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

## Einfluss des Wachstumsfaktors *Fibroblast Growth Factor 9* auf die Remyelinisierung im Cuprizon-Modell der Multiplen Sklerose

#### INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Frederic Michaelsen geb. Diesing

aus

Herford

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Kroemer

- I. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Stadelmann-Nessler
- II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Reuss
- III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2014

# **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleit	ung	5
	1.1 Mu	Itiple Sklerose	5
	1.1.1	Epidemiologie	5
	1.1.2	Klinik und Verlauf	6
	1.1.3	Pathogenese und Ätiologie	7
	1.2 Das	s Cuprizon-Modell der De- und Remyelinisierung	9
	1.3 Rei	nyelinisierung	9
	1.3.1	Histopathologie der Remyelinisierung	10
	1.3.2	Differenzierung von Oligodendrozyten in der ZNS-Entwicklung	10
	1.3.3	Ablauf der Remyelinisierung	11
	1.3.4	Ursachen für das Scheitern von Remyelinisierung	12
	1.3.4	4.1 Faktoren, die Proliferation und Differenzierung beeinflussen	12
	1.3.4	1.2 Inflammatorisches Milieu	13
	1.3.4	1.3 Zeitliche Faktoren	14
	1.4 Fib	roblast Growth Factor 9	15
	1.4.1	FGF-9 Expression und Wirkung im ZNS	15
	1.4.2	Einfluss von FGF-9 auf Oligodendrozyten und deren Vorläufer	15
	1.4.3	Einfluss von FGF-9 auf Remyelinisierung	16
	1.5 Fra	gestellung	16
2	Mater	ial und Methoden	17
	2.1 Tie	rexperimente	17
	2.1.1	Versuchstiere und Haltung	17
	2.1.2	Cuprizonfütterung	17
	2.1.3	Stereotaktische Injektion	18
	2.2 Gev	webeasservierung	19
	2.2.1	Transkardiale Perfusion	19
	2.2.2	Paraffineinbettung	19
	2.3 His	tologische Techniken – Lichtmikroskopie	20
	2.3.1	Hämatoxylin-Eosin	20
	2.3.2	LFB/PAS-Färbung	21
	2.3.3	Versilberung nach Bielschowsky	21
	2.3.4	Immunhistochemische Färbungen	22
	2.3.4	4.1 Indirekte Biotin-Avidin-Methode	22
	2.3.4	4.2 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode	23
	2.3.5	In-Situ-Hybridisierung	24
	2.4 His	tologische Techniken – Elektronenmikroskopie	29

	2.5	Histologische Quantifizierung3	32
	2.	5.1 Lichtmikroskopie	32
	2.	5.2 Elektronenmikroskopie	32
	2.6	Statistische Auswertung	33
3	Er	gebnisse	34
	3.1	Darstellung der FGF-9-Injektionen3	34
	3.2	Einfluss der Injektionen auf die Axondichte	35
	3.3	Einfluss von FGF-9 auf die Zellteilungsaktivität3	36
	3.4	Einfluss von FGF-9 auf die Dichte der Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ) 3	37
	3.5	Einfluss von FGF-9 auf die Dichte reifer Oligodendrozyten	39
	3.6	Einfluss von FGF-9 auf die Remyelinisierung4	<b> 1</b>
4	Di	skussion4	4
	4.1	Studienlage4	4
	4.2	Ergebnisse und Deutung4	ł5
	4.3	Kritische Evaluation4	ŀ7
	4.4	Schlussfolgerung und Ausblick4	<b>8</b>
5	Zu	isammenfassung5	60
6	Lit	teraturverzeichnis5	51
7	Ab	okürzungsverzeichnis5	;9

## 1 <u>Einleitung</u>

## **1.1 Multiple Sklerose**

Multiple Sklerose (MS) ist eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche bei Menschen mit genetischer Suszeptibilität über einen unbekannten Trigger in der Umwelt zu einer autoimmun vermittelten Demyelinisierung führt. Dabei ist die Zielstruktur der autoimmunen Reaktionen bisher unbekannt (Noseworthy et al. 2000).

#### 1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland sind etwa 120.000 Menschen in der MS-Behandlung. Dabei scheint die Prävalenz in Deutschland mit ca. 150 auf 100.000 Einwohner (Hein und Hopfenmuller 2000) über dem europäischen Niveau (83 auf 100.000 Einwohner (Pugliatti et al. 2006)) zu liegen.

In Europa wird weiterhin ein Gefälle von Norden nach Süden, mit höheren Prävalenzen in skandinavischen Ländern, beschrieben (Pugliatti et al. 2006). Eine strenge Abhängigkeit vom Breitengrad mit einem generellen Nord-Süd-Gradienten, wie in älteren Daten beschrieben (Kurtzke 1977), scheint jedoch zumindest auf der Nordhalbkugel fraglich (Zivadinov et al. 2003).

Ein starker Zusammenhang zwischen Herkunft der Erkrankten und Auftreten von MS ist dagegen anzunehmen. Demnach sind weiße Europäer und deren Nachkommen stärker betroffen als afrikanische und orientalische Ethnien (Hogancamp et al. 1997). Für eine genetisch modulierende Ätiologie spricht auch, dass es innerhalb der kaukasischen Hochrisikogruppe abgeschlossenere Gesellschaften, wie etwa die Samen in Norwegen gibt, deren MS-Prävalenzrate deutlich unter den für diese Region zu erwartenden Zahlen liegt (Gronlie et al. 2000). Außerdem ist in Familien mit einem erkrankten Elternteil das Risiko, an MS zu erkranken, für die Kinder dazu passend erhöht (Sadovnick et al. 2000).

Auch nach einem Umweltfaktor-vermittelten Krankheitsauslöser wird gesucht. Als Indiz hierfür gilt, dass z.B. pakistanische und indische Migranten in Großbritannien ein erhöhtes MS-Risiko aufwiesen, wenn sie vor dem 15. Lebensjahr in das Vereinigte Königreich einwanderten. Hier liegt die Prävalenz deutlich höher, als jene in ihrem genetischen Herkunftsland Indien bzw. Pakistan (Dean und Elian 1997).

Weltweit ist es in den letzten Jahren zu einem Anstieg der MS-Inzidenz und -Prävalenz gekommen (Koch-Henriksen und Sorensen 2010), bei einer stärker ungleichen

Geschlechterverteilung zu Ungunsten von Frauen. Das Verhältnis Frauen zu Männer lag in Thüringen zwischen 1998 und 2002 bei 3,3:1 (Fasbender und Kolmel 2008). Der Altersgipfel zu Beginn der Erkrankung wird bei 30 Jahren gesehen, wobei eine Zunahme der Patienten unter 18 Jahren vermutet wird (Chitnis 2006).

#### 1.1.2 Klinik und Verlauf

Entsprechend den interindividuell verschiedenen zentralen Läsionen bietet die MS eine große Bandbreite neurologischer Symptome. Je nach Lokalisation der Läsionen treten folgende Symptome auf: Bei Läsionen im Großhirn kommt es zu kognitiven Beeinträchtigungen, wie verminderter Konzentrationsfähigkeit, und zu Störungen des Affekts. Durch Läsionen am Nervus opticus resultieren Visusverlust und Skotom. Läsionen im Kleinhirn verursachen Tremor, Gangstörung und Dysarthrie. Im Hirnstamm führen betroffene Bereiche zu Diplopie, Nystagmus und Schluckbeschwerden. Auf Rückenmarksebene folgen den Läsionen Muskelschwäche, schmerzhafte Spasmen, Miktionsstörungen, erektile Dysfunktion und Obstipation. Des Weiteren treten schlechter zuzuordnende Beschwerden, wie Schmerzen. Abgeschlagenheit (Fatigue) und Obstipation, auf. Als charakteristisch wird eine Verschlechterung der Symptome bei Erhöhung der Körpertemperatur sowie bei körperlicher Anstrengung (Uhthoff-Phänomen) angesehen (Compston und Coles 2002).

Multiple Sklerose kann klinisch in Subgruppen unterteilt werden, die z.T. ineinander übergehen und daher oft erst im Verlauf abgrenzbar sind.

Initial erleben 80% der MS-Patienten einen schubförmig remittierenden Verlauf (relapsing remitting MS: RRMS), bei dem es zu freien Intervallen (>30 Tage) zwischen den schubförmig auftretenden Symptomen (Dauer >24 Stunden) kommt. In der zweiten Hauptpatientengruppe (10-20%) fehlt dieser Rückgang der Symptome, sodass diese Form als primär progredient (primary progressive MS: PPMS) bezeichnet wird. Aus der ersten Gruppe der RRMS treten bei längerem Krankheitsverlauf stetig mehr Patienten in einen sekundär-progredienten Verlauf (secondary progressive MS: SPMS) ein. Letztendlich erkranken somit 80% im Sinne dieses sich stetig verschlechternden Beschwerdeverlaufs. Weitere Subtypen werden derzeit nur als Varianten der oben genannten Gruppen beschrieben (Bitsch und Brück 2002).

Die Hauptpatientengruppen lassen sich in Bezug auf Prognose und Therapieansprechen unterscheiden. So ist die Immunsystem-modulierende Therapie bei höherer Progredienz ineffektiver, also schlechter bei SPMS als bei RRMS und vergleichsweise ineffektiv bei PPMS. Die PPMS hat zudem einen höheren Altersgipfel, betrifft eher Männer, weist mehr Läsionen im Rückenmark auf (Thompson 2004) und hat eine geringere Lebenserwartung. Das Gesamtkollektiv der MS-Kranken weist eine geringfügig erhöhte Mortalität im Vergleich zur gesunden Bevölkerung auf (Ragonese et al. 2008).

Noch vor Erfüllung internationaler Kriterien der Diagnosestellung der MS (Polman et al. 2005) kommt es bei 80% der Patienten zu einem klinisch-isolierten Syndrom (clinically isolated syndrome: CIS) (Compston und Coles 2002). Das häufigste isolierte Merkmal ist dabei die Neuritis des Nervus opticus (Uitdehaag et al. 2005).

#### 1.1.3 Pathogenese und Ätiologie

Auf der Suche nach Auslösern von MS lässt sich durch die Erkenntnisse epidemiologischer Daten (s.o.) sowohl auf genetische als auch auf Umweltfaktoren schließen.

Ein höheres Erkrankungsrisiko weisen Träger einiger HLA-Varianten (DR-15 (Willer et al. 2007), DQ6, DW2 (Kalman und Lublin 1999), HLA-DR2 (Haines et al. 1998)) sowie einiger Allele (Interleukin-2 und -7 Rezeptor (Hafler et al. 2007) auf.

Dazu werden bis heute unidentifizierte Infektionen in der frühen Adoleszenz als Krankheitsauslöser postuliert (Kurtzke 1993). Andere Autoren formulieren ein leicht erhöhtes MS-Risko nach Impfungen gegen Hepatitis B (Geier und Geier 2005). Gleiches gilt in Populationen mit durchlaufenen viralen (EBV) (Tzartos et al. 2012) oder bakteriellen Infektionen (Chlamydia pneumoniae) (Marrie 2004).

Beide Ansätze könnten das Bild einer genetisch-bedingten Suszeptibilität in Verbindung mit spezifischen Umweltfaktoren, die verspätet zum Ausbruch der MS führen, verfestigen. Jedoch gilt die Ätiologie der MS ob des Fehlens eines genaueren und unumstrittenen Konzepts weiterhin als ungeklärt.

Pathophysiologisch ergaben Studien an menschlichen MS-Läsionen und Tiermodellen, allen voran der EAE (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) an Mäusen und Ratten, dass es sich um eine autoimmun vermittelte Krankheit handelt (Lassmann 2008). Dabei wird angenommen, dass sich autoreaktive T-Zellen gegen Myelinproteinbestandteile wie Myelin-Basisches Protein (MBP), Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), Proteolipid Protein (PLP), aB-Crystallin, Phosphodiesterasen und S-100 Protein im ZNS richten (Noseworthy et al. 2000). Wie sie mit diesen Antigenen, die sie physiologisch im inaktivierten Zustand nicht erreichen können, in Kontakt kommen, ist unklar. Vermutet wird eine Kreuzreaktion im peripheren Immunsystem von CD4-positiven T-Zellen mit mikrobiellen Bestandteilen, die nach dem Konzept der molekularen Mimikry aktiviert werden könnten (Korn 2008).

Innerhalb der CD4-positiven Gruppe der T-Effektorzellen wurde auf Grund der IFN-γ-Sekretion zunächst vor allem eine Th1-vermittelte Immunantwort angenommen. Des Weitern werden auch Th17-Zellen, welche bevorzugt IL-17 sezernieren, verantwortlich gemacht (Lassmann et al. 2007; Korn 2008).

Gegenüber der Anzahl an CD4-positiven T-Zellen fällt die klonale Expansion von CD8positiven T-Zellen in den Läsionen stärker aus. Sie scheinen einen regulierenden Einfluss auf die inflammatorischen Prozesse zu haben (Lassmann 2008), wenngleich ihnen möglicherweise über die Sezernierung von Perforin und die direkte Initiierung von Apoptose über den FAS-Ligand auch ein Einfluss auf die Destruktion von Parenchymzellen und Axonen zukommt (Brück 2005 b). CD4-positive regulatorische T-Zellen scheinen ebenfalls steuernden Einfluss auf das Entzündungsgeschehen zu nehmen (Costantino et al. 2008).

Neben der Aktivierung von Lymphozyten kommt es zu einer Fehlfunktion der Blut-Hirn-Schranke, welche die Invasion von weiteren Leukozyten in das geschützte ZNS-Kompartiment ermöglicht und zeitlich mit dem Auftreten von Läsionen assoziiert ist (McQuaid et al. 2009). Sowohl Rekrutierung als auch der Permeabilitätsdefekt werden durch ein Übergewicht der proinflammatorischen Zytokine der Th1-Zellen (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) gegenüber antiinflammatorischen Zytokinen (IL-10, IFN- $\beta$ , IL-4) verursacht. Dies und weitere beschriebene Faktoren, wie z.B. Metalloproteasen, führen zu einer Veränderung der Zellverbindungen (Tight junctions und Adhärenskontakte) der zerebralen endothelialen Zellen (Minagar und Alexander 2003).

Die aktivierten, ins ZNS eingedrungenen Makrophagen sind höchstwahrscheinlich maßgeblich für die Gewebsdestruktion verantwortlich (Lucchinetti et al. 1999). Sie betreiben Phagozytose und zerstören mit Hilfe von Proteasen, zytotoxischen Zytokinen, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies Myelinscheiden, Oligodendrozyten und Axone. Sie sezernieren außerdem Osteopontin, welches Mikroglia, Makrophagen und Neurone aktiviert, proinflammatorische Zytokine induziert, Monozyten-Rekrutierung stimuliert und T-Zell-Apoptose inhibiert (Lassmann 2008).

Auch die humorale, antikörpervermittelte B-Zell-Aktivität scheint sowohl über Opsonierung für phagozytierende Zellen als auch über Komplementaktivierung Myelindestruktion zu initiieren (Racke 2008).

Darüber hinaus werden neurodegenerative Prozesse, wie oxidativer Stress und Exzitotoxizität, als Schädigungsmechanismem für Oligodendrozyten, Neurone und Axone diskutiert, welche durch aktivierte Mikroglia initiiert werden (Matute et al. 2001; Gonsette 2008)

Histopathologisch zeigen sich somit charakteristische Läsionen mit Infiltration von Entzündungszellen, Demyelinisierung und Zerstörung von Axonen sowie Gliose (Brück 2005 b). Der Name Multiple Sklerose kommt also von den zahlreichen in der weißen Substanz gelegenen Läsionen, die im Verlauf durch die Gliose sklerosieren (Kurtzke 1993). Genauso zeigen sich jedoch bei über 90% der Patienten Läsionen in der grauen Substanz, auch wenn diese schwieriger zu detektieren sind und ihre Pathogenese noch ungeklärt ist (Wegner C und Stadelmann 2009).

Frühe MS-Läsionen zeigen pathologische Unterschiede auf, die auf verschiedene immunologische Mechanismen in unterschiedlichen Patienten oder Erkrankungsstadien

schließen lassen und nicht den klinischen Subtypen entsprechen (Brück 2005 b). Dies könnte eine gezieltere und damit effektivere Therapie, je nach Erkrankungsmuster, möglich machen (Brück 2005 a).

#### 1.2 Das Cuprizon-Modell der De- und Remyelinisierung

Cuprizon (Biscyclohexanonoxaldihydrazon) ist ein Kupferchelator. Bei der Fütterung von C57BL/6-Mäusen mit 0,2-prozentigem Cuprizon kommt es zu Demyelinisierung, nachzuweisen vor allem im Corpus callosum, Kleinhirn und Cortex. Wahrscheinlich kommt es zu einer Störung von Kupfer-abhängigen Enzymen in Mitochondrien, was die adäquate Energieversorgung der Zellen behindert und so zur Auslösung von Apoptose führt. Dabei ist ungeklärt, was Oligodendrozyten in dieser Hinsicht im Speziellen vulnerabel macht (Matsushima und Morell 2001). Ultrastrukturell kommt es zu vergrößerten Mitochondrien (Megamitochondrien) in Oligodendrozyten und zu deren Untergang, wohingegen Axone und Neurone nicht beschädigt werden (Acs und Komoly 2012). Betroffen sind dabei insbesondere reife Oligodendrozyten (Benardais et al. 2013).

Noch unter dem Einfluss von Cuprizon kommt es zur Rekrutierung und Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ). Wird das Futter abgesetzt, kommt es rasch zur Remyelinisierung (Blakemore 1973; Matsushima und Morell 2001).

Im Vergleich zu anderen MS-Modellen entstehen die Läsionen also toxinvermittelt und nicht durch eine primäre immunologische Reaktion. Es kommt nicht zu einem zerebralen Trauma, und die Blut-Hirn-Schranke bleibt intakt (Chari 2007). Da neuere Studien von frühen MS-Läsionen den Untergang von Oligodendrozyten noch vor der Demyelinisierung und einer breiten autoimmunen Reaktion zeigen, erscheint das Cuprizon-Modell als MS-Tiermodell für die Analyse dieses Aspekts der MS geeignet (Acs und Kalmann 2012).

### 1.3 Remyelinisierung

Die schon während der Demyelinisierung beginnende Remyelinisierung von durch die Entzündungsreaktion entmantelten Axonen gilt als charakteristisches Merkmal der MS und zeigt sich in akuten und, wenn auch weniger ausgeprägt, in älteren chronischen Läsionen (Goldschmidt et al. 2009).

Entmarkte Axone zeichnen sich nicht nur durch den Verlust der schnellen Fortleitung aus (Waxman 2006). Die nicht von neuem von Oligodendrozyten mit Myelin umhüllten Nervenzellfortsätze sind zudem der inflammatorischen Immunreaktion stärker ausgesetzt (Brück 2005 b), sei es durch die unmittelbare Attacke von CD8-positiven T- Zellen oder durch den Ausfall einer lokalen neurotrophen Funktion durch die Gliazellen (Rodriguez 2003). Der Grad des Untergangs dieser Axone korreliert mit dem Krankheitsverlauf der MS (Lassmann 2008). So geht verminderter axonaler Schaden auch mit verbesserter Klinik einher (Stadelmann und Brück 2008), und Remyelinisierung könnte die klinische Verbesserung unterstützen (Brück 2005 b).

#### 1.3.1 Histopathologie der Remyelinisierung

Remyelinisierte Areale unterscheiden sich von der normal erscheinenden weißen Substanz durch dünnere Myelinscheiden, verkürzte Internodien und verbreiterte Ranviersche Schnürringe (Patrikios et al. 2006). Sie bestehen aus axonalen Gruppierungen, die von dünnen, unregelmäßig angeordneten Myelinscheiden umgeben sind. Vollständig myelinisierte Markschattenherde (shadow plaques) sind im Vergleich zur normal erscheinenden weißen Substanz blasser und ihr gegenüber scharf begrenzt. Unvollständig remyelinisierte Läsionen weisen neugebildetes Myelin an den Randbereichen auf.

Jüngere und inflammatorisch aktive Läsionen unterscheiden sich von älteren sowohl durch eine höhere Anzahl an Makrophagen als auch durch reife Oligodendrozyten, die effektiv Myelinproteine produzieren sowie durch myelinisierende Oligodendrozyten, die PLP-mRNA exprimieren (Brück et al. 2003). Auch in älteren Läsionen liegen, allerdings deutlich reduziert, OVZ vor. Diese sind zwar zum Teil auch in der Lage, Remyelinisierung zu betreiben, jedoch wesentlich weniger ausgeprägt und begrenzt auf die Läsionsränder (Patrikios et al. 2006). Reife Nogo-A-positive Oligodendroglia fehlen in älteren Läsionen (Kuhlmann et al. 2008).

#### 1.3.2 Differenzierung von Oligodendrozyten in der ZNS-Entwicklung

Remyelinisierungsvorgänge zu verstehen, können Erkenntnisse Um der Oligodendrozytenentwicklung, welche an in-vitro- und in-vivo-Experimenten an Säugern gemacht wurden, herangezogen werden. Die Differenzierung von Oligodendrozyten wird in Stadien beschrieben, die durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen charakterisiert sind. Die Identifizierung erfolgt durch stadienabhängig Markerproteine Transkriptionsfaktoren, die in und der oligodendroglialen Abstammungslinie exprimiert werden. Im Folgenden ist nur eine Auswahl der wichtigsten Marker genannt; dabei wird der Schwerpunkt auf die in dieser Arbeit benutzten Marker gelegt.

Die multipotenten OVZ entstehen in der subventrikulären Zone aus neuroektodermalen Stammzellen und sind durch die Expression des Proteoglykans NG-2 zu identifizieren (Polito und Reynolds 2005). Einer der frühesten Marker der oligodendroglialen Abstammungslinie ist Olig-2. Innerhalb dieser Abstammungslinie wird Olig-2 permanent exprimiert, jedoch auf der Stufe von OVZ maximal (Wegner M 2001). Die OVZ proliferieren und migrieren im gesamten ZNS. Nach der Migration in Bereiche der zukünftigen weißen Substanz gelten sie als Präoligodendrozyten, die den Marker O4 exprimieren. Diese werden zu unreifen Oligodendrozyten, die GalC exprimieren. Mit dem Beginn der Expression von Myelinproteinen, wie MBP und PLP, werden sie als reife Oligodendrozyten angesehen, die allerdings erst im weiteren Verlauf zu Myelinbildenden Oligodendrozyten differenzieren (Baumann und Pham-Dinh 2001).



Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Entwicklung der Oligodendrozyten wird eingeteilt in OVZ (oligodendrozyte progenitors), Präoligodendrozyten (preoligodendrozyte), unreife Oligodendrozyten (immature oligodendrozytes), reife Oligodendrozyten - die nicht myelinisieren (non-myelinating mature oligodendrozytes) und reife Oligodendrozyten,die myelinisieren (myelinating mature oligodendrozytes). In den Kästen sind die Marker der jeweiligen Entwicklungsstufe aufgeführt (Baumann und Pham-Dinh 2001, S. 874).

#### 1.3.3 Ablauf der Remyelinisierung

Es wird davon ausgegangen, dass Oligodendrozyten, die nach einem demyelinisierenden Ereignis Axone erneut mit Myelin umhüllen, von einwandernden OVZ abstammen (Windrem et al. 2004), obwohl es bisher nicht gelungen ist, überlebende OVZ in den Läsionen von aus der Umgebung rekrutierten OVZ zu unterscheiden (Chari 2007). Nicht am Remyelinisierungsprozess beteiligt sind in Läsionen überlebende, ausdifferenzierte Oligodendrozyten, da sie nicht mehr teilungsfähig sind (Keirstead und Blakemore 1997). Auf Rückenmarksebene, am Eintrittspunkt der Nervenwurzeln, wurden auch Schwannzellen als Myelin-bildende Zellen im Rahmen der Remyelinisierung identifiziert (Itoyama et al. 1983).

OVZ liegen als NG-2-positive Zellen im erwachsenen ZNS ubiquitär vor (Polito und Reynolds 2005). Auf demyelinisierende Ereignisse reagierende OVZ sind zudem durch die starke Expression von Olig-2 zu identifizieren (Fancy et al. 2004; Polito und Reynolds 2005). Diese könnten außerdem aus neuralen Stammzellen aus der subventrikulären Zone entstehen (Menn et al. 2006).

Der Remyelinisierungsprozess kann, ähnlich den aus der Oligodendrozyten-Entwicklung bekannten Differenzierungsstufen (siehe 1.3.2), in zwei Phasen eingeteilt werden. In der Rekrutierungsphase proliferieren und besiedeln OVZ die entmarkten Herde. In der Differenzierungsphase stellen diese Zellen Kontakt zu freiliegenden Axonen her, um dann zu Myelin-produzierenden Oligodendrozyten zu reifen (Chari 2007).

Reife Oligodendrozyten sind in der Lage, Myelinproteine, wie Myelin-Basisches Protein (MBP), zu produzieren (Bansal 2002) und können durch die immunhistochemische Anfärbung von Nogo-A bzw. durch In-Situ-Hybridisierung von PLP mRNA identifiziert werden (Kuhlmann et al. 2007).

#### 1.3.4 Ursachen für das Scheitern von Remyelinisierung

Die Entwicklung von Vorläuferzellen zu remyelinisierenden Oligodendrozyten kann durch verschiedene Faktoren gehemmt bzw. gefördert werden. Erfolgreiche Remyelinisierung findet unter diesen Einflüssen offenbar nur in einer idealen Signalumgebung statt. Im Sinne einer "Dysregulationshypothese" scheitert die Remyelinisierung dann, wenn einzelne oder, wahrscheinlicher, mehrere positive Einflüsse fehlen (Franklin 2002).

#### 1.3.4.1 Faktoren, die Proliferation und Differenzierung beeinflussen

Entsprechend den zwei Reifungsphasen (s.o.) können Faktoren, die auf die Proliferation wirken, von denen, die auf die Differenzierung der unreifen Oligodendrozyten wirken, unterschieden werden. Einige Faktoren können beide Prozesse beeinflussen.

Der Wachstumsfaktor *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), welcher von Neuronen und Astrozyten sezerniert wird, beeinflusst überwiegend die Proliferation von OVZ (Redwine und Armstrong 1998; Murtie et al. 2005). Auch der *Glial Growth Factor 2* (GGF2) scheint über Proliferationsstimulierung Remyelinisierung zu begünstigen (Marchionni et al. 1999).

Zu den die Differenzierung beeinflussenden Faktoren zählt der *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2) und sein Rezeptor auf Oligodendrozyten. Beide werden auch in demyelinisierten Regionen vermehrt gebildet, jedoch wird hier eine hemmende Wirkung angenommen (Murtie et al. 2005). *Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ ) als Chemokin wird in Kulturen von OVZ gebildet und hat eine hemmende Wirkung auf die Proliferation anderer OVZ, wirkt jedoch fördernd auf die Differenzierung zu

Oligodendrozyten (McKinnon et al. 1993). Unter den Semaphorinen, die zuvor vor allem aufgrund der Beeinflussung von axonalem Wachstum bekannt wurden, inhibiert Semaphorin 3A die OVZ-Differenzierung (Syed et al. 2011). LINGO-1 (*Leucine Rich Repeat And Ig Domain Containing Nogo Receptor Interacting Protein 1*) gilt als Differenzierungsinhibitor. Antikörper gegen dieses Transmembranprotein fördern in Mausmodellen die Differenzierung und Remyelinisierung von Oligodendrozyten (Mi et al. 2009). Auch Transkriptionsfaktoren könnten eine wichtige Rolle bei der Unterstützung der Differenzierung von Oligodendrozyten übernehmen. So fehlt etwa Knockout-Mäusen für den Transkriptionsfaktor Olig-1 diese Fähigkeit (Arnett et al. 2004).

Um mögliche Ansatzpunkte in diesem System ausfindig zu machen, stellt sich die Frage, ob es einen Punkt im Verlauf der zweiphasig beschriebenen Entwicklung der Oligodendrozyten gibt, der überwiegend für das Versagen der Remyelinisierung verantwortlich zu machen ist.

Im Mausmodell zeigte sich, dass die allgemeine Verfügbarkeit von oligodendrozytären Vorläuferzellen nicht maßgebend für den Erfolg von Remyelinisierung ist. So konnte gezeigt werden, dass nach experimenteller Reduktion von OVZ diese Remyelinisierungsherde neu besiedeln können (Woodruff et al. 2004) (Chari und Blakemore 2002).

Untersuchungen an menschlichem Gewebe zeigten, dass in frühen Läsionen viele differenzierende OVZ vorliegen. Im Vergleich dieser mit älteren chronischen Läsionen fehlen hier vor allem ausdifferenzierte Oligodendrozyten. Daraus lässt sich schließen, dass es in chronischen MS-Läsionen vor allem durch einen Differenzierungsblock zum Scheitern der Remyelinisierung kommt (Kuhlmann et al. 2008).

#### 1.3.4.2 Inflammatorisches Milieu

Entzündungsreaktionen, verursachen sie doch zunächst das Problem, bieten paradoxerweise gleichzeitig ideale Bedingungen für eine effektive Remyelinisierung.

In frühen und aktiv myelinisierenden Läsionen findet sich eine Fülle von aktivierten Makrophagen sowie CD3- und CD8-positive T-Zellen (Dubois-Dalcq et al. 2008). Die Abwesenheit von Leukozyten, inflammatorischen Zytokinen und Makrophagen beeinträchtigt die Remyelinisierung. Dies wäre dann möglicherweise auch für antiinflammatorische Therapien der Fall (Chari 2007).

Möglich sind Einflüsse von immunmodulierenden Botenstoffen, die membrangebunden oder sezerniert von T-Zellen oder Makrophagen gebildet werden. Als Beispiel sei der *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), der von T-Zellen gebildet wird, genannt. Ihm konnte ein protektiver Effekt auf die durch TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose von Oligodendroyzten nachgewiesen werden (Vanderlocht et al. 2006).

Eine zentrale Rolle könnte den Funktionen von Makrophagen zukommen. Sie können erstens evtl. fördernde Wachstumsfaktoren produzieren und sezernieren (Lassmann 2008) und zweitens die durch Demyelinisierung entstandenen Myelintrümmer phagozytieren. Diesen wiederum konnte eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung von Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Kotter et al. 2005; Kotter et al. 2006).

#### 1.3.4.3 Zeitliche Faktoren

Ob Remyelinisierung erfolgreich ist, scheint auch von zeitlichen Faktoren abhängig zu sein.

Es ist belegt, dass jüngere Patienten mit optischer Neuritis schnellere klinische Verbesserungen zeigen. Gleichzeitig ist bekannt, dass ältere Mäuse in MS-Modellen langsamer remyelinisieren. Bei Tieren wurde hierbei eine verminderte Rekrutierung und Differenzierung von OVZ festgestellt und ebenfalls ein veränderter Wachstumsfaktoreinfluss als Ursache vermutet (Franklin et al. 2002; Sim et al. 2002). Von Untersuchungen an menschlichen Geweben ist bekannt, dass die Dichte an OVZ in den Läsionen mit dem Alter der Patienten und der Länge der Krankheitsdauer abnimmt und im übrigen mit einer verminderten Dichte von Makrophagen einhergeht (Wolswijk 2002).

Auch im Vergleich der multifokalen Läsionen innerhalb eines Individuums finden sich Unterschiede, die mit dem Alter ihres Bestehens einhergehen. Die Myelinisierungsaktivität der Oligodendrozyten ist hier, wie oben bereits erwähnt, in älteren Läsionen geringer. Obgleich OVZ vor Ort sind, werden sie nicht aktiv (Stadelmann und Brück 2008; Goldschmidt et al. 2009).

Die Erkenntnis, dass Remyelinisierung in jüngeren Läsionen effizienter stattfindet, deckt sich mit dem positiven Einfluss der inflammatorischen Umgebung in diesen frühen Läsionen. Als eine mögliche morphologische Verbindung zeigt sich zudem, dass in älteren Läsionen eine höhere Konzentration von Myelinablagerungen gefunden wurde, welche die Differenzierung von Oligodendrozyten hemmen. Diese würden in aktiveren Bereichen durch Makrophagen, wie oben beschrieben, schneller abgebaut (Ibanez et al. 2004).

Dies ist Teil der Hypothese, nach der es im zeitlichen Verlauf der Entwicklung einer Entzündungsreaktion in einer Läsion ein enges "Fenster der Möglichkeiten" (von engl. *"window of opportunity"*) gibt. In diesem Zeitraum könnte das Milieu für die Reifung von Oligodendroglia, von Proliferation und Differenzierung zu aktiv myelinisierenden Zellen ideal sein (Kotter et al. 2011).

Andere Autoren sprechen von einer fehlenden zeitlichen Übereinstimmung zwischen dem Vorhandensein einer die Remyelinisierung begünstigenden Umgebung und dem

15

Eintreffen rekrutierter Oligodendrozyten, was auch erklären würde, warum sich Remyelinisierung in älteren Läsionen auf die Läsionsränder beschränkt (Chari 2007).

## **1.4** Fibroblast Growth Factor 9

FGF-9 gehört zur Gruppe der *Fibroblast Growth Factors*. Diese wird zu den Heparin bindenden Wachstumsfaktoren gezählt (Naruo et al. 1993). In der FGF-Familie sind bisher 23 Faktoren bekannt, die unterschiedlich auf vier verschiedene Rezeptoren (FGFR-1 bis FGFR-4) sowie weitere Korezeptoren wirken können und in der Entwicklung sowie auch im erwachsenen ZNS exprimiert werden (Green et al. 1996; Cohen und Chandross 2000; Fortin et al. 2005).

Die Rezeptoren für FGFs (FGFR) werden auf Neuronen, Astrozyten sowie auf Oligodendrozyten und deren Vorläufern gefunden. Letztere zeigen je nach Reifungsgrad unterschiedliche Expressionsmuster der einzelnen Rezeptortypen. So exprimieren OVZ vermehrt FGFR-3 und FGFR-1 und vermindert FGFR-2, wohingegen differenzierende Oligodendrozyten gegensätzlich dazu vermehrt FGFR-2 und vermindert FGFR-3 exprimieren (Bansal 2002; Fortin et al. 2005). FGFR-2 gilt als der hauptsächliche Rezeptor auf reifen Oligodendrozyten und Myelin (Cohen und Chandross 2000).

## 1.4.1 FGF-9 Expression und Wirkung im ZNS

FGF-9 wurde als *Glia Activating Factor* (GDGF), der das Wachstum von Oligodendrozyten und Astrozyten-Vorläuferzellen stimuliert, zuerst aus menschlichem Glioblastomgewebe identifiziert (Naruo et al. 1993). Nachfolgend wurden für FGF-9 neurotrophe und neuroprotektive Wirkungen beschrieben (Kanda et al. 1999; Huang et al. 2009).

Exprimiert und sezerniert wird FGF-9 vor allem von Neuronen (Kanda et al. 1999). In Gliagewebe wurde eine deutlich schwächere immunhistochemische Anfärbung von Zellen mit Antikörpern gegen FGF-9 gefunden (Nakamura et al. 1997; Todo et al. 1998). Gezeigt wurde dies insbesondere für Astrozyten und Oligodendrozyten in Rattengewebe (Nakamura et al. 1999).

### 1.4.2 Einfluss von FGF-9 auf Oligodendrozyten und deren Vorläufer

Es wird vermutet, dass die Verfügbarkeit von Faktoren der FGF-Familie sowie die Expression bzw. die Stimulation ihrer Rezeptoren steuernden Einfluss auf die Entwicklung von OVZ zu myelinisierenden Oligodendrozyten haben (Bansal 2002; Fortin et al. 2005).

Stimulation von Oligodendrozyten-Zellkulturen mit FGF-9 zeigte die folgenden Ergebnisse: FGF-9 kann FGFR-2 und FGFR-3 aktivieren. Dies führt bei reifen Oligodendrozyten über den FGFR-2 zu vermehrtem Wachstum von Membranen und Fortsätzen (Fortin et al. 2005). Differenzierende Oligodendrozyten regulieren FGFR-2 herunter und FGFR-1 hoch (Cohen und Chandross 2000; Bansal 2002).

#### 1.4.3 Einfluss von FGF-9 auf Remyelinisierung

Oligodendrogliale Zellkulturen, die mit FGF-9 versetzt wurden, zeigten eine verminderte Expression der Myelinproteine CNP (*Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase*), MBP und PLP (Cohen und Chandross 2000). Dies wurde für die Proteine MBP, PLP und MOG (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*) dosisabhängig bestätigt. Auch wenn die Zellen zwar weiterhin Kontakt zu nicht myelinisierten Axonen aufnehmen konnten, wurde kein kompaktes Myelin gebildet (Linington et al. 2011, unveröffentliche Daten)

Die Microarray-Studien von Mohan und Meinl verglichen die FGF-9-Expression von de- gegenüber remyelinisierten Bereichen in MS-Läsionen. Es stellte sich eine Hochregulation von FGF-9 in demyelinisierten Arealen heraus (Mohan und Meinl 2011, unveröffentliche Daten).

Zusammenfassend wird in der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion ein Zusammenhang zwischen vermehrter FGF-9-Expression und dem Scheitern von Remyelinisierung diskutiert.

## 1.5 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von FGF-9 auf die Remyelinisierung von C57BL/6 Mäusen im Cuprizon-Modell. Die Analyse fokussierte sich auf folgende Aspekte:

Kommt es durch FGF-9 zu einer Beeinflussung der Proliferation von OVZ während der Remyelinisierung?

Verläuft die Differenzierung von OVZ zu myelinisierenden Oligodendrozyten unter dem Einfluss von FGF-9 abweichend?

Wie fällt der Remyelinisierungserfolg bei Tieren mit FGF-9 Injektionen im Corpus callosum im Vergleich zu Kontrollen aus?

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Tierexperimente

#### 2.1.1 Versuchstiere und Haltung

In der vorliegenden Arbeit wurden männliche C57BL/6-Mäuse verwendet.

Die Experimente wurden unter gleichen Bedingungen an 2 verschiedenen Mauspopulationen von Frau Dr. Claudia Wrzos durchgeführt. Die Tiere des ersten Experiments wurden bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bestellt. Die Mäuse des 2. Experiments kamen aus der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland.

Die Mäuse wurden in einem 12-stündig wechselnden Tag-Nacht-Zyklus gehalten, wobei Wasser und Futter ad libitum angeboten wurden. Die Experimente wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Oldenburg genehmigt.

#### 2.1.2 Cuprizonfütterung

Zur Induktion einer Entmarkung im Bereich des Corpus callosum wurde Cuprizon (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) entsprechend anteilig (2,5g/1kg) mit pulverisiertem Alleinfutter für Ratten- und Mäusehaltung (SSNIFF Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) vermischt und an die Versuchsgruppen verfüttert.

Die Mäuse bekamen über 6 Wochen Futter mit 0,25% Cuprizon. Darunter erfolgte eine regelmäßige klinische Kontrolle durch Wiegen der Tiere. Bei einer Gewichtsabnahme von mehr als 25% wurden die Tiere aus dem Versuch genommen. Im 1. Experiment wurde der Cuprizon-Anteil auf 0,2% des Futters reduziert, um die Toxizität zu verringern.

Nach der stereotaktischen Injektion (siehe 2.1.3) wurde den Tieren bis zu ihrem Tod, also dem Tag der Perfusion, Normalfutter ohne Cuprizon gereicht.

	Injektion: PBS / FGF-9	Perfusion	Perfusion
	ŧ	ŧ	ŧ
6 Wochen	_	3 Tage	6 Tage
Cuprizondiät	Cup	rizon-fre	ie Diät

**Abbildung 2.1 Schema des Versuchsaufbaus.** Zur Induzierung der Demyelinisierung wurden die Mäuse 6 Wochen lang mit Cuprizon gefüttert. Der Verumgruppe wurde anschließend FGF-9 stereotaktisch in den Balken injiziert, die Kontrollgruppe bekam PBS injiziert. Alle Tiere erhielten ab diesem Zeitpunkt eine Cuprizon-freie Diät. Das Experiment endete bei der einen Hälfte der Tiere mit der transkardialen Perfusion 3 Tage nach stereotaktischer Injektion und unter Normalfutter, bei der anderen Hälfte nach 6 Tagen.

#### 2.1.3 Stereotaktische Injektion

FGF-9 wurde mittels stereotaktischer Injektion in den Balken appliziert.

Zur Anästhesie bekamen die Tiere ein Ketamin-Xylazin-Gemisch intraperitoneal injiziert (100µl/10g KG entsprechend der Dosierung Ketamin 120mg/kg KG und Xylazin 20mg/kg KG).

Nach Ausbleiben einer Schmerzreaktion wurden die Augen mit Bepanthen Augensalbe geschützt. Die rasierte Haut über dem Schädel wurde mittels Skalpell geöffnet und die Mäuse unter Atemkontrolle im Stereotakt (Stoelting Europe, Dublin, Ireland) an Kiefer und Scheitelbein fixiert.

Für die folgenden Schritte wurde ein Binokular (Olympus SZ 51, Hamburg, Deutschland) mit Lampe (Olympus KL 1500, Hamburg, Deutschland) benutzt.

Der Schädel wurde 0,01 mm posterior auf der anterio-posterioren Achse und 0,1 mm lateral auf der medio-lateralen Achse mit Bezug auf den Schnittpunkt zwischen Sagittalund Frontalnaht markiert. An dieser Stelle wurde mit einem Zahnarztbohrer (KaVo Elektronisches Werk Typ 4911, Leutkirch, Deutschland) eine kleine Öffnung gebohrt, bis nur noch eine dünne Schicht des Schädelknochens übrig blieb. Diese wurde mittels eines Mikrodissektionsskalpells vorsichtig abgetragen. 1µl der Injektionslösungen (PBS oder FGF-9: 100ng/µl) wurde stereotaktisch mit Hilfe einer Mikropipette (Blaubrand, Wertheim, Deutschland) 1,5mm tief in das Corpus callosum injiziert. Um die Injektionsstelle später identifizieren zu können, wurde der Injektionslösung jeweils Monastral Blue beigefügt.

Schließlich wurde die Haut zugenäht und den Tieren zur Analgesie 0,03mg/kg KG Buprenorphin intraperitoneal injiziert.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Ketamin	Medistar Arzneimittel-Vertrieb Gmbh, Ascheberg, Deutschland
Xylazin	Riemser Arzneimittel AG, Greifswald – Insel Riems, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Monastral-Blue	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Rekombinantes humanes FGF-9	R&D, Minneapolis, USA
Buprenorphin	Essex Pharma, München, Deutschland

Tabelle 2.1 Verwendete Substanzen: Tierexperiment

## 2.2 Gewebeasservierung

#### 2.2.1 Transkardiale Perfusion

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis 14% iger Chloralhydratlösung, die intraperitoneal (300µl) appliziert wurde, anästhesiert. Nach Ausbleiben einer Schmerzreaktion wurde bis auf das Herz präpariert. Dann wurde neben der Herzspitze punktiert, eine Kanüle in die linke Kammer gelegt sowie das rechte Atrium eröffnet. Der so eröffnete Blutkreislauf wurde an eine Pumpe mit 23ml/min Fluss angeschlossen. Bis zur vollständigen Blutentleerung des Kreislaufes wurde zunächst mit PBS und anschließend, zur Fixierung, mit 4% Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Die Gehirne wurden 2 Tage in Paraformaldehyd nachfixiert.

#### 2.2.2 Paraffineinbettung

Die fixierten Proben wurden in PBS gespült und zugeschnitten. Die Gewebe wurden über Nacht im Excelsor ES (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingebettet und in der alkoholischen Reihe wie folgt dehydriert: 50-, 70-, 90- und 100% iger Alkohol für je 1min. Anschließend wurden die Gewebeproben am Shandon Histocentre 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Paraffin gegossen.

Tubble 2.2 verwendete Substalizen. Gewebeasservierung					
Bezeichnung	Bezugsquelle				
Perchloratlösung 14%	Merck, Darmstadt, Deutschland				
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland				

Tabelle 2.2 Verwendete Substanzen: Gewebeasservierung

## 2.3 Histologische Techniken – Lichtmikroskopie

Die Paraffinblöcke wurden für eine halbe Stunde bei -12°C abgekühlt. Anschließend wurden am Schlittenmikrotom (SM 2000R Leica, Wetzlar, Deutschland) unter Wärmeausdehnung 1-2µm dicke Frontalschnitte erstellt. Diese wurden zuerst in Aqua dest. gelegt und dann auf Objektträger aufgetragen. Zur Antrocknung des Gewebes an den Objektträgern wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C gelagert.

Für die histochemischen Färbungen wurden die Objektträger bei 60°C für eine Stunde abgeschmolzen und anschließend, sofern unten nicht gesondert beschrieben, durch eine absteigende alkoholische Reihe, wie folgt, entparaffiniert und rehydriert: 4x10min Xylol, 1x3min Xylol + Isopropylalkohol, 2x3min 100% Alkohol, 1x3min 90%, 1x3min 70% Alkohol, 1x3min 50% Alkohol, Aqua dest.. Ausnahme ist die Vorbereitung zur Luxol-fast-blue/Perjodsäure-Schiff'sches Reagenz (LFB/PAS)-Färbung bei der die Alkoholreihe nach der 90% igen Alkohollösung beendet wurde.

Zur Konservierung wurde am Ende der jeweiligen Färbungen in der aufsteigenden alkoholischen Reihe mit 50-, 70-, 90- und 100% igem Alkohol für je 1 min dem Gewebe Wasser entzogen und die Proben schließlich mit DePeX bzw. Immu-Mount eingedeckelt.

### 2.3.1 Hämatoxylin-Eosin

Basophile Strukturen wie Zellkerne und deren DNA (Nukleinsäuren) sowie Ribosomen (v.a. raues endoplasmatisches Retikulum) werden durch Hämalaun blau angefärbt. Azidophile Strukturen wie Zellplasmaproteine werden mit Eosin rot angefärbt.

Bei dieser Prozedur wurden die Schnitte für 8min in Mayers Hämalaun-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Zur Differenzierung wurde nachfolgend 1% iger HCl-Alkohol benutzt. Das anschließende Eintauchen der Schnitte in Leitungswasser bewirkte eine Erhöhung des pH-Wertes, die in einer bläulichen Färbung des Gewebes resultierte. Daraufhin wurden die Objektträger in 1% iger Eosinlösung gefärbt und nach 5min mit Aqua dest. gespült.

HCl-Alkohol: 25ml HCl 20%

750ml Aqua dest.

1750ml Isopropylalkohol

#### 2.3.2 LFB/PAS-Färbung

Luxolblau (Luxol-fast-blue) färbt spezifisch Myelinlipide blau an. In der Perjod-Schiff-Reaktion bildet Perjodsäure als Oxidationsmittel Aldehydgruppen aus Glykolgruppen. Diese Aldehydgruppen reagieren in der Schiffschen Probe mit fuchsinschwefeliger Säure. Das durch die Säure freigesetzte Fuchsin bildet einen rötlichen Farbton, sodass sich Nervenzellen und Glykogen- bzw. Glykoprotein-reiche Gewebeanteile purpurrot darstellen.

Die Objektträger wurden in die LFB-Lösung gestellt und über Nacht bei 60°C inkubiert. Die abgekühlten Schnitte wurden kurz in 90% igen Alkohol gestellt, um Überschüsse der ebenfalls alkoholischen LFB-Färbelösung abzuwaschen. Zum Differenzieren wurden die Objektträger dann einzeln für einige Sekunden unter Schwenken durch die folgenden Lösungen bewegt: 0,05 % Lithiumcarbonat; 70% iger Alkohol; Aqua dest..

Die Proben wurden 5min mit 1%iger Perjodsäure inkubiert und danach 5min unter Leitungswasser gespült. Dieses wurde nachfolgend gründlich mit Aqua dest. abgespült. Im Schiffschen Reagenz verblieben die Schnitte für 20min und wurden anschließend durch 5min Spülen unter Leitungswasser gebläut. Die Kerne wurden durch Mayers Hämalaun für 2min gefärbt und die Proben erneut mit Aqua dest. gespült. Es wurde mit 1% HCl-Alkohol differenziert und erneut mit Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden über die aufsteigende alkoholische Reihe in Xylol überführt und mit DePeX eingedeckt.

#### 2.3.3 Versilberung nach Bielschowsky

Bei der Bielschowsky-Versilberung werden Neurone mit ihren Fortsätzen wie Dendriten, Axone und ihren Neurofibrillen sichtbar. Vereinfacht stellen sich auf den tabakfarbenen Schnitten Axone schwarz und der Hintergrund braun dar.

Begonnen wurde damit, die Schnitte für 20min in die 20%ige Silbernitratlösung zu bringen. Vorübergehend wurden danach die Schnitte entnommen und in Aqua bidest. gestellt, um der Lösung 32%iges Ammoniak tropfenweise zuzufügen, bis das Gemisch aufklärte. Nach 2 weiteren Tropfen Ammoniak wurden die Schnitte wieder eingestellt und für 15min im Dunklen inkubiert.

Für den nächsten Schritt wurde eine mit Aqua bidest. gefüllte Küvette mit 3 Tropfen Ammoniak präpariert, in der die Gewebeschnitte geschwenkt wurden. In der Folge wurden 10 Tropfen der Entwicklungslösung zugefügt, bis sich die Schnitte nach etwa 3min tabakbraun verfärbt hatten und die Reaktion mit Aqua dest. gestoppt wurde.

Zuletzt wurden die Präparate für 2min in 2% Natriumthiosulfat gestellt und mit Leitungswasser gespült. Es folgte die Überführung durch die aufsteigende alkoholische Reihe in Xylol und das Eindecken mit DePeX.

Entwicklungslösung: 20ml Formalin 100ml Aqua bidest. 0,5g Zitronensäure 0,1ml Salpetersäure 65%.

#### 2.3.4 Immunhistochemische Färbungen

Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 900 Watt unter wechselnder Zugabe von Citrat und Wasser 5x je 3min erhitzt. Ausnahme war hier die Vorbehandlung zur Färbung mit dem NG2-Antikörper, die im Steamer (Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland) in EDTA für 30min durchgeführt wurde.

#### 2.3.4.1 Indirekte Biotin-Avidin-Methode

Bei der indirekten Biotin-Avidin-Methode erkennt zunächst ein primärer Antikörper das spezifisch darzustellende Antigen. Der sekundäre, biotinylierte Antikörper ist gegen die Fc-Region (von engl. *Fragment crystallizable*) des primären gerichtet. In der Avidin-Biotin-Reaktion wird die (Meerrettich-)Peroxidase an die Orte der primären Antikörperbindung lokalisiert. Anschließend wird DAB durch die Peroxidase-vermittelte Katalyse von  $H_2O_2$  zu Wasser und Sauerstoff oxidiert und bildet an diesen Stellen ein braunes Reaktionsprodukt.

Nach 20-minütigem Abkühlen wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült und in PBS überführt.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase bei der späteren Entwicklung wurden die Präparate mit 3% iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 20min im Kühlschrank bei 4°C vorbehandelt. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurde diese nun mit FCS bzw. 0,02% igem Casein für 20min in einer feuchten Kammer geblockt.

Danach wurden die Objektträger mit dem primären, gegen das gewünschte Antigen gerichteten Antikörper über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde mit PBS gespült, bevor der sekundäre Antikörper aufgetragen wurde und eine Stunde inkubierte. Anschließend wurde nach dreimaligem Spülen mit PBS mit Avidin-Peroxidase für eine Stunde inkubiert und danach erneut mit PBS gespült. Anschließend wurde für 1-3min je nach Fortschritt der Anfärbung mit DAB entwickelt.

#### 2.3.4.2 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode

Bei dieser Methode wird das Fc-Fragment des primären Antikörpers mit einem gegen dessen Spezies gerichteten Brückenantikörper erkannt. Neben der ersten Bindung kann dieser im Sinne einer Brücke mit dem zweiten Fab-Arm (von engl. *Fragment antigen binding*) den dritten Antikörper ebenfalls an dessen Fc-Teil binden. Der dritte Antikörper, welcher gegen Alkalische Phosphatase gerichtet ist, bildet dann schließlich mit je einem Molekül dieses Enzyms den Komplex, welcher zur farbbildenen Reaktion etwa wie hier mit Neufuchsin fähig ist.

Die Spezies des dritten Antikörpers entspricht der des ersten Antikörpers, gegen die dementsprechend auch der Brückenantikörper gerichtet ist.

Diese Prozedur schloss sich an die In-Situ-Hybridisierung für PLP-mRNA (siehe unten 2.3.5) an, um zusätzlich das translatierte PLP-Protein auf den Schnitten darzustellen.



Abbildung 2.2 Schema der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode. Der primäre Antikörper (Schwarz unten) bindet das gewünschte Antigen (grau). Der Brückenantikörper (oliv) verbindet durch die Bindung der Fc-Fragmente den primären mit dem tertiären Antikörper. Letzterer bindet den Alkalische-Phosphatase-Komplex (rot), mit dessen Hilfe es zur farbbildenden Reaktion kommt. (http://www.pathologie-online.de/meth/pop-ih\_5.htm)

Die Schnitte wurden in der feuchten Kammer mit 10% FCS-Lösung für 10min geblockt. Nachfolgend wurden nacheinander die 3 Antikörper: PLP-, Brücken- und APAAP-Komplexantikörper für je 1 Stunde in der feuchten Kammer auf die Schnitte appliziert. Zwischendurch wurde mit TBS gespült. Nachfolgend wurde die Entwicklungslösung angesetzt und durch Titration mit einmolarem Natriumhydroxid auf pH 8,8 eingestellt sowie anschließend durch einen Faltenfilter (Whatmann, Dassel, Deutschland) geklärt. Die Färbereaktion verlief auf dem Schüttler (E. Bühler, Hechingen, Deutschland) für 10min. Abschließend wurden die Objektträger 30 Sekunden in Hämalaun gegengefärbt und mit Immu-Mount wässrig eingedeckelt.

Entwicklungslösung:	Lösung I:	10mg Natriumnitrit	
		250µl Aqua bidest.	
		100µl Neufuchsin	
	Lösung II:	14mg Naphthol-As-Bi-Phosphat	
		300µl NN-Dimethylformamid	
	Lösung III:	20mg Levamisol	
		50ml TBS	
		Lösung I	
		Lösung II.	

#### 2.3.5 In-Situ-Hybridisierung

Zur In-Situ-Hybridisierung werden die Gewebeproben in verschiedenen Schritten vorbehandelt, um die mRNA freizulegen und die endogene alkalische Phosphatase zu inaktivieren. Zu der gesuchten mRNA komplementäre RNA (RNA-Sonde) hybridisiert *in situ* mit der zelleigenen mRNA der Präparate und markiert somit spezifisch Zellen entsprechend der Transkriptionsaktivität der gesuchten Codonformation. Die Sonden sind Digoxigenin-markiert und können so von einem Antikörper gebunden werden, welcher mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Unter Zugabe einer Färbelösung kommt es zur Färbung an den Stellen im Gewebe, an denen das dephosphorylierende Enzym spezifisch fixiert wurde.

In der Färbereaktion spaltet die alkalische Phosphatase Phosphatreste des 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphats (BCIP), was in Verbindung mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) zur violett-blauen Anfärbung der PLP-exprimierenden Oligodendrozyten führt.

In diesem Experiment wurde m.H. dieser Technik die mRNA des Oligodendrozytenspezifischen Proteolipid Proteins (PLP) durch die Hybridisierung *in situ* mittels mRNA-Sonde identifiziert.

Die Glaswaren wurden sterilisiert (bei 180°C für 3 Stunden) und die Puffer- sowie die DEPC-Lösungen autoklaviert (bei 120°C und 2 bar für 30 Minuten).

Die Paraffin-Schnitte wurden vom Xylol durch die absteigende alkoholische Reihe bis ins DEPC-H<sub>2</sub>O wie folgt entparaffiniert und rehydriert: 2x20min Xylol, 3x3min 96% iger Alkohol, 1x3min 75% iger Alkohol, 1x3min 50% iger Alkohol, 1x3min 30% Alkohol, DEPC-H<sub>2</sub>O.

Es wurde für 20min bei 4 °C in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Nach dreimaligen Spülen in TBS wurden die Schnitte für 10min in 0,2M HCI-Lösung gestellt. Erneut wurde dreimal mit TBS gespült, bevor die Proben durch Proteinase K versetzt für 20min bei 37°C in den Wärmeofen gestellt wurden, um Nukleinsäuren freizulegen. Bei -20°C vorgekühltes TBS stoppte darauf 5min lang diese Verdauungsreaktion. Wieder wurde dreimal mit TBS gespült.

Nun wurden, unter permanenter Bewegung auf dem Schüttler (E. Bühler, Hechingen, Deutschland), mit Hilfe von 0,5% igem Essigsäureanhydrid endogene alkalische Phosphatasen inaktiviert. Nachfolgend wurde dreimal mit TBS gespült, dann wurde die oben beschriebene Alkoholreihe, diesmal aufsteigend, zur Dehydrierung durchlaufen und die Präparate schließlich in Chloroform überführt. Die Objektträger wurden kurz abgetropft und für 4min auf die auf 94°C vorgewärmte Wärmeplatte abgelegt.

Der zuvor angesetzte Hybridisierungsmix (s.u.) wurde auf die bereits in der feuchten Kammer befindlichen Objektträger pipettiert. Die geschlossene Kammer wurde über Nacht im Hybridisierungsofen bei 65°C belassen.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte unter Bewegung auf dem Schüttler jeweils zweimal mit zwei speziellen Waschpuffern (s.u. Waschpuffer I und Waschpuffer II) und anschließend mit TBS für 10min behandelt. Die in der feuchten Kammer abgelegten Schnitte wurden dann für 15min abschließend geblockt (s.u. Block-Mix). Das an die Sonde gebundene Digoxigenin konnte so durch den mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper markiert werden, als dieser für 3 Stunden in der feuchten Kammer mit den Gewebeschnitten reagierte.

Nach dreimaligem Spülen mit TBS und nach Behandlung mit dem NBT/BCIP Substratpuffer wurden die Präparate lichtgeschützt in die Färbelösung gestellt und darin 7 Tage belassen.

TBS:	50ml Tris 1M pH 7,5
	100ml NaCl/ 850ml H <sub>2</sub> O-DMPC
SSC:	87,66g NaCl/ 500ml DEPC-H <sub>2</sub> O
	44,115g Na-Citrat pH 7,0/ 500ml DEPC-H <sub>2</sub> O

Hybridisierungsmix:	10µl Dextran
	5µl SSC
	25µl deionisiertes Formamid
	1µl Lachs-Sperma-DNA
	0,5µl SDS 2
	4,5µl DEPC-H <sub>2</sub> O 4,5µl
	4µl PLP Sonde 4µl
Waschpuffer I:	7,5ml SSC
	1,5ml SDS 10%
	150ml DEPC-H <sub>2</sub> O
Waschpuffer II:	1ml SSC
	1ml SDS 10%1
	ad 100ml DEPC-H <sub>2</sub> O
Substrat-Puffer:	12,11g Tris 100mM
	5,84g NaCl 100mM
	10,165g MgCl <sub>2</sub> 50mM
	ad 11 DEPC-H <sub>2</sub> 0
	HCl-Titration auf pH 9,5
Block Mix:	870µl Blocking Reagent
	100µl FCS
	30µl humanes Serum
Färbelösung:	175µl BCIP
	225µl NBT
	50ml Substratpuffer.

Tris

Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)

Tabelle 2.3 Verwendete Substanzen: Histologische Techniken - Lichtmikroskopie						
Bezeichnung	Bezugsquelle					
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland					
DePeX	Serva, Heidelberg, Deutschland					
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Eosin G	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Lithiumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Luxol-fast-blue	VWR International, Poole, Großbritannien					
Perjodsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Schiffsches Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland					
Ammoniak	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Formalin	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Salpetersäure	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland					
Phosphate Buffered Saline (PBS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland					
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland					
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland					

Life Technologies, Carlsbad, USA

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Sigma-Aldrich. München, Deutschland

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Wassersto Fetales Kälberserum (FCS) Casein (Tropix®) Extravidin gekoppelt an Peroxidase 3-3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) Natriumchlorid (NaCl) Salzsäure (HCl) Essigsäureanhydrid Proteinase K

Dextran	Merck, Läufelfingen, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Deionisiertes Formamid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP)	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Blocking Reagent	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Humanes Serum	Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Tobias Dallenga
Dimethyldicarbonat (DMPC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Diethyldicarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Lachs-Sperma-DNA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neufuchsin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Naphthol-As-Bisphosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NN-Dimethylformamid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Levamisol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Immu-Mount	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Ziel	Antigen	Spezies	Verdün nung	Bemerkung	Bezugsquelle
Oligodendrozyten- vorläuferzellen	Olig-2	Kaninchen	1:15000	Block mit Casein	IBL America, Minneapolis, USA
Oligodendrozyten- vorläuferzellen	NG-2	Kaninchen	1:200	Vorbehandlun g im Steamer Block mit FCS	Millipore Corporation, Billerica, USA

Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Reife Oligodendrozyten	Nogo-A	Maus	1:300	Block mit FCS	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. M.E. Schwab Universität und ETH, Zürich, Schweiz
Myelin-Basisches Protein	MBP	Kaninchen	1:1000	Block mit FCS	Dako, Glostrup, Dänemark
Proteolipid Protein	PLP	Maus	1:500	Block mit FCS	Biozol, Eching, Deutschland
Wachstumsfaktor	FGF-9	Maus	1:200	Block mit FCS	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Proliferationsmarker	KI-67	Ratte	1:500	Block mit FCS	Dr. Christian Sartori, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.5 Verwendete Sekundärsysteme für immunhistochemische Färbungen

System	Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Biotin	Anti-Kaninchen	Esel	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Biotin	Anti-Maus	Ziege	1:200	Dako, Glostrup, Dänemark
Brückenantikörper	Anti-Maus	Kaninchen	1:50	Dako, Glostrup, Dänemark
APAAP- Tertiärantikörper	Anti-Alkalische Phosphatase	Maus	1:50	Dako, Glostrup, Dänemark

## 2.4 Histologische Techniken – Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden Lipide, in diesem Fall insbesondere Myelin, mit Osmiumtetroxidschwarz angefärbt . Gleichzeitig wurde das Präparat somit fixiert. Zur Negativkontrastierung wurde Uranylacetat verwendet, welches das Objekt umgibt und durch Elektronenabsorption heller erscheint.

Von den in PFA fixierten und in Paraffin eingebetteten Blöcken wurden am Schlittenmikrotom (SM 2000R Leica, Wetzlar, Deutschland) 2mm Frontalschnitte hergestellt. Schnitte mit durch Monastral-Blue gekennzeichneten Injektionsstellen wurden ausgewählt. Der Balken wurde mit einer Rasierklinge präpariert und die Probe sagittal durch die Läsionsstelle angeschnitten.

Diese Gewebsstücke wurden deparaffiniert, durch die absteigende alkoholische Reihe rehydriert und in 3% igem Glutaraldehyd über Nacht bei 4°C fixiert. Nachfolgend wurde zweimal mit PBS gespült, bevor das Präparat mit 1% iger Osmiumsäure nachfixiert und kontrastiert wurde.

Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurde die Dehydrierung zunächst mit 50% igem Ethanol für 10min begonnen. Für 1 Stunde wurde dann bei 4°C mit dem in 70% igem Ethanol gelösten 0,5% igen Uranylacetat inkubiert. Dieses bildet unter dem Elektronenmikrosokop durch seine stark Elektronen-absorbierende Eigenschaft den Negativkontrast in der Peripherie des Gewebes. Die Schnitte wurden weiter mit 80% iger, dann 96% iger Ethanollösung je für 10min behandelt. Darauf standen sie zweimal 15min in 100% igem Ethanol, bis mit Propylenoxid zweimal für 20min weiter Wasser entzogen wurde.

Zur Einbettung wurden die Proben für je 35min in einer Araldit-Propylenoxid-Lösung zunächst im Verhältnis 1:1, anschließend 2:1 eingelegt, um dann für eine Stunde in Araldit zu stehen.

Das Material wurde nun in bei 60°C vorgewärmte Silikonförmchen (Optics Balzers AG, Balzers, Lichtenstein) überführt, die zuvor mit Araldit befüllt wurden. Die wie oben beschrieben frontal geschnittenen Präparate des Balkens wurden horizontal auf dem Förmchenboden angeordnet. Das mediale Ende der Probe mit der Injektionsstelle wird zum oberen Ende der Form ausgerichtet. Zur Aushärtung wurden die gefüllten Silikonförmchen für 3 Tage bei 60°C belassen.

Die Proben wurden anschließend im Ultramikrotom (Ultracut UCT, Leica, Wetzlar, Deutschland) eingespannt und auf dem Trimmtisch fixiert. Die Aralditschicht oberhalb des Präparats wurde mit einer Rasierklinge entfernt und anschließend mit dem Glasmesser geschnitten.

Es wurden zunächst Semidünnschnitte mit einer Dicke von 390 nm hergestellt und in Aqua bidest. überführt. Die Objektträger, die zuvor in 70% igem Isopropanol lagerten, wurden ebenfalls mit Aqua bidest. benetzt und die Schnitte in diesen Tropfen ausgebreitet.

Das Wasser auf den Objektträgern verdampfte auf der Wärmeplatte bei 60°C für eine Stunde. Die getrockneten Schnitte wurden mit der Färbelösung nach Richardson (s.u.) beladen. Als nach ca. 3min die Ränder begannen einzutrocknen, wurde die Färbelösung mit Aqua dest. abgespült. Nach kurzem Trocknen auf der Wärmeplatte wurden Deckgläschen auf die Schnitte gegeben und mit Araldit eingedeckelt. Die Präparate waren nach einer Nacht im Wärmeschrank bei 60°C konserviert.

Die fertigen Semidünnschnitte dienten nun dazu, unter dem Lichtmikroskop sowohl die Qualität der Schnitte und ihrer Färbung als auch die Lokalisation des Balkens und der Injektionsläsion zu beurteilen.

Die Schnittfläche der so geprüften Araldit-Blöcke wurde mit einer Rasierklinge trapezförmig um die gewünschte Gewebsregion verkleinert.

Die Ultradünnschnitte, welche eine Dicke von 72 nm erreichen sollten, wurden mit einem Diamantmesser (Leica, Wetzlar, Deutschland) erstellt. Die Schnitte wurden dann mit einer Wimper auf ein mit Aceton gereinigtes Kupfer-Grid (Science Services, München, Deutschland) abgelegt.

Richardson: Azur II 1% 10ml

Methylenblau 2% 5ml

Dinatriumtetraborat-10-Hydrat 1% 5ml

Tabelle 2.6 Verwendete Substanzen: Histologische Techniken - Elektronenmikroskopie

Bezeichnung	Bezugsquelle
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Osmiumsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Propylenoxid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Azur II	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumtetraborat-10-Hydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 2.5 Histologische Quantifizierung

#### 2.5.1 Lichtmikroskopie

Am Mikroskop (Olympus BX 41, Deutschland GmbH, Hamburg) wurden die angefärbten Zellen im standardisiert gerasterten Sehfeld des Okulars (Olympus WHN10X-H/22) bei 400facher Vergrößerung gezählt und anschließend auf Zellen pro mm<sup>2</sup> hochgerechnet. Es wurde der Balken unter Ausschluss der durch Monastral-Blue gekennzeichneten Injektionsfläche einbezogen.



Abbildung 2.3 Darstellung der Zählung am Beispiel eines Nogo-A-gefärbten Präparates. Es wurden pro Präparat zwei standardisierte Schfelder (schwarze Quadrate) getrennt an der Mitte der durch Monastral-Blue gekennzeichneten Injektionsfläche (Pfeil) gezählt. Nicht zum Corpus callosum gehörige Anteile (rote Linien) wurden genauso wie die Injektionsfläche (grüne Linien) von der Zählung ausgeschlossen. Darunter die Skizze des mikroskopischen Rasters mit ausgeschlossenen Bereichen, mit deren Hilfe die Zellzahl anschließend auf Zellen pro mm<sup>2</sup> hochgerechnet wurde.

#### 2.5.2 Elektronenmikroskopie

Die Fotos der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit Analysis (Analysis Software, University of Wisconsin, Madison, USA) ausgewertet. Dabei wurde für jedes

Präparat die G-Ratio bestimmt. Diese gibt das Verhältnis der Myelinschicht eines myelinisierten Axons im Bezug zum Durchmesser des Axons wieder (Axon- zu Faserdurchmesser).



**Abbildung 2.4 Bestimmung der G-Ratio.** Es wurde der Axondurchmesser *d* sowie der Durchmesser der Nervenfaser mit Myelinumhüllung *D* ausgemessen. Man erhält die G-Ratio durch Division von *d* durch *D* aus (Paus und Toro 2009, S.4).

#### 2.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Tests sowie alle grafischen Auswertungen wurden mit Hilfe von Statistica 10 (StatSoft-Europe, Hamburg, Deutschland) und Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

Die Messungen der Zelldichte wurden mittels einer 2-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Als feste Faktoren wurden dabei zum einen die Zeit (Perfusion nach 3 bzw. 6 Tagen) und zum anderen die Injektionslösung (PBS bzw. FGF-9) betrachtet. Falls eine Wechselwirkung zwischen Zeit und Injektionslösung vorlag, wurden die Daten nach einem Faktor aufgetrennt und jeweils ungepaarte T-Tests mit Bonferroni-Korrektur ( $\alpha$ /2) durchgeführt.

Zur Analyse der G-Ratio der elektronenmikroskopischen Untersuchung sowie zum Vergleich der Zelldichte an gleichen Perfusiontagen wurde ebenfalls ein ungepaarter T-Test verwendet.

Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf 0,05 festgesetzt.

## 3 Ergebnisse

Durch die 6-wöchige Fütterung von Cuprizon wurde eine Toxin-vermittelte Demyelinisierung im Corpus callosum und Kortex von Mäusen induziert. Anschließend wurde den Versuchstieren mittels stereotaktischer Injektion 1µl des Wachstumsfaktors FGF-9 (100ng/µl) bzw. PBS als Kontrolle appliziert.

Die Tiere wurden in 2 Gruppen eingeteilt und 3 bzw. 6 Tage nach Injektion perfundiert, um Veränderungen im zeitlichen Verlauf der zu untersuchenden Remyelinisierung beurteilen zu können. Die Gehirne wurden für die mikroskopische und elektronenmikroskopische Analyse spezifisch angefärbt und die Corpora callosa analysiert.

### 3.1 Darstellung der FGF-9-Injektionen

Um FGF-9 in den Corpora callosa darzustellen, wurde eine gegen diesen Wachstumsfaktor gerichtete Antikörperfärbung verwendet. Jedoch konnte FGF-9 weder 3 noch 6 Tage nach Applikation im Bereich der Injektionen nachgewiesen werden (**Abbildung 3.1**).



Abbildung 3.1 Kein Nachweis von FGF-9 im Injektionsbereich zu den Perfusionszeitpunkten. 3 (A) bzw. 6 Tage (B) nach der Injektion von FGF-9 konnte der Wachstumsfaktor nicht in den Corpora callosa nachgewiesen werden. Injektionsbereich/ Monastral-Blue: Blau; Messbalken (A+B): 200µm. Originalvergrößerung (A+B): 100-fach.

## 3.2 Einfluss der Injektionen auf die Axondichte

Es wurden Bielschowsky-Versilberungen zur Darstellung von eventuellen axonalen Schädigungen an jedem Präparat angefertigt. Sie zeigten, dass die stereotaktischen Injektionen keinen Einfluss auf die Axondichte im Balken hatten (**Abbildung 3.2**). Sie bestätigen somit, dass die Injektionen weitgehend atraumatisch erfolgten und keine Gewebenekrose zur Folge hatten.



Abbildung 3.2: Minimale Destruktion von Axonen durch die intrazerebrale stereotaktische Injektion. Im Vergleich der ipsi- (A) zur nicht injizierten, kontralateralen (B) Balkenseite zeigte sich in den Bielschowsky-Versilberungen keine wesentliche Veränderung der Axondichte. Axone: Schwarz; Injektionsbereich/ Monastral-Blue: Blau. Messbalken (A+B): 200µm. Originalvergrößerung (A+B): 100-fach.

## 3.3 Einfluss von FGF-9 auf die Zellteilungsaktivität

Um den Einfluss von FGF-9 auf die Zellteilungsaktivität zu untersuchen, wurde der Proliferationsmarker Ki-67 detektiert. Es folgte ein qualitativer Vergleich am mikroskopischen Bild. In allen Gruppen ließen sich positive Zellen in den Stammzellarealen der Seitenventrikel sowie im Bereich der Corpora callosa anfärben. Die Färbungen mit Ki-67 zeigten zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Dichte positiver Zellen in PBS oder FGF-9 injizierten Tieren (**Abbildung 3.3**).



**Abbildung 3.3 Kein Unterschied in der Dichte Ki-67-positiver Zellen nach FGF-9-Injektion.** Die durch die Ki-67-Immunhistochemie markierten Interphase-Zellkerne zeigten keine Unterschiede abhängig von einer FGF-9-Injektion an den beiden Perfusionszeitpunkten. A: PBS-Injektion, Perfusion nach 3 Tagen. B: FGF-9-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen. C: PBS-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen. D: FGF-9-Injektion mit Perfusion nach 6 Tagen. Injektionsbereich/ Monastral-Blue: Blau; Zellkerne mit Protein Ki-67: Braun; Weitere Zellkerne: Blau. Messbalken (A-D): 200μm. Originalvergrößerung (A-D): 100-fach.

## **3.4 Einfluss von FGF-9 auf die Dichte der Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ)**

Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ) migrieren und proliferieren in Bereichen, in denen Myelin geschädigt wurde. Um einen Einfluss von FGF-9 auf die Dichte von OVZ zu ermitteln, wurden Antikörperfärbungen gegen für dieses Entwicklungsstadium typische Expressionsprodukte durchgeführt.

Die Expression des Chondroitinsulfat-Proteoglykans NG-2 gilt als Marker für OVZ. Die Quantifizierung der NG-2-positiven Zellen ergab keinen Unterschied für FGF-9behandelte Tiere im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren. Mit Bezug auf den Perfusionzeitpunkt ergab sich eine signifikant höhere Zellzahl für Tiere mit Perfusion nach 6 Tagen gegenüber Tieren mit Perfusion nach 3 Tagen, unabhängig von der stereotaktischen Injektionslösung in der 2-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) (p = 0,0001; 2-faktorielle ANOVA; PBS Perfusiontag 3: 47 ± 14 NG-2+ Zellen/mm<sup>2</sup>; FGF-9 Perfusionstag 3: 68 ± 15 NG-2+ Zellen/mm<sup>2</sup>; PBS Perfusionstag 6: 145 ± 29 NG-2+ Zellen/mm<sup>2</sup>; FGF-9 Perfusionstag 6: 212 ±18 NG-2+ Zellen/mm<sup>2</sup> Abbildung 3.4).



Abbildung 3.4 Signifikant höhere Zelldichte NG-2-positiver Zellen in Tieren mit Perfusion 6 Tage nach Injektion. A: 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA): Die Zelldichte NG-2-positiver Zellen bei FGF-9 und PBS injizierten Tieren war am 6. Perfusionstag signifikant höher als am 3. Perfusionstag (p = 0,0001; Kasten = Mittelwert; Vertikale Balken = 0,95 Konfidenzintervall) B: NG-2-positive Zellen (Pfeile) zeigten ein braun gefärbtes Zytoplasma. Messbalken: 100µm. Originalvergrößerung: 400-fach.

Als zweiter Marker für OVZ wurde der Transkriptionsfaktor Olig-2 angewendet. Olig-2 gilt als spezifisch für Oligodendrozyten und wird im Stadium der OVZ stärker exprimiert als in reifen Oligodendrozyten. Dementsprechend wurden nur stark markierte Zellen als Olig-2-positiv gewertet. Die Quantifizierung stark Olig-2-positiver Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied nach Injektionen mit PBS oder FGF-9 an den unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten (**Abbildung 3.5**).

![](_page_37_Figure_1.jpeg)

Abbildung 3.5 Kein Einfluss von FGF-9-Injektion oder Perfusionszeitpunkt auf die Dichte Olig-2positiver Zellen. A: 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA): Die Dichte Olig-2-positiver Zellen war weder abhängig von einer FGF-9-Behandlung noch vom Perfusionstag (Kästen = Mittelwerte; Vertikale Balken = 0,95 Konfidenzintervall). B: Olig-2-positive Zellen (Pfeile) wurde als Zellen mit starker bräunlicher Anfärbung des Kerns definiert. Nur blass angefärbte Zellen wurden nicht gezählt. Messbalken: 100µm. Originalvergrößerung: 400-fach.

## 3.5 Einfluss von FGF-9 auf die Dichte reifer Oligodendrozyten

Unter den Entwicklungsstufen der Oligodendrozyten wurden auch reife Oligodendrozyten, die in der Lage sind, Myelin um Nervenzellfortsätze zu bilden und damit für eine erfolgreiche Remyelinisierung verantwortlich sind, untersucht. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen wurde analysiert, ob FGF-9 Einfluss auf die Dichte dieser Zellfraktion hat.

Nogo-A wird in ausgereiften Oligodendrozyten stark exprimiert und gilt als spezifischer Marker. Das Protein wurde immunhistochemisch angefärbt und die Anzahl Nogo-Apositiver Zellen quantifiziert. In der statistischen Auswertung mittels 2-faktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ergab sich keine signifikante Veränderung der Zelldichte Nogo-A-positiver Zellen nach lokaler FGF-9-Behandlung im Vergleich zur PBS-Behandlung. (Abbildung 3.6)

![](_page_38_Figure_4.jpeg)

Abbildung 3.6 Kein signifikanter Unterschied in der Zelldichte Nogo-A-positiver Zellen nach Injektion von FGF-9. A: 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA): Die Population der Nogo-A-positiven Zellen zeigte keine Signifikanz im Sinne eines Einflusses von FGF-9 bzw. der unterschiedlichen Perfusionszeitpunkte. (Kästen = Mittelwerte; Vertikale Balken = 0,95 Konfidenzintervalle) B: Die braune Anfärbung von Somata und z.T. auch von Zellfortsätzen charakterisierte Nogo-A-positive Zellen (Pfeile). Messbalken: 100µm. Originalvergrößerung: 400-fach.

Die T-Test-Analyse der Anzahl Nogo-A-positiver Zellen bei Tieren die 6 Tage nach Injektion geopfert wurden, ergab eine signifikant niedrigere Zelldichte für FGF-9 behandelte Tiere (p = 0,04; T-Test; PBS Perfusionstag 6: 47  $\pm$  131 Nogo-A + Zellen/mm<sup>2</sup>; FGF-9 Perfusionstag 6: 416  $\pm$  28 Nogo-A + Zellen/mm<sup>2</sup>; **Abbildung 3.7**).

![](_page_39_Figure_1.jpeg)

Abbildung 3.7 Signifikant niedrigere Zelldichte Nogo-A positiver Zellen durch FGF-9 Behandlung bei Perfusion 6 Tage nach Injektion. T-Test: In der Gruppe FGF-9 behandelter Tiere, die nach 6 Tagen geopfert wurden, zeigte sich eine signifikant niedrigere Zelldichte gegenüber mit PBS behandelten Tieren. (p = 0.04; T-Test, Horizontale Striche = Mittelwerte; Vertikale Balken = Standardabweichung).

Ferner wurde untersucht, ob FGF-9 die Dichte reifer myelinisierender Oligodendrozyten steuert, indem mittels In-Situ-Hybridisierung Zellen, die die RNA des Myelinproteins PLP exprimierten, detektiert wurden. FGF-9 injizierte Tiere wiesen dabei eine signifikant niedrigere Zelldichte gegenüber der Gruppe der PBS injizierten Tiere auf (p = 0,03; 2-faktorielle ANOVA; PBS Perfusionstag 3:  $272 \pm 153$  PLP + Zellen/mm<sup>2</sup>; FGF-9 Perfusionstag 3:  $114 \pm 141$  PLP + Zellen/mm<sup>2</sup>; PBS Perfusionstag 6:  $384 \pm 131$  PLP + Zellen/mm<sup>2</sup>; FGF-9 Perfusionstag 6: 175,1 PLP + Zellen/mm<sup>2</sup>; Abbildung 3.8).

![](_page_39_Figure_4.jpeg)

Abbildung 3.8 Signifikant niedrigere Zelldichte PLP-mRNA-positiver Zellen nach FGF-9-Injektion. A: 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA): Die Quantifizierung PLP-mRNA-positiver Zellen ergab einen signifikanten Unterschied im Sinne einer niedrigeren Zelldichte in FGF-9 injizierten Tieren (p = 0,03; Kästen = Mittelwerte; Vertikale Balken = 0,95 Konfidenzintervall). B: PLP-mRNA-positive Zellen (Pfeile) zeigten eine dunkelviolette Anfärbung. Die Immunhistochemische Anfärbung des Myelinproteins PLP stellte sich rot dar. Messbalken: 100 $\mu$ m. Originalvergrößerung: 400-fach.

## 3.6 Einfluss von FGF-9 auf die Remyelinisierung

Myelin, als Produkt der Remyelinisierung, wurde mit Luxol Fast Blue angefärbt, nachdem die Tiere 3 bzw. 6 Tage ohne das Oligodendrozyten- und damit Myelinschädigende Cuprizon gefüttert worden waren. Die Markscheiden der FGF-9 injizierten Tiere zeigten auf diesem lichtmikroskopischen Niveau keinen Unterschied zu den mit PBS injizierten Tieren. Auch fiel kein Unterschied in der mikroskopischen Qualität des Myelins abhängig vom Perfusionstag auf (**Abbildung 3.9**).

![](_page_40_Figure_3.jpeg)

**Abbildung 3.9 Kein Einfluss von FGF-9 auf den Myelingehalt im Balken in der LFB-PAS-Färbung.** Im Gruppenvergleich hatten weder die FGF-9-Injektion noch ein späterer Perfusionszeitpunkt Einfluss auf die lichtmikroskopische Anfärbbarkeit der Myelinscheiden. A: PBS-Injektion, Perfusion nach 3 Tagen. B: FGF-9-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen. C: PBS-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen. D: FGF-9-Injektion mit Perfusion nach 6 Tagen. Myelinscheiden: Hellblau; Injektionsbereich/ Monastral-Blue: Dunkelblau; Messbalken (A-D): 200μm. Originalvergrößerung (A-D): 100-fach.

Auch gegen das Myelinprotein MBP gerichtete Antikörper ermöglichten die Darstellung der Myelinscheiden. Die Corpora callosa stellten sich, so gefärbt, in allen Gruppen gleich myelinisiert dar. Es konnte kein Effekt einer Injektion von FGF-9 beobachtet werden. Auch ein 3 Tage später gewählter Perfusionstag zeigte keinen Unterschied zwischen der FGF-9- und der PBS-Gruppe (**Abbildung 3.10**).

![](_page_41_Figure_1.jpeg)

Abbildung 3.10 Kein Einfluss von FGF-9 auf den Myelingehalt in der MBP-Färbung. Es konnte keine Beeinflussung des Myelingehalts durch FGF-9-Injektionen zu den beiden Perfusionszeitpunkten nachgewiesen werden. A: PBS-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen. B: FGF-9-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen. C: PBS-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen. D: FGF-9-Injektion mit Perfusion nach 6 Tagen. Myelinscheiden: Braunrötlich; Injektionsbereich/ Monastral-Blue: Blau; Messbalken (A-D): 200µm. Originalvergrößerung (A-D): 100-fach.

Um den Einfluss von FGF-9 auf die Ultrastruktur des Myelins beurteilen zu können, wurden Hirnschnitte der Balkenregion von jeweils 3 FGF-9 und 3 PBS injizierten Tieren aus der Gruppe der nach 3 Tagen perfundierten Mäuse für das Elektronenmikroskop präpariert und angefärbt.

![](_page_42_Picture_1.jpeg)

**Abbildung 3.11 Kein Einfluss von FGF-9 auf myelinisierte Axone.** In den ultrastrukturellen Untersuchungen von Sagittalschnitten durch die Corpora callosa von FGF9- und PBS-injizierten Cuprizon-behandelten Mäusen zeigten sich unmyelinisierte sowie myelinisierte Axone. Es wurde kein qualitativer Unterschied der Dichte myelinisierter Fasern gesehen. A: PBS-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen. **B:** FGF-9-Injektion mit Perfusion nach 3 Tagen; Messbalken (A+B): 2µm. Originalvergrößerung (A+B): 12500-fach.

Nachfolgend wurden die Durchmesser der Myelinumhüllungen und der Axone an Fotos der elektronenmikroskopischen Präparate ausgemessen und die G-Ratio bestimmt (**Abbildung 3.11**). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied für Injektionen mit PBS bzw. FGF-9 (**Abbildung 3.12**)

![](_page_42_Figure_4.jpeg)

**Abbildung 3.12 FGF-9-Injektion hat keinen Einfluss auf die G-Ratio.** Die G-Ratio, als Maß für den Remyelinisierungsfortschritt, wurde durch die Injektion von FGF-9 nicht signifikant beeinflusst. (Kleine Kästen = Mittelwert; Große Kästen = Standardfehler; Vertikale Balken = 1,96 mal Standardfehler).

## 4 Diskussion

Um die Wirkung von FGF-9 auf die Remyelinisierung zu ermitteln, wurde Mäusen, welche mit dem demyelinisierend wirkenden Toxin Cuprizon gefüttert worden waren, dieser Wachstumsfaktor via stereotaktischer Injektion in das Corpus callosum injiziert und der Verlauf der Remyelinisierung nach Absetzen von Cuprizon beobachtet.

## 4.1 Studienlage

#### Ein Differenzierungsblock gilt als mögliche Ursache von Remyelinisierungshemmung

Die Förderung von Remyelinisierung gilt als Ansatzpunkt, um MS-bedingte Behinderungen durch die Verbesserung der endogenen Remyelinisierungsfähigkeit von Oligodendrozyten zu verbessern (Jennings und Carroll 2010). Dabei wird derzeit postuliert, dass dieser Reparaturmechanismus nicht funktioniert, weil OVZ nach demyelinisierenden Ereignissen zwar überwiegend gut in die Läsionen migrieren bzw. proliferieren, dann jedoch nicht vollständig zu Myelin-bildenden Oligodendrozyten ausreifen können (Kuhlmann et al. 2008).

# FGF-9 beeinflusst dosis- und stadienabhängig die Oligodendrogenese in vivo und in vitro

Verschiedene Faktoren wurden bereits als steuernd für die Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozyten im Verlauf der Remyelinisierung identifiziert. FGF-9 wurde erstmals von Naruo et al. (1993) als mitogen wirkender Faktor für OVZ beschrieben.

Cohen und Chandross (2000) inkubierten Oligodendrozyten-Kulturen aus Rattengehirnen verschiedener Oligodendrozyten-Reifungsstadien mit FGF-9. A2B5positive und O4-negative Zellen dienten als Repräsentanten von OVZ, A2B5-negative und O4-positive als Oligodendrozyten mit höherem Reifungsgrad. In beiden Differenzierungsstadien kam es zu einer erhöhten Expression von FGFR-1 und verminderten Expression von FGFR-2 und FGFR-3. Außerdem wurde durch FGF-9 die Expression der Myelinproteine CNP und PLP verändert. Nach 24 Stunden kam es zu einem Anstieg und nach 48 Stunden zu einem Abfall der Expression dieser Proteine.

Die Zellkulturexperimente von Fortin et al. (2005) zeigten einen Effekt von FGF-9 auf differenzierende Oligodendrozyten, markiert durch die Expression von Gal-C und MBP, mit einem vermehrten Wachstum von Zellfortsätzen, vermittelt über den FGFR-2. Gleichzeitig zeigte sich keine Beeinflussung von OVZ, die durch die Marker A2B5 und

O4 identifiziert wurden. Die untersuchten Zellen stammten aus neonatalen Mausgehirnen.

Im Gegensatz dazu berichteten (Lum et al. 2009) von einem verminderten Wachstum von Zellfortsätzen O4-positiver Zellen nach FGF-9-Exposition. Im gleichen Experiment zeigte sich, dass FGF-9 O4-markierte OVZ in ihrer Differenzierung und Proliferation hemmte. Die hier *in-vitro* untersuchten Zellen wurden aus der subventrikulären Zone von erwachsenen C57BL/6-Mäusen gewonnen.

Bisher unveröffentliche *in-vitro*-Studien von Linington et al. zeigten eine dosisabhängige, FGF-9-bedingte Inhibition der Bildung von Myelinscheiden durch differenzierende Oligodendrozyten (Linington et al. 2001, unveröffentliche Daten).

Ebenfalls unveröffentliche Ergebnisse von Mohan und Meinl aus Microarraystudien zeigten eine Hochregulierung von FGF-9 in demyelinisierten gegenüber remyelinisierten Bereichen in MS-Läsionen (Mohan und Meinl 2011, unveröffentlichte Daten).

In der Promotionsarbeit von Dr. Wrzos wurde als Folgeexperiment der hier vorgelegten Ergebnisse ein kontinuierlicher Einfluss von FGF-9 auf demyelinisierte Balken von mit Cuprizon behandelten Mäusen mit Hilfe einer durch einen Virusvektor induzierten FGF-9-Überexpression untersucht. Hier zeigten sich sowohl eine höhere Zelldichte von OVZ, markiert durch Olig-2, als auch von reifen Oligodendrozyten, markiert durch Nogo-A. Das Ausmaß der Remyelinisierung wurde durch die FGF-9-Überexpression jedoch nicht beeinflusst (Wrzos 2011).

## 4.2 Ergebnisse und Deutung

#### Keine Veränderung der Remyelinisierung durch einmalig fokal injiziertes FGF-9 auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene

In der vorliegenden Arbeit mit Fütterung von Cuprizon über 6 Wochen, Injektion von FGF-9 bzw. PBS und Absetzen von Cuprizon 3 bzw. 6 Tage vor der Perfusion, zeigten sich die Corpora callosa licht- und elektronenmikroskopisch gleich stark remyelinisiert. Die in diesem Modell spontan erfolgende Remyelinisierung ließ sich folglich durch die FGF-9-Injektion nicht beeinflussen.

Aus den Arbeiten von Matsushima und Morell (2001) ist bekannt, dass es durch Cuprizonfütterung zu einer maximalen Demyelinisierung des Corpus callosum mit nahezu vollständiger Depletion von reifen Oligodendrozyten und minimalem Myelingehalt nach 5 Wochen kommt. Die Remyelinisierung beginnt dann bereits in der 6. Woche unter Cuprizongabe und läuft lichtmikroskopisch vollständig innerhalb weniger Tage ohne Cuprizondiät mit hohen Erfolgsraten ab.

# Signifikant höhere Dichte von OVZ nach 6-tägiger gegenüber 3-tägiger Remyelinisierungsphase.

Die Zelldichte von OVZ, die NG-2-positiv waren, fiel bei Tieren, die 6 Tage nach Ende der Cuprizondiät geopfert wurden, signifikant höher aus als bei Tieren, die bereits nach 3 Tagen perfundiert wurden. Diese Beobachtung zeigte sich unabhängig davon, ob die Tiere mit FGF-9 oder PBS behandelt wurden.

Dass im Bereich des Balkens Zellvermehrung stattfand, wurde auch durch die Anfärbung von sich in der G1-Phase befindlichen Zellen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 deutlich. Zusammengenommen kann davon ausgegangen werden, dass diese Proliferation mit dem Anstieg NG-2-positiver Zellen die fortlaufende Proliferation von OVZ im Rahmen einer erfolgreichen Remyelinisierung widerspiegelt.

Die Erhöhung der Zelldichte im Verlauf der Remyelinisierung konnte für den zweiten verwendeten OVZ-Marker Olig-2 nicht gezeigt werden. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass Olig-2-exprimierende Zellen sowohl OVZ als auch reife Oligodendrozyten umfassen.

#### Einfluss von FGF-9 auf reife Oligodendrozyten bei Remyelinisierung über 6 Tage

Lässt man die Gruppen der nach 3 Tagen perfundierten Tiere außer Acht, zeigt sich eine signifikant niedrigere Zelldichte Nogo-A-positiver Zellen in der Gruppe der nach 6 Tagen perfundierten Tiere mit FGF-9-Injektion. Durch die Nichtberücksichtigung der Gruppe der Tiere mit Perfusion nach 3 Tagen halbiert sich jedoch die Gruppengröße, wodurch die Verlässlichkeit für die so gefundene statistische Signifikanz im Vergleich zu den anderen Ergebnissen in dieser Arbeit abnimmt.

Nimmt man die Ergebnisse der nach 3 und 6 Tagen perfundierten Tiere zusammen, ergibt sich keine statistische Signifikanz für einen Einfluss von FGF-9 auf Nogo-Apositive Zellen.

#### Signifikant niedrigere Zelldichte myelinisierender Oligodendrozyten durch FGF-9

Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss von FGF-9 auf die Population PLP-mRNAexprimierender Zellen: FGF-9-behandelte Präparate wiesen eine niedrigere Dichte an Zellen auf, die die mRNA für dieses Myelinprotein exprimierten, also aktiv Myelinprotein synthetisierten. Als Ursache für die verminderte Dichte dieser Zellen unter FGF-9 kommt in Frage, dass FGF-9 in der Lage ist, die Differenzierung von OVZ zu Zellen, die Myelinproteine produzieren, zu hemmen, sodass hier weniger dieser Zellen detektiert wurden. Einen ähnlichen Mechanismus postulierten auch Lum et al. (2009), welche eine Hemmung für O4-positive Oligodendrozyten unter FGF-9-Einfluss beschrieben. O4 wird jedoch als Marker einer früheren Differenzierungsstufe, der sogenannten Präoligodendrozyten oder späten Vorläuferzellen, angesehen (Bansal 2002, Baumann und Pham-Dinh 2001).

#### Keine Übereinstimmung in der Suppression Nogo-A- und PLP-mRNAexprimierender Zellen durch FGF-9

FGF-9-Behandlung führte zu einer Reduktion PLP-mRNA-exprimierender Zellen. Eine verminderte Dichte Nogo-A-positiver Zellen durch FGF-9-Injektion konnte nur für Tiere, die nach 6 Tagen perfundiert wurden, gezeigt werden. Dass es nicht zu einem übereinstimmenden Effekt auf diese beiden Zellpopulationen kam, verwundert, da Kuhlmann et al. bei rein mit Cuprizon behandelten Tieren eine nahezu übereinstimmende Anzahl von Nogo-A- und PLP-mRNA-markierten Zellen beschrieben. Als Erklärung für die nicht gänzliche Übereinstimmung ist wahrscheinlich, dass die PLP-mRNA-In-situ-Hybridisierung und Anti-Nogo-A-Antikörper zwar überlappende, jedoch nicht identische Zellpopulationen repräsentieren. Demnach können PLP-mRNA-exprimierende Oligodendrogliazellen zwar bereits Myelinproteine produzieren, sie besitzen jedoch nicht den abgeschlossenen Reifungsgrad einer Nogo-A-positiven Oligodendrogliazelle. Dieser Unterschied der Zellpopulationen könnte darüber hinaus erst durch die Reaktion auf FGF-9 deutlich werden.

Als weitere Ursache der nicht übereinstimmenden Zelldichte kommen technische Unterschiede in der Färbeprozedur, insbesondere der sensiblen In-Situ-Hybridisierungsmethode, in Frage.

## 4.3 Kritische Evaluation

Rückschlüsse auf die Wirkung von FGF-9 anhand der hier dargestellten Daten müssen unter Berücksichtigung der folgenden Kritikpunkte betrachtet werden.

#### Kein Nachweis von FGF-9 durch Antikörperfärbung

Nach Perfusion der Tiere 3 bzw. 6 Tage, nachdem FGF-9 fokal stereotaktisch injiziert worden war, konnte kein Wachstumsfaktor mittels Antikörperfärbung in den Corpora callosa nachgewiesen werden. Somit ist von keiner kontinuierlichen Erhöhung von FGF-9 im Zielgebiet auszugehen. Die Ursache liegt wahrscheinlich im schnellen Abbau des Wachstumsfaktors. Trotzdem ist es denkbar, dass der Effekt des Wachstumsfaktors zeitlich über seine Präsenz im Gewebe hinaus ging. Die Interaktion zwischen Liganden und Zellen generell kann zu einer Modifizierung der Expression oder Funktion der

jeweiligen Rezeptoren, der intrazellulären Signalübertragungswege oder der Transkription von Zielgenen führen (Jessell und Melton 1992). Die Modifizierung der Expression von FGFR und Myelinproteinen ist für FGF-9 *in vitro* gezeigt worden (Cohen und Chandross 2000). Ob diese Wirkungen auf einen dauerhaften FGF-9-Einfluss angewiesen sind, ist nicht geklärt.

#### Remyelinisierung fand möglicherweise bereits vor den stereotaktischen Injektionen statt

Am Ende der 6-wöchigen Cuprizondiät wurden keine Tiere untersucht. Da bekannt ist, dass die Remyelinisierung noch unter dem Kupferchelator bereits nach der 5. Woche beginnt (Matsushima und Morell 2001), muss berücksichtigt werden, dass die hier analysierten Remyelinisierungsprozesse bereits vor dem Zeitpunkt der stereotaktischen Injektionen bzw. vor dem Ende der Cuprizon-Fütterung begonnen haben könnten. Die Frühphase der Remyelinisierung in allen Gruppen stand daher nicht unter dem Einfluss von FGF-9.

#### Kleine Versuchsgruppe erhöht die Möglichkeit statistischer Falschaussage

Das hier nach der statistischen Auswertung angenommene Fehlerniveau von  $\alpha$ =0,05 ist durch die geringe Gruppengröße (n = 18) anfällig. Somit bleibt zu berücksichtigen, dass die errechneten Signifikanzen, die z.T. nur gering unter der definierten Grenze liegen, auch auf einem statistischen Zufall beruhen könnten.

## 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte keine Beeinflussung der Remyelinisierung im Cuprizon-Mausmodell durch den Wachstumsfaktor FGF-9 zeigen. Die Analyse der Dichte von Oligodendrozyten und - vorläuferpopulationen lässt dagegen die Vermutung zu, dass FGF-9 zwar keinen Einfluss auf die hier zeitabhängig stattfindende Proliferation von OVZ hatte, dass die Dichte myelinisierender Oligodendrozyten jedoch durch eine FGF-9-Wirkung vermindert wurde. Eine mögliche Erklärung ist ein Differenzierungsblock von Oligodendrozyten, wie ihn Kuhlmann et al. als eine Ursache der nur unzureichenden Remyelinisierung für die MS postulierten, der hier durch die Behandlung mit FGF-9 ausgelöst würde. Bewiesen werden konnte dieser Effekt für FGF-9 letztendlich nicht. Dies zum einen, weil die Signifikanz der in der PLP-mRNA-In-Situ-Hybridisierung erzielten Ergebnisse, auf der diese Vermutung basiert, gering ist. Insbesondere aber, weil der vermutete Effekt von FGF-9 in diesem Experiment nicht ausschlaggebend für das Ziel der Remyelinisierung - den Myelinaufbau - war.

Dass FGF-9 die Differenzierung zu reifen Oligodendrozyten hemmen sowie den Myelinaufbau behindern könnte, wurde bereits in *in-vitro*-Experimenten gezeigt (Cohen und Chandross 2000, Lum et al. 2009, Linington et al. 2011). Andere Autoren hingegen

konnten die Proliferation von Oligodendrozyten und OVZ durch FGF-9 positiv beeinflussen (Fortin et al. 2005, Naruo et al. 1993). Auch die Arbeit von Wrzos zeigte einen positiven Einfluss auf die Proliferation aller untersuchten oligodendroglialen Zellen, die einer länger andauernden und hohen FGF-9-Konzentration ausgesetzt waren (Wrzos 2011).

Eine mögliche Erklärung für den nicht übereinstimmenden Effekt von FGF-9 auf Oligodendroglia in verschiedenen Studien könnte sein, dass die Wirkungen sowohl oligodendrozytenstadien- als auch dosisabhängig sind. Hinweise für die Abhängigkeit der Wirkung von FGF-9 von der Konzentration des Wachstumsfaktors hatten zuvor auch Linington sowie Cohen und Chandross gesammelt. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die hier diskutierten Erkenntnisse an verschiedenen Mausstämmen gewonnen wurden und sich die Experimente durch die verwendeten Marker der Oligodendrozyten-Differenzierungsstufen unterscheiden.

Für zukünftige Studien wäre es interessant, die Remyelinisierung im Cuprizonmodell unter verschiedene Konzentrationen des Wachstumsfaktors zu stellen, um herauszufinden, ob der Effekt von FGF-9 auf oligodendrogliale Zellen tatsächlich dosisabhängig ist. Bisher liegen dazu die Erkenntnisse dieser Arbeit mit Konzentrationen von FGF-9 von 100ng vor, die 3 bzw. 6 Tage nach einmaliger Injektion nicht mehr nachweisbar waren, und die Ergebnisse von Wrzos mit einer permanenten und hohen, jedoch nicht genau definierten FGF-9-Konzentration. Ideal wäre eine perfusorartige Injektionsmöglichkeit in den Liqourraum mit wählbaren FGF-9-Konzentrationen.

Eine etablierte Möglichkeit, die Konzentration des Wachstumsfaktor mäßig zu erhöhen, könnte die Konjugation an Polyethylenglycol bieten. Dies könnte zu einem verlangsamten Abbau und zudem besserer Gewebegängigkeit führen (Kang et al. 2010; Wang et al. 2010).

Es stellt sich weiterhin die Frage, wie FGF-9 wirkt. Gibt es allein eine direkte Wirkung über die bekannten FGFR auf Oligodendrozyten oder kommen indirekte Effekte, wie z.B. die Beeinflussung von Entzündungsreaktionen bzw. die Steuerung über andere Zellpopulationen hinzu? Um diese Fragen zu klären, wäre eine Untersuchung von Mausstämmen mit gliazellspezifischer Deletion von FGF-Rezeptoren hilfreich.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des *Fibroblast Growth Factor 9* (FGF-9) auf die Remyelinisierung in einem Modell der Multiplen Sklerose untersucht.

Dafür wurde ein Mausmodell benutzt, bei dem es durch Fütterung von Cuprizon zu Oligodendrozytentod und Demyelinisierung kommt sowie nach Absetzen des Kupferchelators zu Remyelinisierung. FGF-9 wurde zum Zeitpunkt des Absetzens des toxischen Futters stereotaktisch in den Balken der Tiere injiziert. Der Fortschritt der Remyelinisierung wurde an zwei Zeitpunkten analysiert, weshalb eine Hälfte der Tiere nach 3 Tagen und die andere Hälfte nach 6 Tagen perfundiert und histologisch untersucht wurde.

Die Beeinflussung von Remyelinisierung durch FGF-9 wurde auf 3 Ebenen beurteilt. (1) Die lichtmikroskopische Analyse der Remyelinisierung zeigte keinen Einfluss einer Behandlung mit FGF-9. (2) Auch in der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigte sich keine Beeinflussung der Anzahl remyelinisierter Fasern durch eine FGF-9-Behandlung. (3) Durch die Antikörper-vermittelte Anfärbung und Quantifizierung verschiedener Oligodendroglia-Populationen konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: Während fortlaufender Remyelinisierung kam es zu einer Vermehrung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Dies zeigte sich an einer signifikant höheren Zahl von NG-2-markierten Zellen in Tieren, die 6 Tage nach Absetzen von Cuprizon untersucht wurden. Außerdem konnte ein Einfluss von FGF-9 auf die Population myelinbildender Zellen nachgewiesen werden. Die Dichte von Zellen, die das Myelinprotein PLP exprimierten, war bei FGF-9-behandelten Präparaten signifikant niedriger. Die Dichte reifer, Nogo-A-exprimierender Zellen war in der FGF-9-behandelten Versuchsgruppe an Tag 6, jedoch nicht an Tag 3 erniedrigt.

Dass FGF-9 einen Einfluss auf Oligodendroglia in vitro hat, ist vorbeschrieben. Dabei gibt es jedoch keine übereinstimmende Aussage, ob der Wachstumsfakor proliferationshemmend oder -fördernd auf die Oligodendrogliagenese wirkt. Zudem fehlt der Nachweis, ob dies auch die Remyelinisierung beeinflusst. In dem hier durchgeführten in-vivo-Experiment konnte dieser Schritt ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Zellzählungen lassen jedoch vermuten, dass FGF-9 einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung von Oligodendrozyten zu myelinbildenen Oligodendrozyten hat. Somit ist FGF-9 ein möglicher Induktor eines Differenzierungsblockes. In der Literatur wird eine solche Hemmung der Ausreifung von Oligodendrozyten als Ursache für die bei MS-Patienten unvollständig ablaufende Remyelinisierung postuliert. Unzureichende Remyelinisierung gilt als Korrelat der nicht vollständigen Kompensation von Behinderungen, die im Verlauf der autoimmunen Entzündungsschübe bei Multipler Sklerose entstehen.

## 6 Literaturverzeichnis

Acs P and Kalman B (2012): "Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model." Methods Mol Biol <u>900</u>: 403-31.

Acs P and Komoly S (2012): "Selective ultrastructural vulnerability in the cuprizone-induced experimental demyelination." Ideggyogy Sz <u>65</u>(7-8): 266-70.

Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ and Stiles CD (2004): "bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS." Science <u>306</u>(5704): 2111-5.

Bansal R (2002): "Fibroblast growth factors and their receptors in oligodendrocyte development: implications for demyelination and remyelination." Dev Neurosci 24(1): 35-46.

Baumann N and Pham-Dinh D (2001): "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." Physiol Rev <u>81</u>(2): 871-927.

Benardais K, Kotsiari A, Skuljec J, Koutsoudaki P N, Gudi V, Singh V, Vulinovic F, Skripuletz T and Stangel M (2013): "Cuprizone [Bis(Cyclohexylidenehydrazide)] is Selectively Toxic For Mature Oligodendrocytes." Neurtox Res. [Epub ahead of print]

Bitsch A and Brück W (2002): "Differentiation of multiple sclerosis subtypes: implications for treatment." CNS Drugs 16(6): 405-18.

Blakemore WF (1973): "Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone." J Neurol Sci 20(1): 73-83.

Brück W (2005 a): "Clinical implications of neuropathological findings in multiple sclerosis." J Neurol <u>252 Suppl 3</u>: iii10-iii14.

Brück W (2005 b): "The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage." J Neurol <u>252 Suppl 5</u>: v3-9.

Brück W, Kuhlmann T and Stadelmann C (2003): "Remyelination in multiple sclerosis." J Neurol Sci <u>206</u>(2): 181-5.

Chari DM (2007): "Remyelination in multiple sclerosis." Int Rev Neurobiol <u>79</u>: 589-620.

Chari DM and Blakemore WF (2002): "Efficient recolonisation of progenitor-depleted areas of the CNS by adult oligodendrocyte progenitor cells." Glia 37(4): 307-13.

Chitnis T (2006): "Pediatric multiple sclerosis." Neurologist <u>12(6)</u>: 299-310.

Cohen RI and Chandross KJ (2000): "Fibroblast growth factor-9 modulates the expression of myelin related proteins and multiple fibroblast growth factor receptors in developing oligodendrocytes." J Neurosci Res 61(3): 273-87.

Compston A and Coles A (2002): "Multiple sclerosis." Lancet 359(9313): 1221-31.

Costantino CM, Baecher-Allan C and Hafler DA (2008): "Multiple sclerosis and regulatory T cells." J Clin Immunol <u>28</u>(6): 697-706.

Dean G and Elian M (1997): "Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>63</u>(5): 565-8.

Dubois-Dalcq M, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B, Zalc B and Lubetzki C (2008): "From fish to man: understanding endogenous remyelination in central nervous system demyelinating diseases." Brain <u>131(Pt 7)</u>: 1686-700.

Fancy SP, Zhao C and Franklin RJ (2004): "Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS." Mol Cell Neurosci <u>27</u>(3): 247-54.

Fasbender P and Kolmel HW (2008): "Incidence of multiple sclerosis in the urban area of Erfurt, Thuringia, Germany." Neuroepidemiology <u>30(3)</u>: 147-51.

Fortin D, Rom E, Sun H, Yayon A and Bansal R (2005): "Distinct fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage." J Neurosci <u>25</u>(32): 7470-9.

Franklin RJ (2002): "Why does remyelination fail in multiple sclerosis?" Nat Rev Neurosci <u>3(9)</u>: 705-14.

Franklin RJ, Zhao C and Sim FJ (2002): "Ageing and CNS remyelination." Neuroreport <u>13(7)</u>: 923-8.

Geier DA and Geier MR (2005): "A case-control study of serious autoimmune adverse events following hepatitis B immunization." Autoimmunity <u>38(4)</u>: 295-301.

Goldschmidt T, Antel J, Konig FB, Brück W and Kuhlmann T (2009): "Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity." Neurology  $\underline{72}(22)$ : 1914-21.

Gonsette RE (2008): "Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity." J Neurol Sci 274(1-2): 48-53.

Green PJ, Walsh FS and Doherty P (1996): "Promiscuity of fibroblast growth factor receptors." Bioessays <u>18</u>(8): 639-46.

Gronlie SA, Myrvoll E, Hansen G, Gronning M and Mellgren SI (2000): "Multiple sclerosis in North Norway, and first appearance in an indigenous population." J Neurol <u>247</u>(2): 129-33.

Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander E S, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, et al. (2007): "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study." N Engl J Med <u>357</u>(9): 851-62.

Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Oksenberg JR, Lincoln R, Zhang DY, Banatao DR, et al. (1998): "Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group." Hum Mol Genet <u>7</u>(8): 1229-34.

Hein T and Hopfenmuller W (2000): "[Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]." Nervenarzt <u>71</u>(4): 288-94.

Hogancamp WE, Rodriguez M and Weinshenker BG (1997): "The epidemiology of multiple sclerosis." Mayo Clin Proc <u>72(9)</u>: 871-8.

Huang JY, Hong YT and Chuang JI (2009): "Fibroblast growth factor 9 prevents MPP+-induced death of dopaminergic neurons and is involved in melatonin neuroprotection in vivo and in vitro." J Neurochem <u>109</u>(5): 1400-12.

Ibanez C, Shields SA, El-Etr M, Baulieu EE, Schumacher M and Franklin RJ (2004): "Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats." Neuropathol Appl Neurobiol <u>30</u>(1): 80-9.

Itoyama Y, Webster HD, Richardson EP, Jr. and Trapp BD (1983): "Schwann cell remyelination of demyelinated axons in spinal cord multiple sclerosis lesions." Ann Neurol 14(3): 339-46.

Jennings A and Carroll W (2010): "Quantification of oligodendrocyte progenitor cells in human and cat optic nerve: implications for endogenous repair in multiple sclerosis." Glia <u>58</u>(12): 1425-36.

Jessell TM and Melton DA (1992): "Diffusible factors in vertebrate embryonic induction." Cell <u>68</u>(2): 257-70.

Kalman B and Lublin FD (1999): "The genetics of multiple sclerosis. A review." Biomed Pharmacother 53(8): 358-70.

Kanda T, Iwasaki T, Nakamura S, Ueki A, Kurokawa T, Ikeda K and Mizusawa H (1999): "FGF-9 is an autocrine/paracrine neurotrophic substance for spinal motoneurons." Int J Dev Neurosci <u>17</u>(3): 191-200.

Kang CE, Tator CH and Shoichet MS (2010): "Poly(ethylene glycol) modification enhances penetration of fibroblast growth factor 2 to injured spinal cord tissue from an intrathecal delivery system." J Control Release <u>144(1)</u>: 25-31.

Keirstead HS and Blakemore WF (1997): "Identification of post-mitotic oligodendrocytes incapable of remyelination within the demyelinated adult spinal cord." J Neuropathol Exp Neurol <u>56</u>(11): 1191-201.

Koch-Henriksen N and Sorensen PS (2010): "The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology." Lancet Neurol 9(5): 520-32.

Korn T (2008): "Pathophysiology of multiple sclerosis." J Neurol 255 Suppl 6: 2-6.

Kotter MR, Zhao C, van Rooijen N and Franklin RJ (2005): "Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression." Neurobiol Dis <u>18</u>(1): 166-75.

Kotter MR, Li WW, Zhao C and Franklin RJ (2006): "Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation." J Neurosci 26(1): 328-32.

Kotter MR, Stadelmann C and Hartung HP (2011): "Enhancing remyelination in disease--can we wrap it up?" Brain <u>134</u>(Pt 7): 1882-900.

Kuhlmann T, Remington L, Maruschak B, Owens T and Brück W (2007): "Nogo-A is a reliable oligodendroglial marker in adult human and mouse CNS and in demyelinated lesions." J Neuropathol Exp Neurol <u>66</u>(3): 238-46.

Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J and Brück W (2008): "Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis." Brain <u>131</u>(Pt 7): 1749-58.

Kurtzke JF (1977): "Geography in multiple sclerosis." J Neurol 215(1): 1-26.

Kurtzke JF (1993): "Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection." Clin Microbiol Rev <u>6</u>(4): 382-427.

Lassmann H (2008): "Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair." Curr Opin Neurol <u>21(3)</u>: 242-7.

Lassmann H, Brück W and Lucchinetti CF (2007): "The immunopathology of multiple sclerosis: an overview." Brain Pathol <u>17</u>(2): 210-8.

Linington C et al., University of Glasgow: persönliche Mitteilung 2011

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M and Lassmann H (1999): "A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases." Brain <u>122 (Pt 12)</u>: 2279-95.

Lum M, Turbic A, Mitrovic B and Turnley AM (2009): "Fibroblast growth factor-9 inhibits astrocyte differentiation of adult mouse neural progenitor cells." J Neurosci Res <u>87(10)</u>: 2201-10.

Marchionni MA, Cannella B, Hoban C, Gao YL, Garcia-Arenas R, Lawson D, Happel E, Noel F, Tofilon P, Gwynne D, et al. (1999): "Neuregulin in neuron/glial interactions in the central nervous system. GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocyte progenitor expansion, and enhances remyelination." Adv Exp Med Biol <u>468</u>: 283-95.

Marrie RA (2004): "Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology." Lancet Neurol  $\underline{3}(12)$ : 709-18.

Matsushima GK and Morell P (2001): "The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system." Brain Pathol 11(1): 107-16.

Matute C, Alberdi E, Domercq M, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A and Sanchez-Gomez MV (2001): "The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases." Trends Neurosci <u>24</u>(4): 224-30.

McKinnon RD, Piras G, Ida JA, Jr. and Dubois-Dalcq M (1993): "A role for TGF-beta in oligodendrocyte differentiation." J Cell Biol <u>121(6)</u>: 1397-407.

McQuaid S, Cunnea P, McMahon J and Fitzgerald U (2009): "The effects of bloodbrain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis." Biochem Soc Trans <u>37</u>(Pt 1): 329-31.

Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D and Alvarez-Buylla A (2006): "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain." J Neurosci <u>26</u>(30): 7907-18.

Mi S, Miller RH, Tang W, Lee X, Hu B, Wu W, Zhang Y, Shields CB, Miklasz S, Shea D, et al. (2009): "Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells." Ann Neurol <u>65</u>(3): 304-15.

Minagar A and Alexander J S (2003): "Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis." Mult Scler 9(6): 540-9.

Mohan H and Meinl E, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried: persönliche Mitteilung 2011

Murtie JC, Zhou YX, Le TQ, Vana AC and Armstrong RC (2005): "PDGF and FGF2 pathways regulate distinct oligodendrocyte lineage responses in experimental demyelination with spontaneous remyelination." Neurobiol Dis <u>19</u>(1-2): 171-82.

Nakamura S, Todo T, Haga S, Aizawa T, Motoi Y, Ueki A, Kurokawa T and Ikeda K (1997): "Motor neurons in human and rat spinal cord synthesize fibroblast growth factor-9." Neurosci Lett <u>221</u>(2-3): 181-4.

Nakamura S, Todo T, Motoi Y, Haga S, Aizawa T, Ueki A and Ikeda K (1999): "Glial expression of fibroblast growth factor-9 in rat central nervous system." Glia <u>28(1)</u>: 53-65.

Naruo K, Seko C, Kuroshima K, Matsutani E, Sasada R, Kondo T and Kurokawa T (1993): "Novel secretory heparin-binding factors from human glioma cells (gliaactivating factors) involved in glial cell growth. Purification and biological properties." J Biol Chem <u>268</u>(4): 2857-64.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M and Weinshenker BG (2000): "Multiple sclerosis." N Engl J Med <u>343(13)</u>: 938-52.

Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen P S, Brück W, Lucchinetti C and Lassmann H (2006): "Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients." Brain <u>129</u>(Pt 12): 3165-72.

Paus T and Toro R (2009): "Could Sex Differences in White Matter be Explained by g ratio?" Front Neuroanat <u>3</u>: 14.

Polito A and Reynolds R (2005): "NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system." J Anat <u>207(6)</u>: 707-16.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, et al. (2005): "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria"." Ann Neurol <u>58</u>(6): 840-6.

Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L and Milanov I (2006): "The epidemiology of multiple sclerosis in Europe." Eur J Neurol <u>13</u>(7): 700-22.

Racke MK (2008): "The role of B cells in multiple sclerosis: rationale for B-cell-targeted therapies." Curr Opin Neurol <u>21 Suppl 1</u>: S9-S18.

Ragonese P, Aridon P, Salemi G, D'Amelio M and Savettieri G (2008): "Mortality in multiple sclerosis: a review." Eur J Neurol <u>15(2)</u>: 123-7.

Redwine JM and Armstrong RC (1998): "In vivo proliferation of oligodendrocyte progenitors expressing PDGFalphaR during early remyelination." J Neurobiol <u>37</u>(3): 413-28.

Rodriguez M (2003): "A function of myelin is to protect axons from subsequent injury: implications for deficits in multiple sclerosis." Brain <u>126</u>(Pt 4): 751-2.

Sadovnick AD, Yee IM and Ebers GC (2000): "Factors influencing sib risks for multiple sclerosis." Clin Genet 58(6): 431-5.

Sim FJ, Zhao C, Penderis J and Franklin RJ (2002): "The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation." J Neurosci <u>22</u>(7): 2451-9.

Stadelmann C and Brück W (2008): "Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis." J Neurol <u>255 Suppl 1</u>: 12-8.

Syed YA, Hand E, Mobius W, Zhao C, Hofer M, Nave KA and Kotter MR (2011): "Inhibition of CNS remyelination by the presence of semaphorin 3A." J Neurosci 31(10): 3719-28.

Thompson A (2004): "Overview of primary progressive multiple sclerosis (PPMS): similarities and differences from other forms of MS, diagnostic criteria, pros and cons of progressive diagnosis." Mult Scler <u>10 Suppl 1</u>: S2-7.

Todo T, Kondo T, Nakamura S, Kirino T, Kurokawa T and Ikeda K (1998): "Neuronal localization of fibroblast growth factor-9 immunoreactivity in human and rat brain." Brain Res <u>783</u>(2): 179-87.

Tzartos JS, Khan G, Vossenkamper A, Cruz-Sadaba M, Lonardi S, Sefia E, Meager A, Elia A, Middeldorp J M, Clemens M, et al. (2012): "Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions." Neurology <u>78</u>(1): 15-23.

Uitdehaag BM, Kappos L, Bauer L, Freedman MS, Miller D, Sandbrink R and Polman CH (2005): "Discrepancies in the interpretation of clinical symptoms and signs in the diagnosis of multiple sclerosis. A proposal for standardization." Mult Scler <u>11</u>(2): 227-31.

Vanderlocht J, Hellings N, Hendriks J J, Vandenabeele F, Moreels M, Buntinx M, Hoekstra D, Antel JP and Stinissen P (2006): "Leukemia inhibitory factor is produced by myelin-reactive T cells from multiple sclerosis patients and protects against tumor necrosis factor-alpha-induced oligodendrocyte apoptosis." J Neurosci Res <u>83</u>(5): 763-74.

Wang Y, Cooke MJ, Lapitsky Y, Wylie RG, Sachewsky N, Corbett D, Morshead CM and Shoichet MS (2010): "Transport of epidermal growth factor in the stroke-injured brain." J Control Release <u>149</u>(3): 225-35.

Waxman SG (2006): "Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels." Nat Rev Neurosci  $\underline{7}(12)$ : 932-41.

Wegner C and Stadelmann C (2009): "Gray matter pathology and multiple sclerosis." Curr Neurol Neurosci Rep <u>9</u>(5): 399-404.

Wegner M (2001): "Expression of transcription factors during oligodendroglial development." Microsc Res Tech <u>52(6)</u>: 746-52.

Willer CJ, Dyment DA, Cherny S, Ramagopalan SV, Herrera BM, Morrison KM, Sadovnick AD, Risch NJ and Ebers GC (2007): "A genome-wide scan in forty large pedigrees with multiple sclerosis." J Hum Genet <u>52</u>(12): 955-62.

Windrem MS, Nunes MC, Rashbaum WK, Schwartz TH, Goodman RA, McKhann G, 2nd, Roy NS and Goldman SA (2004): "Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain." Nat Med 10(1): 93-7.

Wolswijk G (2002): "Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord." Brain <u>125(Pt 2)</u>: 338-49.

Woodruff RH, Fruttiger M, Richardson WD and Franklin RJ (2004): "Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination." Mol Cell Neurosci <u>25(2)</u>: 252-62.

Wrzos C: "The role of astrocytes for oligodendrocyte death and remyelination." Rer. Nat. Diss. 2011

Zivadinov R, Iona L, Monti-Bragadin L, Bosco A, Jurjevic A, Taus C, Cazzato G and Zorzon M (2003): "The use of standardized incidence and prevalence rates in epidemiological studies on multiple sclerosis. A meta-analysis study." Neuroepidemiology <u>22</u>(1): 65-74.

# 7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung		
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase		
BCIP	Bromchlorindolylphosphat		
DAB	Diaminobenzidin		
DEPC	Diethylcarbonat		
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis		
EBV	Epstein-Barr-Virus		
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)		
KG	Körpergewicht		
MBP	Myelin-Basisches Protein		
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)		
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein		
MS	Multiple Sklerose		
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid		
OVZ	Oligodendrozytenvorläuferzellen		
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Saline)		
PFA	Paraformaldehyd		
PLP	Proteolipid-Protein		
PPMS	Primary Progressive MS (Primär Progressive MS)		
RRMS	Relapsing Remitting MS (Schubförmig Remittierende MS)		
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)		
SPMS	Secondary Progressive MS (Sekundär Progrediente MS)		
SSC	Standard Saline Citrate		
TBS	Tris-buffered Saline (Trisaminomethan-gepufferte Saline)		

## **Danksagung**

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück und Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler für die Möglichkeit der Dissertation in der Abteilung für Neuropathologie und die Bereitstellung des Themas. Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler gilt mein besonderer Dank für ihre freundliche, konstruktive Kritik und Verbesserungsvorschläge. Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Claudia Wrzos für Ihre Unterstützung bedanken, insbesondere für die vielen Male, in denen sie kurzfristig eine Besprechung möglich machen konnte.

Für die Zusammenarbeit und Hilfe im Labor möchte ich mich bei den Mitarbeitern im Labor der Neuropathologie bedanken. Das freundliche Klima war ansteckend und ermutigend und daher außergewöhnlich.