyte subpopulations and production of immunoglobulin, TNF-alpha and IL-10. *Eur Neurol*, 49, 137–141
- Genain C, Cannella B, Hauser S, Raine C (1999): Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*, 5, 170–175
- Gentleman S, Nash M, Sweeting C, Graham D, Roberts G 1993: Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett*, 160, 139–144
- Gentry J, Casaccia-Bonofil P, Carter B (2000): Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J Biol Chem*, 275, 7558–7565
- Giovannoni G, Cutter G, Lunemann J, Martin R, Munz C, Sriram S (2006): Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 5, 887–894
- Goodin D (2008): Disease-modifying therapy in multiple sclerosis: update and clinical implications. *Neurology*, 71, 8–13
- Gu C, Casaccia-Bonofil P, Srinivasan A, Chao M (1999): Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci*, 19, 3043–3049
- Gudi V, Moharreggh-Khiabani D, Skripuletz T, Koutsoudaki P, Kotsiari A, Skuljec J, Trebst C, Stangel M (2009): Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Res*, 1283, 127–138

- Hafler D (2004): Multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 113, 788–794
- Ham J, Eilers A, Whitfield J, Neame S, Shah B (2000): c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 60, 1015–1021
- Harrington A, Kim J, Yoon S (2002): Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci*, 22, 156–166
- Hartung H, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey S, Krapf H, Zwingers T (2002): Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet*, 360, 2018–2025
- Havla J, Kumpfel T, Hohlfeld R (2012): [2012:Update on diagnosis and treatment of multiple sclerosis]. *Dtsch Med Wochenschr*, 137, 894–899
- Hemmer B, Archelos J, Hartung H (2002): New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 3, 291–301
- Hempstead B (2002): The many faces of p75^{NTR}. *Curr Opin Neurobiol*, 12, 260–267
- Hickey W (2001): Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia*, 36, 118–124
- Hirata H, Hibasami H, Yoshida T, Ogawa M, Matsumoto M, Morita A, Uchida A (2001): Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves. *Glia*, 36, 245–258
- Hiremath M, Saito Y, Knapp G, Ting J, Suzuki K, Matsushima G (1998): Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*, 92, 38–49
- Hogancamp W, Rodriguez M, Weinshenker B (1997): The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc*, 72, 871–878
- Hohlfeld R, Wekerle H (2001): Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 14, 299–304.
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H (2006): The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Neurol Sci*, 27, 1–7
- Howell J, Blakemore W, Gopinath C, Hall G, Parker J (1974): Chronic copper poisoning and changes in the central nervous system of sheep. *Acta Neuropathol*, 29, 9–24
- Huang E, Reichardt L (2001): Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24, 677–736
- Huijbregts S, Kalkers N, Sonnevile L de, Groot V de, Polman C (2006): Cognitive impairment and decline in different MS subtypes. *J Neurol Sci*, 245, 187–194.
- Huynh H, Oger J, Dorovini-Zis K (1995): Interferon-beta downregulates interferon-gamma-induced class II MHC molecule expression and morphological changes in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 60, 63–73
- Irvine K, Blakemore W (2006): Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*, 175, 69–76
- Irvine K, Blakemore W (2008): Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain*, 131, 1464–1477
- Kalman B, Lublin F (1999): The genetics of multiple sclerosis. A review. *Biomed Pharmacother*, 53, 358–370
- Kang Z, Liu L, Spangler R, Spear C, Wang C, Gulen M, Veenstra M, Ouyang W, Ransohoff R, Li X (2012): IL-17-induced Act1-mediated signaling is critical for cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci*, 32, 8284–8292
- Keegan B, Noseworthy J (2002): Multiple sclerosis. *Annu Rev Med*, 53, 285–302
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal V, Misgeld T, Klinkert W, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle R, Bartke I et al. (1999): Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*, 189, 865–870
- Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R (2003): Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol*, 53, 292–304
- Kesselring J: Multiple Sklerose. 4. Auflage. Kohlhammer W, Stuttgart 2004

- Kesterson J, Carlton W (1970): Aqueductal stenosis as the cause of hydrocephalus in mice fed the substituted hydrazine, cuprizone. *Exp Mol Pathol*, 13, 281–294
- Khan F, Amatya B, Turner-Stokes L (2011): Symptomatic therapy and rehabilitation in primary progressive multiple sclerosis. *Neurol Res Int*, 2011, 1–22
- Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano P, Chao M (2001): A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci*, 21, 5854–5863
- Kingwell E, Koch M, Leung B, Isserow S, Geddes J, Rieckmann P, Tremlett H (2010): Cardiotoxicity and other adverse events associated with mitoxantrone treatment for MS. *Neurology*, 74, 1822–1826
- Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009): The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*, 118, 723–736
- Kobayashi N, Fan D, Giehl K, Bedard A, Wiegand S, Tetzlaff W (1997): BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and α -tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci*, 17, 9583–9595
- König F, Wildemann B, Nessler S, Zhou D, Hemmer B, Metz I, Hartung HP, Kieseier B, Brück W (2008): Persistence of immunopathological and radiological traits in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 65, 1527–1532
- Kornek B, Storch M, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H (2000): Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol*, 157, 267–276
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*, 125, 2202–2212
- Kuhlmann T, Goldschmidt T, Antel J, Wegner C, König F, Metz I, Brück W (2009): Gender differences in the histopathology of MS? *J Neurol Sci*, 286, 86–91
- Kurtzke J (2008): Historical and clinical perspectives of the expanded disability status scale. *Neuroepidemiology*, 31, 1–9
- Lad S, Peterson D, Bradshaw R, Neet K (2003): Individual and combined effects of TrkA and p75^{NTR} nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *J Biol Chem*, 278, 24808–24817
- Ladiwala U, Lachance C, Simoneau S, Bhakar A, Barker P, Antel J (1998): p75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes: signaling without cell death in response to NGF. *J Neurosci*, 18, 1297–1304
- Lassmann H (1999): The pathology of multiple sclerosis and its evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354, 1635–1640
- Lee F, Kim A, Khursigara G, Chao M (2001): The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 281–286
- Lee K, Li E, Huber L, Landis S, Sharpe A, Chao M, Jaenisch R (1992): Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*, 69, 737–749
- Lee KF, Davis AM, Jaenisch R (1994): p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development*, 120, 1027–1033
- Lee M, Blamire A, Pendlebury S, Ho K, Mills K, Styles P, Palace J, Matthews P (2000): Axonal injury or loss in the internal capsule and motor impairment in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 57, 65–70
- Lewin G, Barde Y (1996): Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 19, 289–317
- Le Moan N, Baeza-Raja B, Akassoglou K (2012): p75 (NTR) and hypoxia: A breath of fresh air in neurotrophin receptor signaling. *Cell Cycle*, 11, 829–830
- Le Moan N, Houslay D, Christian F, Houslay M, Akassoglou K (2011): Oxygen-dependent cleavage of the p75 neurotrophin receptor triggers stabilization of HIF-1 α . *Mol Cell*, 44, 476–490
- Li W, Penderis J, Zhao C, Schumacher M, Franklin R (2006): Females remyelinate more efficiently than males following demyelination in the aged but not young adult CNS. *Exp Neurol*, 202, 250–254
- Liebetanz D, Merkler D (2006): Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 202, 217–224

- Lightman S, McDonald W, Bird A, Francis D, Hoskins A, Batchelor J, Halliday A (1987): Retinal venous sheathing in optic neuritis. Its significance for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain*, 110, 405–414
- Lindner M, Heine S, Haastert K, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Grothe C, Baumgärtner W, Stangel M (2008): Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34, 105–114
- Losseff N, Wang L, Lai H, Yoo D, Gawne-Cain M, McDonald W, Miller D, Thompson A (1996): Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis. A serial MRI study. *Brain*, 119, 2009–2019
- Lu B, Pang P, Woo N (2005): The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*, 6, 603–614
- Lublin F, Reingold S (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46, 907–911
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, 47, 707–717
- Lucchinetti C, Bruck W, Noseworthy J (2001): Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment. *Curr Opin Neurol*, 14, 259–269
- Martin R (2010): Multiple sclerosis: closing in on an oral treatment. *Nature*, 464, 360–362
- Mason J, Langaman C, Morell P, Suzuki K, Matsushima G (2001): Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27, 50–58
- Matsushima G, Morell P (2001): The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*, 11, 107–116
- Matthews P, Stefano N de, Narayanan S, Francis G, Wolinsky J, Antel J, Arnold D (1998): Putting magnetic resonance spectroscopy studies in context: axonal damage and disability in multiple sclerosis. *Semin Neurol*, 18, 327–336
- McDonnell G, Hawkins S (2002): Primary progressive multiple sclerosis: increasing clarity but many unanswered questions. *J Neurol Sci*, 199, 1–15
- McFarland H, Martin R (2007): Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*, 8, 913–919
- McMahon E, Suzuki K, Matsushima G (2002): Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier. *J Neuroimmunol*, 130, 32–45
- McTigue D, Horner P, Stokes B, Gage F (1998): Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 18, 5354–5365
- Metz I, Lucchinetti C, Openshaw H, Garcia-Merino A, Lassmann H, Freedman M, Atkins H, Azzarelli B, Kolar O, Brück W (2007): Autologous haematopoietic stem cell transplantation fails to stop demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Brain*, 130, 1254–1262
- Miller D, Chard D, Ciccarelli O (2012): Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol*, 11, 157–169
- Miller F, Kaplan D (2001): Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1045–1053
- Milligan N, Newcombe R, Compston D (1987): A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: I. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 50, 511–516
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen I, Schwartz M (1999): Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*, 5, 49–55
- Morell P, Barrett C, Mason J, Toews A, Hostettler J, Knapp G, Matsushima G (1998): Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci*, 12, 220–227
- Mulisch M; Welsch U (Hrsg.): *Romeis: Mikroskopische Technik*. 18. Auflage. Heidelberg; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010
- Murray T (2006): Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *BMJ*, 332, 525–527
- Nakahara J, Aiso S, Suzuki N (2010): Autoimmune versus oligodendroglial pathology: the pathogenesis of multiple sclerosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 58, 325–333

- Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R (2001): Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*, 56, 702–708
- Neuhaus O, Wiendl H, Kieseier B, Archelos J, Hemmer B, Stuve O, Hartung H (2005): Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro. *J Neuroimmunol*, 168, 128–137
- Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H (1998): Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5779–5784
- Niehaus A, Shi J, Grzenkowski M, Diers-Fenger M, Archelos J, Hartung H, Toyka K, Brück W, Trotter J (2000): Patients with active relapsing-remitting multiple sclerosis synthesize antibodies recognizing oligodendrocyte progenitor cell surface protein: implications for remyelination. *Ann Neurol*, 48, 362–371
- Noseworthy J (1999): Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature*, 399, A40-7
- Noseworthy J, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker B (2000): Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343, 938–952
- Nykjaer A, Lee R, Teng K, Jansen P, Madsen P, Nielsen M, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow T et al. (2004): Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, 427, 843–848
- Nylander A, Hafler D (2012): Multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 122, 1180–1188
- Okajima S, Mizoguchi A, Masutani M, Tomatsuri M, Tamai K, Hirasawa Y, Ide C (1993): Synaptophysin immunocytochemistry in the regenerating sprouts from the nodes of Ranvier in injured rat sciatic nerve. *Brain Res*, 631, 133–136
- Oksenberg J, Barcellos L, Hauser S (1999): Genetic aspects of multiple sclerosis. *Semin Neurol*, 19, 281–288
- Orton S, Herrera B, Yee I, Valdar W, Ramagopalan S, Sadovnick A, Ebers G (2006): Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*, 5, 932–936
- Pasquini L, Calatayud C, Bertone Una A, Millet V, Pasquini J, Soto E (2007): The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res*, 32, 279–292
- Passino M, Adams R, Sikorski S, Akassoglou K (2007): Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science*, 315, 1853–1856
- Pearce J (2005): Neuromyelitis optica. *Spinal Cord*, 43, 631–634
- Peterson J, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp B (2001): Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 50, 389–400
- Petratos S, Azari M, Ozturk E, Papadopoulos R, Bernard C (2010): Novel therapeutic targets for axonal degeneration in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 323–334
- Petratos S, Gonzales M, Azari M, Marriott M, Minichiello R, Shipham K, Profyris C, Nicolaou A, Boyle K, Cheema S et al. (2004): Expression of the low-affinity neurotrophin receptor, p75(NTR), is upregulated by oligodendroglial progenitors adjacent to the subventricular zone in response to demyelination. *Glia*, 48, 64–75
- Pohl H, Porcheri C, Mueggler T, Bachmann L, Martino G, Riethmacher D, Franklin R, Rudin M, Suter U (2011): Genetically induced adult oligodendrocyte cell death is associated with poor myelin clearance, reduced remyelination, and axonal damage. *J Neurosci*, 31, 1069–1080
- Polman C, Reingold S, Banwell B, Clanet M, Cohen J, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L et al. (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69, 292–302
- Ramagopalan S, Dyment D, Ebers G (2008): Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends Neurosci*, 31, 645–652
- Rhen T, Cidlowski J (2005): Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, 353, 1711–1723
- Rosenberg S, Ng B, Chan J (2006): The quest for remyelination: a new role for neurotrophins and their receptors. *Brain Pathol*, 16, 288–294
- Roux P, Colicos M, Barker P, Kennedy T (1999): p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J Neurosci*, 19, 6887–6896

- Rovaris M, Filippi M, Minicucci L, Iannucci G, Santuccio G, Possa F, Comi G (2000): Cortical/subcortical disease burden and cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 21, 402–408
- Sadovnick A, Dyment D, Ebers G (1997): Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Epidemiol Rev*, 19, 99–106
- Sargsyan S, Shearer A, Ritchie A, Burgoon M, Anderson S, Hemmer B, Stadelmann C, Gattenlöhner S, Owens G, Gildea D et al. (2010): Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 74, 1127–1135
- Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer C, Patsopoulos N, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt S et al. (2011): Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476, 214–219
- Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice G, Muraro P, Daumer M, Ebers G (2010): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*, 133, 1914–1929
- Schachtrup C, Le Moan N, Passino M, Akassoglou K (2011): Hepatic stellate cells and astrocytes: Stars of scar formation and tissue repair. *Cell Cycle*, 10, 1764–1771
- Schäffler N, Kopke S, Winkler L, Schippling S, Inglese M, Fischer K, Heesen C (2010): Accuracy of diagnostic tests in multiple sclerosis--a systematic review. *Acta Neurol Scand*, 124, 151–164
- Schirmer L, Merkler D, König F, Brück W, Stadelmann C (2012): Neuroaxonal Regeneration is More Pronounced in Early Multiple Sclerosis than in Traumatic Brain Injury Lesions. *Brain Pathol*, doi: 10.1111/j.1750-3639.2012.00608.x. [Epub; zuletzt geprüft am 10.10.2012]
- Scholtz C (1977): Quantitative histochemistry of myelin using Luxol Fast Blue MBS. *Histochem J*, 9, 759–765
- Sharief M (1998): Cytokines in multiple sclerosis: pro-inflammation or pro-remyelination? *Mult Scler*, 4, 169–173.
- Sharrer T (2007): The First Black 6:C57BL/6J. *Scientist*, 21, 84
- Shen S, Sandoval J, Swiss V, Li J, Dupree J, Franklin R, Casaccia-Bonnel P (2008): Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. *Nat Neurosci*, 11, 1024–1034
- Siffrin V, Vogt J, Radbruch H, Nitsch R, Zipp F (2010): Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy. *Trends Neurosci*, 33, 202–210
- Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M (2008): Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol*, 172, 1053-1061
- Smith K (2006): Axonal protection in multiple sclerosis--a particular need during remyelination? *Brain*, 129, 3147–3149
- Snider W (1994): Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, 77, 627–638
- Song X, Zhou F, Zhong J, Wu L, Zhou X (2006): Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. *J Neurochem*, 96, 833–842
- Stadelmann C, Brück W (2008): Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis. *J Neurol*, 255, 12–18
- Stadelmann C, Ludwin S, Tabira T, Guseo A, Lucchinetti C, Leel-Ossy L, Ordinario A, Brück W, Lassmann H (2005): Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Balo's type of multiple sclerosis. *Brain*, 128, 979–987
- Stadelmann C, Albert M, Wegner C, Brück W (2008): Cortical pathology in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 21, 229–234
- Stangel M, Hartung H (2002): Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*, 68, 361–376
- Steinman L (2001): Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol*, 2, 762–764
- Stidworthy M, Genoud S, Suter U, Mantei N, Franklin R (2003): Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Brain Pathol*, 13, 329–339
- Sudhof T (1995): The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 375, 645–653

- Syroid D, Maycox P, Soilu-Hanninen M, Petratos S, Bucci T, Burrola P, Murray S, Cheema S, Lee KF, Lemke G et al. (2000): Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. *J Neurosci*, 20, 5741–5747
- Thoenen H (1995): Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 270, 593–598
- Thompson A, Polman C, Miller D, McDonald W, Brochet B, Filippi M, Sa J de (1997): Primary progressive multiple sclerosis. *Brain*, 120 (Pt 6), 1085–1096
- Tomita K, Kubo T, Matsuda K, Fujiwara T, Yano K, Winograd J, Tohyama M, Hosokawa K (2007): The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury. *Glia*, 55, 1199–1208
- Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L, Garaci E (1996): Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell*, 85, 345–356
- Torkildsen O, Brunborg L, Myhr K, Bo L (2008): The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl*, 188, 72–76
- Trapp B, Bo L, Mork S, Chang A (1999): Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol*, 98, 49–56
- van der Valk P, Groot C de (2000): Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26, 2–10
- Villoslada P, Hauser S, Bartke I, Unger J, Heald N, Rosenberg D, Cheung S, Mobley W, Fisher S, Genain C (2000): Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. *J Exp Med*, 191, 1799–1806
- Vucic S, Burke D, Kiernan M (2010): Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms and management. *Clin Neurophysiol*, 121, 809–817
- Wang D, Ayers M, Catmull D, Hazelwood L, Bernard C, Orian J (2005): Astrocyte-associated axonal damage in pre-onset stages of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, 51, 235–240
- Watzlawik J, Warrington A, Rodriguez M (2010): Importance of oligodendrocyte protection, BBB breakdown and inflammation for remyelination. *Expert Rev Neurother*, 10, 441–457
- Weibel D, Kreutzberg G, Schwab M (1995): Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve. *Brain Res*, 679, 249–254
- Weinshenker B, O'Brien P, Petterson T, Noseworthy J, Lucchinetti C, Dodick D, Pineda A, Stevens L, Rodriguez M (1999): A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol*, 46, 878–886
- Wergeland S, Torkildsen O, Myhr K, Mork S, Bo L (2012): The cuprizone model: regional heterogeneity of pathology. *APMIS*, 120, 648–657
- Wiedenmann B, Franke W (1985): Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, 41, 1017–1028
- Woo N, Teng H, Siao C, Chiaruttini C, Pang P, Milner T, Hempstead BL, Lu B (2005): Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*, 8, 1069–1077
- Xie M, Tobin J, Budde M, Chen C, Trinkaus K, Cross A, McDaniel D, Song S, Armstrong R (2010): Rostrocaudal analysis of corpus callosum demyelination and axon damage across disease stages refines diffusion tensor imaging correlations with pathological features. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 704–716
- Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M (2002): The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol*, 157, 565–570
- Yoon S, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao M (1998): Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci*, 18, 3273–3281
- Zarkou S, Carter J, Wellik K, Demaerschalk B, Wingerchuk D (2010): Are corticosteroids efficacious for preventing or treating neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with beta-interferons?: A critically appraised topic. *Neurologist*, 16, 212–214
- Zhang J, Luo X, Xian C, Liu Z, Zhou X (2000): Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci*, 12, 4171–4180

Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Bruck W, Hartung H, Stadelmann C, Hemmer B (2006): Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19057–19062

Zhou X, Li H (2007): Roles of glial p75NTR in axonal regeneration. *J Neurosci Res*, 85, 1601–1605

Danksagung

Ganz besonders möchte ich Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler für ihre Ideen und Anregungen, aber vor allem für ihre Mühe und Geduld danken. Sie war jederzeit erreichbar, und ihr außerordentliches Engagement durfte ich anhand ihrer zahlreichen Hilfestellungen kennen lernen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Tobias Dallenga für die sehr gute Betreuung und die Möglichkeit für Rückfragen bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen anderen Doktoranden bedanken, die ich während meiner Zeit in der Neuropathologie kennen lernen durfte.

Auch geht mein Dank an das gesamte MTA-Team der Neuropathologie, vor allem Frau Brigitte Maruschak, für die geduldige Einführung in die histologischen Färbemethoden.