

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Charakterisierung der Oligodendroglia in akuten und chronischen Entmarkungsläsionen der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Nadine Katharina Theresia Seitz

aus

Nürnberg

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. F. Odoardi

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Charakterisierung der Oligodendroglia in akuten und chronischen Entmarkungsläsionen der Maus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.2.1 Genetische Faktoren.....	2
1.1.2.2 Umweltfaktoren.....	2
1.1.3 Klinik der MS.....	3
1.1.3.1 Symptome	3
1.1.3.2 Verlaufsformen	3
1.1.4 Diagnose	4
1.1.5 Therapie	5
1.1.6 Histopathologie.....	6
1.1.6.1 Histologische Klassifizierungen der MS-Läsionen.....	7
1.1.6.2 Makrophagen in MS-Läsionen	7
1.1.6.3 Marker für Makrophagen	8
1.1.6.4 Remyelinisierung der MS-Läsionen.....	8
1.1.7 Immunpathologie	9
1.2 Tiermodelle der MS.....	10
1.2.1 Überblick.....	10
1.2.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).....	11
1.2.2.1 Die spontane EAE	12
1.3 Oligodendrozyten.....	13
1.3.1 Funktion.....	13
1.3.2 Entwicklung.....	15
1.3.3 Transkriptionsfaktoren und Myelinproteine	16
1.3.3.1 Olig1/Olig2.....	17
1.3.3.2 NogoA.....	17
1.3.3.3 MBP.....	18
1.3.4 Oligodendrozyten in MS-Läsionen.....	18
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Versuchstiere	21
2.1.1 Eigenschaften und Aufzucht	21
2.1.2 Klinische Einteilung.....	21
2.1.3 Genotypisierung	22

2.1.3.1	Materialien	25
2.1.4	Perfusion und Präparation	25
2.1.4.1	Materialien	26
2.2	Histologische Färbungen.....	26
2.2.1	LFB-PAS-Färbung	26
2.2.1.1	Prinzip	26
2.2.1.2	Ablauf.....	26
2.2.1.3	Materialien	27
2.2.2	Bielschowsky-Versilberung.....	28
2.2.2.1	Prinzip	28
2.2.2.2	Ablauf.....	28
2.2.2.3	Materialien	28
2.2.3	Immunhistochemische Färbungen	29
2.2.3.1	Prinzip der LSAB-Methode.....	29
2.2.3.2	Ablauf (LSAB-Methode).....	29
2.2.3.3	Prinzip der APAAP-Methode	30
2.2.3.4	Ablauf (APAAP-Methode)	30
2.2.3.5	Materialien	31
2.2.3.6	Verwendete Antikörper.....	32
2.2.4	Auswertung und Statistik	33
2.2.4.1	Materialien	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Die Demyelinisierung nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer ab.....	35
3.2	Die Dichte der Olig2-positiven Oligodendrozyten ist in den chronischen EAE-Läsionen reduziert.....	37
3.3	Die Dichte der NogoA-positiven Oligodendrozyten ist in den akuten und späten chronischen EAE-Läsionen reduziert.....	39
3.4	Die Dichte frisch eingewanderter Entzündungszellen ist nur in akuten EAE-Läsionen stark erhöht.....	42
3.5	Die Makrophagenaktivität nimmt in chronischen EAE-Läsionen ab	45
3.6	Die Axondichte in den Läsionen nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer ab.....	46
4	Diskussion	49
4.1	Das akute Krankheitsstadium geht mit hohem Demyelinisierungsausmaß und hoher Immunezellinfiltration einher.....	49
4.2	Die chronischen Krankheitsstadien deuten trotz Reduktion der Läsionsgröße auf eine Inaktivität der Läsionen hin.....	51
4.3	Die Reduktion der Axondichte spricht für eine mögliche Atrophie der Läsionen.....	55
4.4	Chronische Läsionen im spontanen doppelt-transgenen EAE-Modell spiegeln Merkmale inaktiver MS-Läsionen wider.....	56
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	57
5	Zusammenfassung.....	59
6	Literaturverzeichnis	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Oligodendrozytenreifung mit Transkriptionsfaktoren und Myelinproteinen	16
Abbildung 2: Versuchsaufbau mit Zeitpunkten der Untersuchung.....	35
Abbildung 3: Rückenmarksquerschnitte mit Läsionsflächen	36
Abbildung 4: Das demyelinisierte Areal nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer ab	37
Abbildung 5: Rückenmarksausschnitte mit Olig2-positiven Oligodendrozyten.....	38
Abbildung 6: Die Dichte der Olig2-positiven Oligodendrozyten ist in den chronisch erkrankten Mäusen um etwa die Hälfte reduziert.....	39
Abbildung 7: Rückenmarksausschnitte mit NogoA-positiven Oligodendrozyten	40
Abbildung 8: Die Dichte der NogoA-positiven Oligodendrozyten ist in den akuten und späten chronischen EAE-Läsionen reduziert.....	41
Abbildung 9: Rückenmarksausschnitte mit S100A9-positiven Zellen.....	43
Abbildung 10: Die Dichte der S100A9-positiven Zellen ist nur in den akuten EAE-Läsionen stark erhöht	44
Abbildung 11: Scores der Makrophagen-Morphologie.....	45
Abbildung 12: Rückenmarksausschnitte mit Axonen	47
Abbildung 13: Die Axondichte nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer ab.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Mäuse	21
Tabelle 2: Master-Mix für die 2D2-Genotypisierung.....	23
Tabelle 3: 2D2-Primersequenzen	23
Tabelle 4: Master-Mix für die MOG-IgG-Genotypisierung.....	23
Tabelle 5: MOG-IgG-Primersequenzen	24
Tabelle 6: Thermocycler-Programm für die 2D2-PCR	24
Tabelle 7: Thermocycler-Programm für die MOG-IgG-PCR	24
Tabelle 8: Verwendete Materialien und Geräte bei der Genotypisierung	25
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Geräte	26
Tabelle 10: Verwendete Reagenzien bei der LFB-PAS-Färbung.....	27
Tabelle 11: Verwendete Reagenzien bei der Bielschowsky-Versilberung.....	28
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien und Geräte bei den immunhistochemischen Färbungen.....	31
Tabelle 13: Primärantikörper	32
Tabelle 14: Sekundärantikörper.....	33
Tabelle 15: Verwendete Materialien bei der histologischen Auswertung	34
Tabelle 16: Verteilung der Mäuse auf die Scores der Makrophagen-Morphologie.....	46

Abkürzungsverzeichnis

APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CNP	Cyclonukleotid-Phosphodiesterase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	<i>expanded disability status scale</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IgH	<i>immunoglobulin heavy chain</i>
IF	Interferon
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LFB	<i>luxol-fast-blue</i>
LSAB	Labelled Strept-Avidin-Biotin-Methode
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-basisches Protein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NRG	Neuregulin
OPC	<i>oligodendrocyte progenitor cell</i>
OSE	Opticospinale Enzephalomyelitis
PAS	<i>periodic acid Schiff</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFR- α	Platelet-derived growth factor α -Rezeptor
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PP-MS	<i>primary progressive multiple sclerosis</i>

Pre-OL	Prämyelinisierender Oligodendrozyt
PR-MS	<i>progressive relapsing multiple sclerosis</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RR-MS	<i>relapsing remitting multiple sclerosis</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
SP-MS	<i>secondary progressive multiple sclerosis</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tg	transgen
TMEV	<i>Theiler's murine encephalomyelitis virus</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VEP	Visuell evoziertes Potential
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch inflammatorische Entmarkungserkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Sie zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen des ZNS bei jungen Erwachsenen (Hemmer et al. 2003; Saguil et al. 2014).

Die morphologischen Kennzeichen der MS-Läsionen sind neben der Entzündung und der Demyelinisierung auch die Gliose und die axonale Schädigung. Der Entstehungsmechanismus ist noch nicht genau geklärt. Aus Studien zur Oligodendrozytenpathologie wird eine heterogene Pathogenese angenommen (Brück et al. 1997; Kieseier und Hartung 2003).

Die demyelinisierten Plaques finden sich im gesamten ZNS, wobei sie bevorzugt im Hirnstamm, Nervus opticus, Rückenmark und periventrikulärer weißer Substanz anzutreffen sind (Lucchinetti et al. 1998).

1.1.1 Epidemiologie

Die globale Verbreitung der MS gleicht einem Nord-Süd-Gefälle auf der Nordhalbkugel und auf der Südhalbkugel einem Süd-Nord-Gefälle. Demnach ist die Verbreitung am Äquator, d. h. in tropischen wie subtropischen Gebieten am geringsten. Die höchste Prävalenz an MS zu erkranken besteht in Europa, Nordamerika, Südastralien und Neuseeland, nachfolgend Südeuropa, Süden der USA und der nördliche Teil Australiens. Bei negrider und mongoloider Abstammung sowie in den nördlichen Regionen Asiens und in Afrika, außer der weißen Gruppe in Südafrika, tritt die MS seltener auf (Kurtzke 1980).

Laut epidemiologischer Studien wird von einer Erkrankungsrate von etwa 2,5 Million Menschen weltweit ausgegangen, wobei das Manifestationsalter zwischen 17 und 65 Jahren liegt und im 20. bis 40. Lebensjahr gipfelt. Die Inzidenz ist generell bei Frauen ungefähr doppelt so hoch wie bei Männern. In Deutschland gibt es ca. 122.000 Patient*innen. Somit ergibt sich eine Prävalenzrate von 149,1 auf 100.000 Einwohner (Hein und Hopfenmüller 2000; Boiko et al. 2002; Kantarcia und Wingerchukb 2006; Ransohoff 2012).

1.1.2 Ätiologie

Die Erstbeschreibung des Krankheitsverlaufes der MS erfolgte durch Jean-Martin Charcot im Jahr 1868. Er arbeitete als Neurologe des Hôpital de Salpêtrière und hat die MS als „La sclérose en plaques“ definiert. Er machte die drei zuverlässigsten Indikatoren, den

Intentionstremor, Nystagmus und Dysarthrie aus, die demnach als Charcot-Trias benannt wurden (Orrell 2005).

Nach heutigem Wissensstand ist MS eine Autoimmunerkrankung, bei der die T-Lymphozyten eine tragende Rolle spielen, wobei genetische und Umweltfaktoren ebenfalls als Prädispositionsfaktoren einwirken (Zamvil und Steinman 2003).

1.1.2.1 Genetische Faktoren

Die genetischen Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS, wie es sich bei Familienstudien zeigte. Bei Vergleichsstudien von monozygoten sowie dizygoten Zwillingen wurde eine Konkordanz von 30 – 35% der Monozygoten gegenüber 2 – 5% der Dizygoten ermittelt. Verwandte ersten Grades von MS-Patient*innen haben ein zehn- bis zwanzigfaches Risiko zu erkranken (Zamvil und Steinman 2003).

Es ist aufgrund genetischer Analyse eine gewisse Assoziation des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*/MHC), speziell des Humanen Leukozytenantigens (HLA) auf dem sechsten Chromosom (6p21), mit MS bekannt (Herrera und Ebers 2003).

Somit wird die MS am häufigsten mit dem Chromosom 6p21 in Beziehung gebracht. Das Chromosom enthält Gene, die für Moleküle des HLA-D kodieren. Diese hochpolymorphen Moleküle präsentieren den CD4+ T-Zellen die Peptidantigene.

Das Risiko an MS zu erkranken, ist bei Menschen mit dem Allel HLA-DR2 um das drei- bis vierfache erhöht. Genombasierte Studien zeigten jedoch, dass das Zusammenwirken mehrerer Gene, sowohl innerhalb als auch außerhalb des HLA-Komplexes, das Risiko für MS erhöhen können. So kann man bei der MS von einer Polygenie sprechen (Zamvil und Steinman 2003).

Eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) zeigte u. a., dass genetische Merkmale der MS auch bei organspezifischen Entzündungskrankheiten, z. B. der rheumatoiden Arthritis und bei entzündlichen Darmerkrankungen zu finden sind (Ransohoff 2012).

1.1.2.2 Umweltfaktoren

Dass auch Umweltfaktoren eine Rolle bei der MS spielen, zeigt sich durch Migrationsstudien. Eine ließ erkennen, dass Kinder, die vor dem 15. Lebensjahr von einem niedrigen in ein Land mit hohem MS-Risiko zogen, das Risiko des Einreiselandes annahmen bzw. umgekehrt, wobei ein Umzug im Erwachsenenalter keine Veränderung mehr bewirkt (Kurtzke 2000).

Als weitere Umweltfaktoren werden z. B. der geringe Vitamin-D-Spiegel aufgrund von mangelhafter Sonnenlichtexposition und Rauchen genannt. Eine Assoziation mit viralen Infekten, beispielsweise eine Epstein-Barr-Virus-Infektion, in Beziehung zur MS wird angenommen (Ascherio et al. 2012).

Hinsichtlich genetischer wie epidemiologischer Erkenntnisse müssen ein oder mehrere Umweltfaktoren bzw. infektiöse Agenzien ebenfalls an der Krankheitsentstehung beteiligt sein.

1.1.3 Klinik der MS

1.1.3.1 Symptome

MS ist durch das Auftreten von demyelinisierenden Läsionen im ZNS gekennzeichnet. Physiologisch wirkt das Myelin als elektrischer Isolator. Es ummantelt das Axon und ermöglicht, durch die sogenannten Ranvier'schen Schnürringe bedingt, eine saltatorische Weiterleitung der Aktionspotentiale. Aufgrund der fortschreitenden Demyelinisierung kommt es zu einer Leitungsverlangsamung und bisweilen zum Verlust der Erregungsfortleitung, was die neurologische Störung der MS-Patient*innen ausmacht (Nave 2010a; Nave 2010b).

Durch Schädigung des ZNS (Hirnnerven, Pyramidenbahnen, sensibles System und Kleinhirn) treten die neurologischen Ausfälle in Folge des Läsionsortes auf, wodurch die Symptome der MS vielgestaltig sind. Häufig wird der Nervus opticus von Plaques befallen. Es kommt oft zu einer zentralen Visusminderung und Doppelbildern. Weitere Symptome sind Paresen und Spastiken, die für die motorische Behinderung der Patient*innen verantwortlich sind. Hierbei werden Gang- und Extremitätenataxien beobachtet. Der Babinski-Reflex ist in sehr vielen Fällen positiv. Des Weiteren werden von den Fingern und Füßen ausgehend Parästhesien wahrgenommen. Koordinationsstörungen werden aufgrund zerebellärer Funktionsstörungen hervorgerufen. Hierzu zählen beispielsweise die Dysarthrie und der Blickrichtungsnystagmus. Von Funktionsstörungen des vegetativen Nervensystems, in Form von Blasen- und Darmstörungen sowie Sexualstörungen, wird berichtet. Die kognitiven Fähigkeiten, wie Konzentrationsfähigkeit und Auffassungsgabe, sind häufig beeinträchtigt. Weiterhin klagen die Patient*innen oft über Müdigkeit, die sogenannte Fatigue, und Schmerzen. Zusammenfassend ist jedoch zu beachten, dass die Anamnese der Patient*innen individuell ausfällt (Kesselring 2005).

1.1.3.2 Verlaufsformen

Laut der Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie hält ein Schub mindestens 24 Stunden an, wobei ein Zeitintervall von ≥ 30 Tagen zum letzten Auftreten von Schubzeichen gegeben sein muss. Außerdem darf der Schub nicht durch Körpertemperaturänderungen (Uhthoff-Phänomen) oder Infektionen begründet sein (Leitlinien 31 2012 Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose).

Die unterschiedlichen Verlaufsformen der MS wurden 1996 von der „National Multiple Sclerosis Society (NMSS)“ in den USA folgendermaßen beschrieben:

Schubförmig-remittierende MS (*relapsing-remitting*, RR-MS): Nach einem Schub können sich die Symptome teilweise oder komplett zurückbilden, bevor der nächste Schub beginnt.

Sekundär chronisch-progrediente MS (*secondary-progressive*, SP-MS): Bei einem großen Teil der Patient*innen wandelt sich der schubförmig-remittierende in einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf mit oder ohne gelegentliche Schübe.

Primär chronisch-progrediente MS (*primary-progressive*, PP-MS): Stetig ansteigender Krankheitsverlauf ohne Schübe und Remissionen.

Schubförmig-progrediente MS (*progressive-relapsing*, PR-MS): Ein stetig ansteigender Krankheitsverlauf in Kombination mit Schüben und partiellen Remissionen.

(Lublin und Reingold 1996)

90% und damit die meisten Patient*innen leiden unter dem schubförmig-remittierenden Verlauf. Davon gehen 50% in den sekundär chronisch-progredienten Verlauf über. Den primär chronisch-progredienten und schubförmig-progredienten Verlauf machen 10% der Patient*innen aus (Saguil et al. 2014).

Diese Verlaufsformen werden seit 2013 durch das klinisch isolierte Syndrom (CIS) ergänzt. Es erfüllt zwar noch nicht die Diagnosekriterien der MS, aber es präsentieren sich schon erste klinische Anzeichen. Wogegen das radiologisch isolierte Syndrom (RIS) kein klinisches Anzeichen erkennen lässt, jedoch der radiologische Zufallsbefund MS-positiv ausfällt (Lublin et al. 2014).

Die sogenannte EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) ist eine Einstufung der klinischen Stadien der MS. Sie verläuft in Halbdezimalschritten von 0 bis 10, wobei 10 den Tod durch MS bedeutet (Kurtzke 1983).

Jedoch sind über die Hälfte der Todesursachen sekundäre Komplikationen, z. B. Bronchopneumonie, Sepsis, Herzinfarkt, Lungenembolie und Suizid (Phadke 1987; Feinstein 2002).

1.1.4 Diagnose

Die ersten Diagnosekriterien gehen auf Schumacher 1965 zurück, welche sich ausschließlich auf klinische Befunde stützten (Schumacher et al. 1965).

Hiernach folgte man seit 1982 den Empfehlungen nach Poser, welche 2001 durch neue internationale Kriterien unter McDonald mit der Einbeziehung des MRT ersetzt wurden. So zählen neben den klinischen auch die paraklinischen Kriterien wie das MRT, evozierte Potentiale durch elektrophysiologische Untersuchungen und Liquoruntersuchungen. Die spezifischsten und sensitivsten Ergebnisse erreicht man aus bildgebenden Verfahren (MRT), welche somit den höchsten Stellenwert haben. Bei den evozierten Potentialen wird insbesondere das visuell evozierte Potential (VEP) untersucht. Die Liquoruntersuchungen geben die Information über entzündliche und immunologische Störungen. Hierbei werden

oligoklonale IgG-Banden oder ein erhöhter IgG-Index nachgewiesen, der bei MS-Fällen über 0,7 liegt. Berechnung: $[(\text{IgG im Liquor}/\text{IgG im Serum})/(\text{Albumin im Liquor}/\text{Albumin im Serum})]$ (Poser et al. 1983; Mehta 1991; McDonald et al. 2001).

Die Kriterien wurden 2005, 2010 und zuletzt 2017 überarbeitet, um eine schnelle und genaue Diagnosestellung zu ermöglichen. Wobei 2017 darauf hingewiesen wird, dass potentielle Gefahren von Fehldiagnosen bei der großen Anzahl von Behandlungsoptionen berücksichtigt werden sollen (Polman et al. 2005; Polman et al. 2011; Thompson et al. 2018).

1.1.5 Therapie

Als Therapie stehen immunmodulierende und immunsuppressive Substanzen zur Verfügung. Dazu findet die symptomatische Therapie ihre Anwendung.

Als Langzeittherapie und Schubprophylaxe werden immunmodulierende Substanzen eingesetzt, da sie spezifisch und selektiv in das Immunsystem eingreifen. Als Basistherapie stehen Interferon β -Präparate (Avonex®, Rebif® und Betaferon®) zur Verfügung. Sie werden bei der schubförmig-remittierenden Verlaufsform eingesetzt. Die antiviral wirkenden Interferone gehören zur Gruppe der Zytokine. Der Nachweis einer Reduktion der Schubrate von bis zu ca. 30% und der Reduktion der Läsionen von bis zu 80% im Kernspintomographen wurde unter Medikation von Interferon β -Präparaten in einer placebokontrollierten Studie nachgewiesen.

Eine ähnliche Schubfrequenzreduktion wie Interferon β -Präparate erzielte bei Therapiestudien das Glatirameracetat (Copaxone®). Es ist ein synthetisches Tetrapeptid. Eine der Wirkungsweisen ist eine Verschiebung der proinflammatorischen TH1- zu einer antiinflammatorischen TH2-Antwort.

Neben den immunmodulierenden gibt es auch immunsuppressive Substanzen. Zu dieser Kategorie zählen die das Immunsystem hemmenden Präparate Azathioprin, Mitoxantron, Methotrexat und Cyclophosphamid. Die Wirkung des oral einzunehmenden und mit vielen Nebenwirkungen behafteten Azathioprin setzt nach relativ langer Latenz erst nach drei bis sechs Monaten ein. Alternativ kann Mitoxantron bei progredienten Verläufen per Infusion verabreicht werden, welches jedoch stark kardiotoxisch ist. Vorteilhaft ist nach Absetzen eine Wirkzeit von bis zu einem Jahr. Besonders bei sekundär chronisch-progredienten MS-Verläufen wird das oral einzunehmende Methotrexat verschrieben. Die Verträglichkeit ist neben Kopf- und Muskelschmerzen allgemein gut. Bei raschen Verlaufsformen der chronisch-progredienten MS kommt das urotoxische Cyclophosphamid zum Einsatz, wenn alternative Präparate wirkungslos sind (Comi et al. 2001; Gold und Rieckmann 2004; Ruggieri et al. 2007).

Natalizumab (Tysabri®), zugelassen seit 2006, ist ein Medikament, das nach strenger Indikation bei sehr aktiven schubförmigen MS-Verläufen zum Einsatz kommt. Es verringert die Schubrate und die Krankheitsprogression. Jedoch erkrankten bei diesem Medikament in

Phase-III-Studien Patient*innen an progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) aufgrund einer JC-Virus-Infektion, was teils tödlich endete (Steinman 2005; Polman et al. 2006; Vosoughi und Freedman 2010).

Eine Alternative hierzu ist das oral einzunehmende Fingolimod (Gilenya®). Es verspricht ebenfalls eine Verlangsamung der Progression, dennoch wurden in Studien neben anderen Nebenwirkungen, wie einem AV-Block, zwei tödliche Fälle in Folge von Varizella zoster und Herpes-simplex-Enzephalitis dokumentiert (Cohen et al. 2010; Vosoughi und Freedman 2010).

Als neue orale Medikamente für MS wurde 2013 zum einen Teriflunomid (Aubagio®) zugelassen. In Zulassungsstudien reduzierte es die Schubrate, die Behinderungsprogression und die entzündlichen Herde im MRT. Zum anderen fand 2014 der Wirkstoff Dimethylfumarat/BG-12 (Tecfidera®) seine Zulassung. Es ergaben sich in Studien eine Reduktion der Häufigkeit der Schübe, eine Verlangsamung der Progression sowie eine Reduzierung von Läsionen im MRT (O’connor et al. 2011; Gold et al. 2012; Kamm und Mattle 2014).

Einen wichtigen Fortschritt in der Behandlung von Patient*innen mit aktiver schubförmiger oder früher primär progredienter Verlaufsform bietet das seit Januar 2018 zugelassene Medikament Ocrevus® mit dem Wirkstoff Ocrelizumab von Roche. Die Verabreichung erfolgt per Infusion alle sechs Monate, was eine Therapieerleichterung für die Patient*innen darstellt. Infektionen der oberen Atemwege sind als mögliche bis zu mittelschwer verlaufende Nebenwirkungen einzustufen. Durchgeführte Phase-III-Studien bewirkten eine EU-Zulassung und berichteten von einer Verlangsamung der Krankheitsprogression und Schubfreiheit bei 80% der Patient*innen (OCREVUS (Ocrelizumab) von Roche erhält Zulassung in der Europäischen Union für schubförmige Multiple Sklerose und primär progrediente Multiple Sklerose).

Die symptomatische Therapie hat die Prävention einer möglichen Behinderung und die Reduktion der die Lebensqualität negativ beeinflussenden Funktionsstörungen zum Ziel. Hierbei kommen medikamentöse und physiotherapeutische Behandlungen zum Einsatz (Henze 2004).

Da die Verlaufsformen der MS in Zeit und Intensität und daraus folgend auch die Behandlungserfolge unterschiedlich sein können, lässt sich daraus eine pathogenetische Heterogenität folgern (Cepok 2001).

1.1.6 Histopathologie

Histologische ZNS-Schnitte dienen der Analyse der Läsionsverteilung, des Maßes der Demyelinisierung und somit des Schweregrades der Entzündung (Stromnes und Goverman 2006).

1.1.6.1 Histologische Klassifizierungen der MS-Läsionen

Es gibt eine Reihe von histologischen Klassifizierungen der MS-Läsionen, wie beispielsweise das Bö/Trapp-System, die De Groot/van der Valk-Modifikation, das Lucchinetti/Lassmann/Brück-System und das Wiener Konsenssystem (Kuhlmann et al. 2017).

Kuhlmann et al. schlugen 2017 folgende Einteilung vor, um die Pathogenese der Krankheit besser zu verstehen und die Läsionen besser vergleichen zu können:

Die aktive, die kombiniert aktive/inaktive und die inaktive Läsion mit oder ohne anhaltende Demyelinisierung. Die aktiven Läsionen sind durch schaumzellige Makrophagen und Mikroglia im gesamten Läsionsbereich gekennzeichnet, wohingegen diese Zellen bei der kombiniert aktiven/inaktiven Läsion dezentral hauptsächlich auf die Randbereiche verteilt sind. Bei inaktiven Läsionen fehlen Makrophagen und Mikroglia fast vollständig. Weiterhin können die aktive und die kombiniert aktive/inaktive unterteilt werden in demyelinisierende und post-demyelinisierende Läsionen. Die Zerstörung des Myelins hat bei post-demyelinisierenden Läsionen aufgehört, Makrophagen sind aber noch vorhanden. Aktive demyelinisierende Läsionen können außerdem in frühe und späte unterteilt werden, wobei die frühen Läsionen durch die Anwesenheit von sämtlichen Hauptbestandteilen des Myelins in Makrophagen, wie der Cyclonukleotid-Phosphodiesterase (CNP), dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) gekennzeichnet sind. Die späten Läsionen weisen nur Makrophagen mit Myelin-basischem Protein (MBP) oder Proteolipid-Protein (PLP) auf (Kuhlmann et al. 2017).

1.1.6.2 Makrophagen in MS-Läsionen

Makrophagen im ZNS können entweder aus infiltrierenden Monozyten aus dem Blut oder aus der ansässigen Mikroglia abgeleitet werden (Yamasaki et al. 2014). Um die Mikroglia beim Menschen zu identifizieren, erweisen sich z. B. die Marker P2Y₁₂ und TMEM119 als nützlich (Sato et al. 2016; Mildner et al. 2017).

Bezüglich der MS besitzen Makrophagen und Mikroglia viele Aufgaben. Sie fördern zum einen die neuroinflammatorischen Abläufe der MS. Andererseits helfen sie bei der Reparatur des ZNS (Bogie et al. 2014).

Dementsprechend gibt es unter den Makrophagen und der Mikroglia klassisch die Untergruppen M1- und M2-Phänotypen, welche zwei der vielen Pole der Makrophagendifferenzierung darstellen. Während M1 proinflammatorische und M2 antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden, nimmt man an, dass eine Balance zwischen den Phänotypen während des Krankheitsverlaufes besteht und damit beide eine wichtige Rolle einnehmen. Hierbei wird dem M1-Phänotyp eine Beteiligung an der Antigenpräsentation, der Zytotoxizität sowie eine Gewebeschädigung bei der Neurodegeneration zugeschrieben. Der M2-Phänotyp hingegen spielt eine Rolle bei der

Immunregulation, den Überlebenssignalen der Zellen, der Auflösung von Entzündungen und der Gewebereparatur (Morandi et al. 2015; Chu et al. 2018).

Brück et al. untersuchten Makrophagen in humanen MS-Läsionen während verschiedener Stadien der Erkrankung. Anhand von Makrophagenmarkern konnte festgestellt werden, dass die höchste Anzahl der Makrophagen bei aktiv demyelinisierenden und früh remyelinisierenden Läsionen zu verzeichnen war. Bei inaktiven demyelinisierten oder spät remyelinisierten Läsionen konnte eine geringere Anzahl an Makrophagen beobachtet werden. Zugleich konnte festgestellt werden, dass in akuten MS-Fällen die Makrophageninfiltration am höchsten war. In frühen und späten chronischen MS-Fällen war das Aufkommen geringer. Daraus lässt sich erkennen, dass bzgl. Makrophagenaktivität das Stadium der Demyelinisierung mit dem Krankheitsstadium korreliert (Brück et al. 1996).

Zudem konnte aber auch beobachtet werden, dass vollständig remyelinisierte Läsionen einer wiederholten aktiven Demyelinisierung ausgesetzt sein können, was sich in akutem Myelinabbau und hoher Präsenz an Makrophagen widerspiegelt (Brück et al. 2003).

1.1.6.3 Marker für Makrophagen

Calprotectin (S100A8/S100A9):

Ein spezifischer Marker für Makrophagen ist das sogenannte Calprotectin. Das Calprotectin (S100A8/S100A9) ist ein Komplex aus zwei Kalzium bindenden Proteinen. Die Proteine gehören der S100 Familie an. Die Calprotectin Expression ist bei Gewebe-Makrophagen und Monozyten, welche aus dem Blut stammen, in akuten Entzündungen positiv. Bei den ansässigen und in chronischen Entzündungen vorkommenden Makrophagen ist kein Calprotectin nachweisbar. Demzufolge kann angenommen werden, dass bei Entzündungen die Expression des Calprotectins mit der Makrophagenaktivität in Verbindung steht (Yui et al. 2003).

Mac3 (M3/84):

Dieses Differenzierungsantigen für Mausmakrophagen ist durch einen monoklonalen Antikörper der Spezies Ratte gegen die Maus definiert (Ho und Springer 1983). Beim Menschen stellt das CD68-Antigen einen Marker für Makrophagen dar (Holness und Simmons 1993).

1.1.6.4 Remyelinisierung der MS-Läsionen

Als Reparaturmechanismus kann eine teilweise oder vollständige Remyelinisierung der Läsionen auftreten. Unvollständig remyelinisierte Bereiche befinden sich meist am Plaquerand, am Übergang zwischen weißer Substanz und demyelinisiertem Plaquezentrum. Sie werden Schattenplaque-Areale genannt. Vollständig remyelinisierte Läsionen werden als Markschattenherde („*shadow plaques*“) bezeichnet und erscheinen als scharf begrenzte blasse Myelinareale in der weißen Substanz. Hauptsächlich hängt die Remyelinisierung von der

Anwesenheit von myelinbildenden Oligodendrozyten ab, die Myelinproteine in ihrem Zytoplasma exprimieren (Brück et al. 2003; Patrikios et al. 2006).

Durch die myelinbildenden Oligodendrozyten, welche sich durch einen demyelinisierenden Reiz aus Oligodendroglia-vorläuferzellen differenzierten, werden die Axone remyelinisiert. Diese Axone zeichnen sich durch dünnere Myelinscheiden aus. Remyelinisierte Bereiche der Axone konnten sogar bei aktiv demyelinisierenden Läsionen beobachtet werden, wobei das Myelin instabil und einer wiederkehrenden Entmarkung ausgesetzt schien. Das Ausmaß der Remyelinisierung scheint beeinflusst von den Gegebenheiten der Läsion und der Genetik der Patient*innen (Kuhlmann et al. 2017). Patient*innen mit längerer Krankheitsdauer und einem höheren Todesalter wiesen ein signifikant höheres Ausmaß an Remyelinisierung auf. Jedoch scheint das Ausmaß nicht im Zusammenhang mit dem Geschlecht, dem Alter bei Krankheitsbeginn oder dem Krankheitsverlauf zu stehen. So wurden bei einem Teil der MS-Patient*innen nicht nur bei einem schubförmigen, sondern auch bei einem progressiven Krankheitsverlauf große remyelinisierte Läsionsflächen festgestellt (Patrikios et al. 2006).

Die Lipide und Proteine des neu gebildeten Myelins und die des ursprünglichen Myelins lassen sich derzeit noch nicht über molekulare Marker ermitteln (Kuhlmann et al. 2017). Jedoch lassen sich mit Hilfe des neuen Markerproteins BCAS1 aktiv myelinisierende Oligodendrozyten erkennen. Diese Zellen befinden sich im Zwischenstadium von frühen zu reifen Oligodendrozyten. Damit ist es möglich die aktive Myelinbildung zu identifizieren. Folglich kann dieses Markerprotein als experimentelles Hilfsmittel zur Erforschung von Remyelinisierungstherapien bei MS hilfreich sein (Fard et al. 2017).

Um myelinisierte, nicht- bzw. demyelinisierte und remyelinisierte Axone zu unterscheiden, verwendet man die Elektronenmikroskopie als Goldstandard. Hiermit lassen sich auf ultrastruktureller Ebene die morphologischen Unterschiede zwischen ursprünglichem und neu gebildetem Myelin, wie z. B. dünnere und kürzere remyelinisierte Myelinscheiden, erkennen. Diese Vorgehensweise ist zwar zeitaufwendiger aber genauer als die Luxol-Fast-Blue-Färbung (LFB-Färbung) (Lindner et al. 2008).

1.1.7 Immunpathologie

Für die Pathogenese der MS wird nach heutiger Auffassung angenommen, dass eine Demyelinisierung durch eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie angeregt wird. Der Auslöser für die Aktivierung von T-Zellen ist noch unklar. Eine Theorie besagt, dass die T-Zellen durch bakterielle oder virale Peptide in der Peripherie aktiviert werden und es im ZNS zu einem Angriff der T-Zellen auf sequenzähnliche Peptide in Form einer molekularen Mimikry kommt (Wucherpfennig und Strominger 1995; de Vos et al. 2002).

Mit Hilfe der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie dem *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) und dem *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), wird der Eintritt der aktivierten T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bewerkstelligt. Die Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen verstärkt die Einwanderung durch den Abbau von

Makromolekülen der Extrazellulärmatrix. Im ZNS werden die T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen erneut aktiviert. Dies geschieht durch Makrophagen, dendritische Zellen, Mikroglia oder Astrozyten, welche die Antigene zusammen mit dem MHC-II Komplex auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und mit den T-Zellen einen trimolekularen Komplex bilden. Im Folgenden kommt es zu einer Proliferation der T-Zellen, die eine Entzündungskaskade auslöst, an der unter anderem Lymphozyten, Antikörper und Zytokine beteiligt sind. Reife CD4⁺ T-Helferzellen, genauer die TH1-Zellen, produzieren proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Die immunvermittelte Schädigung des Myelins wird mehreren Mechanismen zugeschrieben. Dazu zählen die direkte Oligodendrozytenschädigung durch CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die Zytokin-vermittelte Schädigung von Oligodendrozyten und Myelin, die Phagozytose der Myelin-Oberflächenantigene und die damit verbundene antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität, und des Weiteren die komplementvermittelte Schädigung der Oligodendrozyten (Noseworthy et al. 2000).

Faktoren, die im Zuge des entzündungsvermittelten Geschehens zur Gewebeschädigung beitragen sind z. B. Stickoxid (NO) und Sauerstoffradikale. Ihre Konzentration kann in solch einer entzündlich demyelinisierenden Läsion rasant ansteigen und Proteine, Nukleinsäuren und Lipide der Zellen schädigen (Smith et al. 1999; Haider et al. 2011).

Allerdings werden auch antiinflammatorische Mechanismen beobachtet. Ein Herunterregulieren der Immunantwort führt zur Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10) aus CD4⁺-Zellen. Hierdurch kommt es zur Proliferation antiinflammatorischer CD4⁺-TH2-Helferzellen, welche Signale an die antigenpräsentierenden Zellen senden könnten und damit B-Zellen stimulieren (Noseworthy et al. 2000).

1.2 Tiermodelle der MS

1.2.1 Überblick

Um die Pathogenese der MS zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren Tiermodelle etabliert, auch wenn es kein Modell gibt, das die Vielfalt der MS in ihrer Gesamtheit erfasst. Obwohl auch das Immunsystem von Tier und Mensch teilweise unterschiedlich ist, ermöglichen die drei am häufigsten untersuchten Tiermodelle zumindest ausschlaggebende Merkmale der MS zu verstehen. Zu diesen Tiermodellen zählen die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), die viral induzierte chronische Demyelinisierung, durch *Theiler's murine encephalomyelitis virus* (TMEV) induziert, und die durch Toxine, z. B. Cuprizone und Lysolecithin, induzierte Demyelinisierung.

Das EAE-Modell spiegelt die Autoimmunpathogenese der MS wider und ermöglicht es daher experimentelle Behandlungen zu testen, die in das Immunsystem eingreifen.

Die TMEV- und Toxin-induzierten Demyelinisierungsmodelle dienen hauptsächlich dem Verständnis axonaler Schädigung sowie dem Prozess der De- und Remyelinisierung. Das TMEV-Modell beruht auf der virusinduzierten Aktivierung des Immunsystems, und die klinische Manifestation ähnelt der chronisch-progredienten MS des Menschen. Das Toxin-induzierte Modell wird hauptsächlich dazu verwendet, den Prozess der De- und Remyelinisierung darzustellen und um z. B. Substanzen zu untersuchen, die die Remyelinisierung fördern könnten.

Die Tiermodelle ermöglichen jedoch trotz ihrer jeweiligen Einschränkungen in einer komplementären Weise eine gute Kenntnis der Pathomechanismen bei der MS (Procaccini et al. 2015).

1.2.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Das am meisten untersuchte Tiermodell der MS ist die EAE. Der Ursprung des Modells geht auf das Jahr 1925 zurück. Kaninchen wurden mit menschlichem Rückenmarkshomogenat immunisiert und zeigten durch diese sogenannte aktive Induktion eine Rückenmarksentzündung und -lähmung. 1933 immunisierten Rivers et al. Affen mit Kaninchenhirnextrakten und beschrieben die Lähmungen, begleitet von einer Demyelinisierung, später als EAE (Rivers et al. 1933; Stromnes und Goverman 2006).

Grundsätzlich hängt der klinische Verlauf der EAE von mehreren Faktoren ab. Hierzu zählen die verschiedenen Möglichkeiten der Immunisierung, das verwendete Antigen, die Tierart und der verwendete Tierstamm, sowie Geschlecht und Alter der Tiere. Die klinischen Anzeichen der EAE werden nach zunehmenden Lähmungserscheinungen auf einer Skala von asymptomatisch bis moribund eingeteilt (van der Star et al. 2012).

EAE kann in verschiedenen Tieren induziert werden, wobei Mäuse am häufigsten als Modellorganismus verwendet werden. Grund hierfür ist z. B. die Verfügbarkeit vieler genetisch veränderter Linien, die die Untersuchung verschiedener Fragestellungen ermöglichen (Bittner et al. 2014). Des Weiteren ist die Haltung und Züchtung von Mäusen relativ einfach.

Dabei bieten sich Mäuse mit verschiedenen genetischen Hintergründen (SJL/J oder C57BL/6) für die Induktion der EAE an. Die in allen Fällen relevantesten Myelinantigene sind MOG, MBP und PLP (Procaccini et al. 2015).

Bei der EAE können drei Arten der Induktion unterschieden werden:

Die aktiv-induzierte EAE, welche durch aktive Immunisierung induziert wird, wird als sogenannter „Goldstandard“ betrachtet. Hierbei wird subkutan eine Emulsion aus Myelinantigenen, z. B. dem Peptid MOG₃₅₋₅₅, gemischt mit Freund-Adjuvans (*Complete Freund's Adjuvant*/ CFA), welches avitales Mycobacterium tuberculosis enthält, appliziert. Am Tag null und am Tag zwei wird häufig intraperitoneal Pertussis-Toxin als Immunstimulans injiziert. Somit konnte die EAE bei Mäusen mit einer einzigen Immunisierung induziert und

klinische Zeichen einer EAE festgestellt werden (Levine und Sowinski 1973; Bittner et al. 2014).

Das Protein MOG ist auf der Oberfläche der Oligodendrozyten und der Myelinscheide exprimiert, wobei MOG₃₅₋₅₅ im ZNS verschiedener Mausstämmen eine entzündliche und demyelinisierende Immunantwort auslöst (Clements et al. 2003). MOG induziert die EAE insbesondere bei C57BL/6 Mäusen, die den genetischen Hintergrund für die meisten transgenen Mäuse bilden. So ist eine T-Zell- und Makrophagen-vermittelte Demyelinisierung gegeben und es kommt zu einer chronischen EAE. Ein schubförmig-remittierender Verlauf wird durch das Myelinantigen PLP in Mäusen mit dem Hintergrund SJL/J induziert. Bei der MS treten Autoimmunreaktionen möglicherweise nicht nur gegen Myelinantigene auf. Stressproteine und neuronale Proteine können ebenfalls Antikörper- und T-Zell-Reaktionen hervorrufen (Storch et al. 1998; Baker und Amor 2014; Procaccini et al. 2015).

Ein weiteres EAE-Modell ist die passiv übertragene EAE, welche durch Übertragung enzephalitogener T-Zellen eines immunisierten Tieres in ein gesundes Tier gekennzeichnet ist. Dieses Modell dient experimentellen Studien, um die T-Zell-Regulation und Funktion bei neuroinflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen zu untersuchen (Gold et al. 2006; Bittner et al. 2014).

In vorliegender Arbeit wird das Modell der spontanen EAE herangezogen. Hier kommt es ohne aktive Immunisierung zur spontanen Symptomentwicklung aufgrund transgener T- bzw. B-Zell-Rezeptoren (Bittner et al. 2014).

1.2.2.1 Die spontane EAE

2003 erstellten Bettelli et al. ein transgenes T-Zell-Rezeptor (TCR) Mausmodell zur Untersuchung einer MOG₃₅₋₅₅ Peptid induzierten EAE unter Verwendung eines C57BL/6J-Hintergrunds. Die Mehrzahl der T-Zellen (2D2) in dieser Mauslinie tragen die Ketten V α 3.2 und V β 11 und sind spezifisch für MOG₃₅₋₅₅. Mehr als 30% der TCR^{MOG} Mäuse, auch 2D2 Mäuse genannt, entwickelten eine spontane Optikusneuritis ohne Hinweise auf klinische oder histologische EAE. Nur 4% der Mäuse erkrankten an spontaner EAE (Bettelli et al. 2003).

Ein weiteres transgenes Mausmodell geht auf Litzenburger et al. 1998 zurück. Es handelt sich um B-Zell-Rezeptor transgene „immunglobulin heavy chain“ (IgH) knock-in-Mäuse mit einem hohen Autoantikörpertiter gegen MOG. Hierbei wurde an Stelle der J_H-Sequenz des Ig-schwere-Kette-Gens das VDJ Gensegment des MOG-spezifischen, demyelinisierenden Antikörpers 8.18-C5 gesetzt. Diese IgH^{MOG} Mäuse sind auch als TH-Mäuse bekannt. Sie entwickelten keine spontane neurologische autoimmune Erkrankung, da eine intakte Blut-Hirn-Schranke und intrinsische Schutzmechanismen des ZNS als Hinderungsgrund auszureichen schienen. Bei aktiver Immunisierung mit PLP bzw. MOG entwickelten die IgH^{MOG} Tiere EAE mit höherer Frequenz als die nicht-transgenen Wurfgeschwister (Litzenburger et al. 1998).

Durch Kreuzung der oben genannten TCR^{MOG} und IgH^{MOG} einzeltransgenen Mäuse, beide auf einem C57BL/6-Hintergrund, erhielten Krishnamoorthy et al. 2006 ein doppelt-transgenes Mausmodell. Diese Tiere entwickelten unter bestimmten pathogenfreien Bedingungen (SPF) zu ca. 50% spontan EAE ähnliche Zeichen. Hierbei waren vor allem Sehnerv und Rückenmark von entzündlichen, demyelinisierenden Läsionen betroffen. Dementsprechend werden diese Tiere auch als optico-spinale Enzephalomyelitis (OSE)-Mäuse bezeichnet. Vermutlich sind genetische Faktoren und die Art des Zielautoantigens für die Läsionsorte verantwortlich. Der durchschnittliche Krankheitscore der OSE-Mäuse betrug $3,4 \pm 1,2$ (bei einem Ranking von 1 bis 5) mit einem Beginn bei $6,1 \pm 2,0$ Wochen nach der Geburt, unabhängig des Geschlechts. Der Krankheitsverlauf war chronisch ohne Remissionen, wobei der Krankheitsbeginn mit einem hohen Gewichtsverlust der Mäuse einherging (Krishnamoorthy et al. 2006).

Bettelli et al. 2006 zeigten, dass es bei diesen doppelt-transgenen Mäusen ein Zusammenspiel zwischen den T- und B-Zellen gibt. Die MOG spezifischen T-Zellen führten zu einer erhöhten Produktion von MOG spezifischen IgG1-Antikörpern, wobei die MOG spezifischen B-Zellen auch die Aktivierung und Proliferation der MOG spezifischen T-Zellen verstärkten. Des Weiteren scheinen die MOG spezifischen Antikörper allein nicht der Auslöser der Erkrankung zu sein, da die Höhe der Antikörper in gesunden und kranken doppelt-transgenen Mäusen keinen wesentlichen Unterschied aufwies, und die Übertragung von Serum der $\text{TCR}^{\text{MOG}} \times \text{IgH}^{\text{MOG}}$ -Mäuse auf TCR^{MOG} -Mäuse keine EAE induzierte (Bettelli et al. 2006).

Allgemein eignen sich OSE-Mäuse für die Untersuchung der Auslösemechanismen von Autoimmunerkrankungen und sind für das Studium der Läsionslokalisation und deren Zellzusammensetzung von Nutzen. Sie dienen als Modell der spontanen, nicht-adjuvansinduzierten Autoimmunität zur präklinischen Validierung neuer Therapiemethoden von Autoimmunerkrankungen des ZNS (Krishnamoorthy et al. 2006).

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Tiermodell der EAE dazu dient, grundlegende Mechanismen der MS sowie die immunvermittelte Schädigung des ZNS besser zu verstehen, da insbesondere die axonale Schädigung bei EAE und MS ähnlich sind. Nützlich erwies sich die EAE, um die Relevanz von Therapiestrategien für MS-Patient*innen auszutesten und klinische Studien einzuleiten (Gold et al. 2006).

1.3 Oligodendrozyten

1.3.1 Funktion

Oligodendrozyten zählen zu den Gliazellen des ZNS. Sie sind für die Myelinisierung der Axone verantwortlich. Dabei umhüllen sie mit ihrer Zellmembran Abschnitte mehrerer Axone. Axone sind lange Fortsätze der Neurone und dienen über elektrische Impulse der

Informationsweiterleitung zu entfernten Synapsen. Die Leitungsgeschwindigkeit wird durch das axonisolierende Myelin erhöht (Nave 2010a; Goebbels et al. 2014).

Der Stoffwechsel der Neurone wird durch Oligodendrozyten unterstützt, indem sie deren Wasser- bzw. Ionenhomöostase regulieren und ihre Aktivität an die neuronalen Signale anpassen (Stadelmann et al. 2019).

Es ist ein komplexes System extrazellulärer Signale vorhanden, das die Funktion von Oligodendrozyten reguliert. So werden z. B. der axonale Kontakt vermittelt oder die Myelindicke gesteuert. Modulatoren der Myelindicke sind u. a. die axonalen Wachstumsfaktoren Neuregulin (NRG). Hierbei handelt es sich insbesondere um NRG-1 (Typ III), welches an den Tyrosinkinase-Rezeptor ErbB der Oligodendrozyten bindet. In Studien mit knock-out-Mäusen zeigte sich, dass ein Mangel an NRG-1 zu einer Hypomyelinisierung im präfrontalen Kortex führte, wohingegen eine Überexpression von NRG-1 eine dickere Myelinscheide erzeugte. Es waren hierbei sogar Axone mit kleinem Durchmesser myelinisiert, die es normalerweise nicht sind. Daraus folgernd ist NRG-1 nicht der Initiator der Myelinisierung, kann aber laufende Myelinisierungsprozesse verändern, wobei NRG-1 durch neuronale Aktivität reguliert wird. Das wiederum deutet auf eine Korrelation zwischen neuronaler Aktivität und Myelinproduktion unter Einbeziehung des Wachstumsfaktors NRG-1 hin (Mitew et al. 2014).

Der Großteil der ZNS-Myelinisierung ist bis zum 20. Lebensjahr abgeschlossen. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass die Myelinisierung lebenslang auftritt, da Oligodendrozyten und Myelin ersetzt oder bisher nicht myelinisierte Axone myelinisiert werden. Das Myelin durchläuft dabei verschiedene Entwicklungsstadien und die meisten Areale enthalten eine Mischung aus myelinisierten und nicht myelinisierten Axonen. Das deutet darauf hin, dass die Entwicklung von Oligodendrozyten und die Myelinisierung der Axone durch genetische Mechanismen kontrolliert werden (Mitew et al. 2014).

Eine weitere Funktion der Oligodendrozyten ist die Versorgung von Axonen mit Glykolyseprodukten, z. B. Laktat. Die Metabolite gelangen aus dem Zytosol des Oligodendrozyten mit Hilfe zytosolischer Kanäle über den Innenraum des Myelins, der inneren Lippe, in das Lumen des Axons. Durch immun-elektronenmikroskopische Techniken entdeckte man dort beispielsweise die dafür nötigen Monocarboxylat-Transporter (MCT) (Saab et al. 2013).

Ebenso zeigen Techniken wie die genomweite Transkriptionsanalyse oder die Optogenetik ein neues Bild von Myelin auf. Es ist nicht nur als statisches Element für neuronale Funktionen zu betrachten, sondern es werden ihm zunehmend dynamische und metabolische Aktivitäten im Nervensystem zugeschrieben. Außerdem werden dem Myelin Schlüsselfunktionen innerhalb neuronaler Schaltkreise, in der Gehirnplastizität und in der komplexen Ausführungsfunktion des Gehirns zugeschrieben (Tomassy et al. 2016).

1.3.2 Entwicklung

In den Keimzonen von Gehirn und Rückenmark entstehen während der Entwicklung die Vorläufer der Oligodendrozyten, die sogenannten Oligodendrozyten-Progenitorzellen (OPCs). Hiernach verbreiten sie sich im gesamten ZNS und differenzieren sich zu prämyelinisierenden Oligodendrozyten. Diese differenzieren zu myelinisierenden Oligodendrozyten, bilden große Mengen an Zellmembranen und umwickeln damit mehrere Axone (Abbildung 1). Die Differenzierung der prämyelinisierenden Oligodendrozyten scheint während der menschlichen Entwicklung einige Monate stagnieren zu können, um eine Feinabstimmung zu gewährleisten, damit die richtigen Axone myelinisiert werden. So herrscht eine strenge Regulation zwischen der OPC-Proliferation und der Differenzierung der Oligodendrozyten, die durch intra- und extrazelluläre Signale im Gleichgewicht gehalten werden. Zu den intrinsischen Faktoren zählen unter anderem Chromatin-umgestaltende Proteine, nicht-kodierende RNA und Transkriptionsfaktoren (Mitew et al. 2014; Tomassy et al. 2016).

Neben den intrinsischen Faktoren spielen auch von Neuronen freigesetzte Faktoren, wie extrazelluläre Matrixproteine, membranassoziierte Proteine oder lösliche Faktoren bei der Regulation der Oligodendrozytenentwicklung und Myelinisierung eine Rolle (Tomassy et al. 2016). Ebenso haben Studien den Einfluss elektrischer Aktivität gezeigt (Barres und Raff 1993).

1.3.3 Transkriptionsfaktoren und Myelinproteine

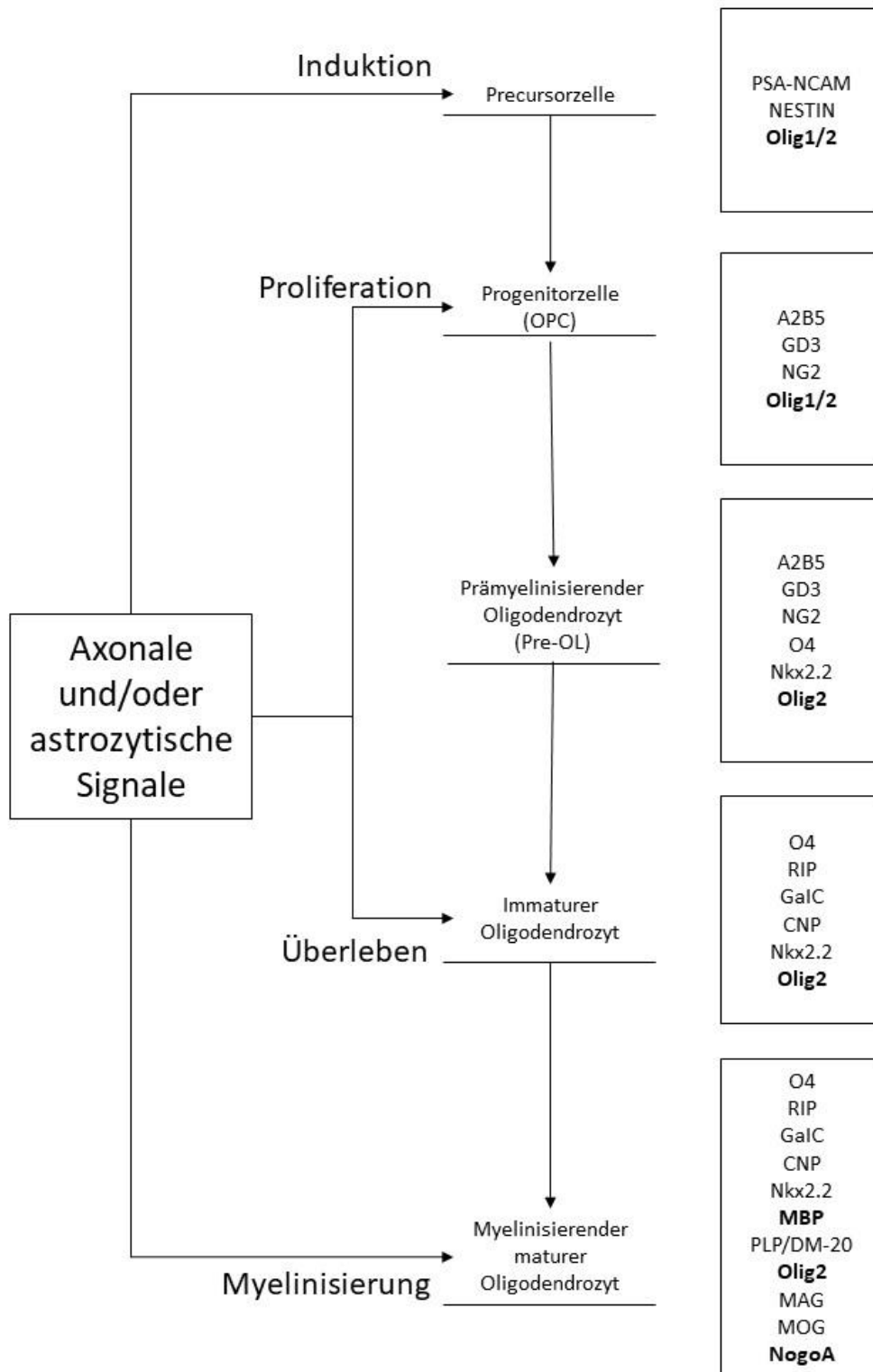


Abbildung 1: Oligodendrozytenreife mit Transkriptionsfaktoren und Myelinproteinen

(Baumann und Pham-Dinh 2001; Mitew et al. 2014)

1.3.3.1 Olig1/Olig2

Die basischen Helix-Loop-Helix-Proteine Olig1 und Olig2 sind wesentlich an der Bildung, Reifung und dem Überleben der Oligodendrozyten beteiligt. Es gelang der Nachweis dieser Transkriptionsfaktoren sowohl in Neuroepithelzellen, aus denen Oligodendrozytenvorläufer hervorgehen, als auch in den Vorläuferzellen selbst. Der Platelet-derived growth factor α -Rezeptor (PDGFR- α) galt lange Zeit als frühester bekannter Marker. Jedoch wurde festgestellt, dass die Expression von Olig2 während der Reifung im Rückenmark sogar einige Tage vor PDGFR- α nachweisbar ist. Die Aktivierung der Ngn-1 und -2 Gene durch Olig2 führt zur Differenzierung von spinalen Motoneuronen, während die Koaktivierung von Olig2 und Nkx2.2 die Bildung von OPCs im Rückenmark veranlasst. Olig1 und Olig2 sind demzufolge Marker, mit denen sich die Oligodendrozytenvorläuferzellen bzw. die Abstammungslinie als erstes erkennen lassen (Lu et al. 2000; Zhou et al. 2000; Balasubramaniyan et al. 2004).

In einer Studie wurde bei Mäusen die Rolle von Olig2 in verschiedenen Entwicklungsstufen der Oligodendrozyten untersucht. Bei Entfernung von Olig2 in OPCs führte dies zu einem Rückgang der Oligodendrozytendifferenzierung und damit einer Hypomyelinisierung. Vorhandenes Olig2 wirkt also positiv in der Differenzierung von OPCs. Wird Olig2 dagegen bei immaturren Oligodendrozyten entfernt, steigert dies die Differenzierung und Myelinisierung. Somit kann vorhandenes Olig2 die Differenzierung von immaturren Oligodendrozyten und dadurch die Myelinisierung hemmen. Olig2 scheint also eine stadienspezifische regulatorische Rolle zu spielen. So könnte das Entfernen von Olig2 in späten oligodendroglialen Entwicklungsstadien eine mögliche Behandlungsstrategie zur Förderung der Remyelinisierung sein (Mei et al. 2013).

Neben dem Marker Olig2, welcher sowohl oligodendrogliale Vorläufer als auch reife Oligodendrozyten färbt, wird NogoA als Marker für reife Oligodendrozyten verwendet (Kuhlmann et al. 2017).

1.3.3.2 NogoA

NogoA ist das bekannteste Reticulon. Reticulons sind eine Familie von Proteinen und kommen meist im endoplasmatischen Retikulum (ER) vor. NogoA sowie auch NogoB und NogoC werden aus dem Nogo/Reticulon-4-Gen (RTN-4) generiert. NogoA hat eine molekulare Masse von 200 kDa und hemmt das Neuritenwachstum. Es ist hauptsächlich in Oligodendrozyten und Myelin exprimiert (Dodd et al. 2005).

NogoA ist ein hochmolekulares Transmembranprotein und ein Antigen des monoklonalen Antikörpers mAb IN-1. In Tierstudien fördert dieser Antikörper die Regeneration des ZNS. Dieser beobachtete Effekt könnte zu Reparaturzwecken des ZNS eingesetzt werden (Huber und Schwab 2000).

Die aktive Immunisierung gegen NogoA bei Versuchen mit EAE-Mäusen führte dazu, dass die Hemmung des Neuritenwachstums durch die Bildung Nogo-spezifischer Antikörper

aufgehoben wurde. Ebenso unterdrückte die passive Immunisierung mit Anti-Nogo-IgGs die EAE. Die Versuchsergebnisse ließen erkennen, dass NogoA das Fortschreiten der EAE begünstigt, jedoch seine Blockade, z. B. bei MS, die Intaktheit des ZNS erhält oder wiederherstellt (Karnezis et al. 2004).

Nach Verletzungen und Ischämien im ZNS spielt NogoA eine Schlüsselrolle bei der Hemmung der Axonregeneration. Aufgrund der Expression in Oligodendrozyten stellt es einen Marker für reife Oligodendrozyten dar. Zusätzlich ist NogoA in Tierversuchen in ZNS-Neuronen gefunden worden, was darauf schließen lässt, dass es neben seiner bekannten Funktion als Inhibitor auch endogene Rollen in Neuronen haben kann (Liu et al. 2002; Satoh et al. 2005; Kuhlmann et al. 2008).

1.3.3.3 MBP

MBP ist ein zytoplasmatisches Membranprotein des kompakten Myelins und Marker der reifen Oligodendrozyten. Das Protein hat mehrere Isoformen, die während der Entwicklung durch alternatives Spleißen reguliert werden. Es ist an der Verdichtung des Myelins beteiligt. Bestimmte MBPs werden jedoch während der Oligodendrozytenreifung vor der kompakten Myelinbildung im Zellkörper und im Zellkern beobachtet. Dies deutet auf eine regulatorische Funktion des MBPs bei der Durchführung des Myelinisierungsprogramms hin. Mutationen des MBP-Gens führen zu schwerer Dysmyelinisierung (Pfeiffer et al. 1993; Pedraza et al. 1997; John et al. 2002).

1.3.4 Oligodendrozyten in MS-Läsionen

Bei den destruktiven Prozessen der MS handelt es sich um eine immunvermittelte Demyelinisierung, in die auch die Oligodendroglia involviert ist. In einer Studie an humanem ZNS-Gewebe fand man in frühen MS-Läsionen stark Olig2 exprimierende Oligodendrozytenvorläuferzellen. Ein Teil dieser Zellen exprimierte zudem den für reife Oligodendrozyten typischen Marker NogoA. Dies führte zu dem Schluss, dass es sich hier um reifende Oligodendrozyten handelte, die aus Vorläufern entstanden. In chronischen MS-Läsionen waren auch Oligodendrozytenvorläufer vorhanden, jedoch in geringerer Anzahl. Hier traten seltener reifende Vorläuferzellen auf. Schlussfolgernd wurde beobachtet, dass in frühen Läsionen Vorläufer und Vorläufer im Übergang zu reifen Oligodendrozyten auftreten, wogegen bei chronischen Läsionen die Vorläufer zwar noch vorhanden sind, jedoch nicht zu Oligodendrozyten reifen. Es wurde geschlossen, dass die Differenzierungsfähigkeit der Vorläuferzellen im Laufe der Erkrankung abnimmt (Kuhlmann et al. 2008).

Neben der Differenzierungsfähigkeit konnte man in MS-Läsionen auch Rückschlüsse auf die Aktivität der Oligodendrozyten ziehen. So fanden sich in akuten Läsionen, neben den T-Zellen und phagozytierenden Makrophagen, auch neues Myelin bildende Oligodendrozyten. Bei alten Läsionen mit geringer Entzündungsaktivität waren nur noch inaktive

Oligodendrozyten festzustellen (Stadelmann und Brück 2008). Zudem war in inaktiven Läsionen die Anzahl an reifen Oligodendrozyten sehr stark dezimiert (Kuhlmann et al. 2017).

Mit Hilfe des neuen Markers BCAS1 können aktiv myelinisierende Oligodendrozyten sichtbar gemacht werden, die sich im Zwischenstadium von frühen zu reifen Zellen befinden. Bezogen auf die entzündliche Aktivität konnte festgestellt werden, dass BCAS1-positive Oligodendrozyten sowohl in aktiv demyelinisierenden als auch in inaktiven Läsionen zu finden sind. Somit scheint es, dass die Rekrutierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen und die Anregung zur Remyelinisierung zumindest teilweise unabhängig von der entzündlichen Aktivität der MS-Läsionen ist. Dennoch ist die Remyelinisierung von vollständig demyelinisierten chronischen Läsionen meist unvollständig, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass in diesen Läsionen nur selten BCAS1-positive Oligodendrozyten festgestellt wurden. In den teilweise remyelinisierten Läsionen waren die meisten BCAS1-positiven Oligodendrozyten clusterförmig an den Läsionsrändern anzutreffen, sodass es scheint, dass die Remyelinisierung von der Läsionsgrenze in der weißen Substanz ausgeht (Fard et al. 2017).

Die Remyelinisierung scheint bei MS-Läsionen von zwei Faktoren bestimmt zu sein. Dies ist zum einen die Verfügbarkeit von Oligodendrozyten oder deren Vorläufern und zum anderen das Ausmaß der axonalen Schädigung. Studien zeigten, dass der Grund für den Mangel an Remyelinisierung in chronischen MS-Läsionen in der Erschöpfung der Vorläuferzellen durch die dauernde De- und Remyelinisierung einer Läsion liegen könnte. Zudem könnten weitere Gründe, wie das Maß an astroglialer Narbenbildung oder das Fehlen der trophischen Unterstützung, die Remyelinisierung unterbinden (Lassmann 1998). Außerdem besteht die Vermutung, dass chronisch demyelinisierte Axone eine abnormale molekulare Zusammensetzung aufweisen und dadurch „remyelinisierungsunfähig“ werden (Chang et al. 2002).

1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

MS ist durch das Vorhandensein von entzündlich entmarkenden ZNS-Läsionen gekennzeichnet, welche für die klinischen Symptome der Erkrankung mitverantwortlich sind. Neben den entmarkten Läsionen finden sich im ZNS der Patient*innen auch remyelinisierte Bereiche. Unter welchen Umständen sich eine akute Läsion zu einer chronisch entmarkten Läsion entwickelt bzw. welche Voraussetzungen erfüllt sein müssen, damit sie remyelinisiert, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Untersuchungen zur Remyelinisierung finden größtenteils in akuten demyelinisierenden Tiermodellen statt, wobei es einen Mangel an chronischen Modellen gibt. In dieser Arbeit sollen deswegen die De- und Remyelinisierung in einem spontanen Modell der EAE im Verlauf untersucht werden. Dieses Modell beruht auf der Kreuzung von TCR^{MOG} und IgH^{MOG} einzeltransgenen Mäusen, welche zu etwa 50% im Alter von vier bis acht Wochen eine spontane EAE entwickeln. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach

Krankheitsbeginn untersucht, wobei das akute Krankheitsstadium nach zwei bis sechs Tagen erreicht war und eine Krankheitsdauer von ein, drei, sechs oder neun Monaten als chronisch galt. Anschließend wurde das Gewebe für histopathologische Untersuchungen aufgearbeitet und lichtmikroskopisch untersucht. Da für die Remyelinisierung die myelinisierenden Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen zuständig sind, wurde in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf ihre histopathologische Charakterisierung in akuten und chronischen EAE-Läsionen gelegt. Im Detail sollten folgenden Fragen untersucht werden:

- 1) Gibt es Hinweise auf Remyelinisierung oder bleibt die Läsionsgröße in chronischen, klinisch stabilen Erkrankungsphasen konstant?
- 2) Wie hoch ist die Dichte der maturen Oligodendrozyten und ihrer Vorläuferzellen in akuten und chronischen EAE-Läsionen?
- 3) Wie entzündlich aktiv sind die Läsionen? Findet auch in chronischen Läsionen eine erneute Infiltration von Entzündungszellen statt und kommt es zu wiederholter Entmarkung?
- 4) Kommt es mit zunehmender Krankheitsdauer zu einem Verlust an Axonen?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Eigenschaften und Aufzucht

Es handelte sich bei den Versuchstieren um Mäuse mit dem OSE-Genotyp. Die Mäuse wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet und für mehr als zwölf Generationen mit C57BL/6J rückgekreuzt. OSE-Mäuse sind eine Züchtung aus 2D2- und TH-Mäusen. Sie besitzen daher einen MOG spezifischen T- und B-Zellrezeptor. Bei der Aufzucht herrschten spezifisch pathogenfreie Bedingungen (SPF). Die Tiere wurden in konventionellen Käfigen mit bis zu fünf Tieren bei gleichbleibender Temperatur und Feuchtigkeit gehalten und unterlagen einem Tag-Nacht-Rhythmus, sodass die Mäuse zwölf Stunden unter Lichteinfluss und zwölf Stunden bei Dunkelheit lebten. Es wurde ihnen Wasser und Pressfutter ad libitum verabreicht, welches bei Verschlechterung des Gesundheitszustandes durch Breifutter ersetzt wurde. Alle Tierversuche wurden gemäß der Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaft vom 24. November 1986 (86/EWG) durchgeführt und von der Regierung des Bundeslandes Niedersachsen genehmigt.

50% der OSE-Mäuse erkrankten im Alter von vier bis acht Wochen spontan an EAE und wurden über verschiedene Zeiträume verlaufsbeobachtet, bis sie zur histologischen Beurteilung gelangten. Untersucht wurden ein akutes Stadium, welches ab Krankheitsbeginn einer Dauer von zwei bis sechs Tagen entsprach sowie die chronischen Stadien, mit einer Krankheitsdauer von einem, drei, sechs und neun Monaten.

2.1.2 Klinische Einteilung

Die spontan erkrankten Tiere wurden täglich untersucht und das Ausmaß ihrer Lähmungen nach unten stehender Skala („Score“) eingeteilt.

Ab einem Score von 3,5 und/oder einer Gewichtsabnahme von 25% wurde der Versuch abgebrochen und die Tiere schmerzfrei getötet. Der Score dient der Einordnung des Krankheitszustandes der Mäuse.

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Mäuse

Score	Klinik
0	gesund
0,5	Parese der Schwanzspitze

Score	Klinik
1	Parese des gesamten Schwanzes
1,5	Parese des Schwanzes und geringe Hinterbeinschwäche
2	deutliche Hinterbeinschwäche
2,5	kein Aufrichten des Tieres aus der Seitenlage mehr möglich
3	Parese der Hinterbeine und Bauchmuskelschwäche
3,5	Paraplegie der Hinterbeine und Vorderbeinschwäche
4	Tetraplegie
4,5	Inkontinenz
5	Tod durch EAE

2.1.3 Genotypisierung

Um den Genotyp der Mäuse zu bestimmen, wurde DNA isoliert und eine herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.

In einem Alter von zwei bis drei Wochen wurden die Mäuse an der Schwanzspitze oder Ohrmuschel biopsiert. Um das gewonnene Gewebe aufzulösen, inkubierte man es über Nacht bei 56 °C in einer Lösung mit 20 µl Proteinase K in 350 µl Lyse-Puffer. Hiernach wurden die Proben fünf Minuten bei 13200 rpm (revolutions per minute) zentrifugiert. Zum gewonnenen Überstand gab man 350 µl Isopropanol. Die DNA präzipitierte und bildete nach weiterem fünfminütigem Zentrifugieren ein Pellet am Boden. Nachdem man den Überstand verwarf, gab man zur Reinigung des Pellets 500 µl 70%iges Ethanol hinzu und zentrifugierte wiederum. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 20 Minuten bei 45 °C getrocknet um den Alkohol gänzlich zu entfernen. Zum Schluss wurde die DNA in 100 µl H₂O resuspendiert.

Im Folgenden wurde ein dem Gen entsprechender Master-Mix hergestellt. Dies erfolgte für alle Proben und ist den unten stehenden Tabellen zu entnehmen. Hiernach teilte man den Master-Mix auf die Proben auf und gab sie in den Thermocycler. Hier erfolgte eine Amplifikation der DNA-Proben nach unten aufgeführten Tabellen. Anschließend gab man die DNA-Proben auf ein 2%iges Agarosegel. Dieses enthielt in die DNA interkalierendes Ethidiumbromid. Für 60 Minuten legte man eine 90 Volt Spannung bei einer Stromstärke von 400 mA an. Die negativ geladenen DNA-Stränge wanderten nun je nach Basenpaargröße in unterschiedlicher Geschwindigkeit in Richtung Anode. Hiernach konnten die Banden unter UV-Licht anhand ihrer Basenpaargröße bestimmt werden, indem man sie mit einer in ihrer Basenpaaranzahl bekannten Leiter verglich.

Tabelle 2: Master-Mix für die 2D2-Genotypisierung

Bezeichnung	Volumen [μ l]	Hersteller
5x Puffer	4	Promega Corporation, Madison, WI, USA
10 mM dNTPs	0,4	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10 μ M Forward-Primer	0,5	Microsynth AG, Balgach Schweiz
10 μ M Reverse-Primer	0,5	Microsynth AG, Balgach Schweiz
5 U/ μ l Taq Polymerase	0,1	Promega Corporation, Madison, WI, USA
H ₂ O	9,5	
DNA	5	

Tabelle 3: 2D2-Primersequenzen

Name	Gen	Nukleotid-Sequenz
Ja18-2D2-M	Valpha 3.2 TCR	5'GCGGCCGCAATTCCCAGAGACATCCC TCC3'
Va3.2-2D2-M	Valpha 3.2 TCR	5'CCCGGGCAAGGCTCAGCCATGCTCCT G3'

Tabelle 4: Master-Mix für die MOG-IgG-Genotypisierung

Bezeichnung	Volumen [μ l]	Hersteller
5x Puffer	4	Promega Corporation, Madison, WI, USA
10 mM dNTPs	0,4	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10 μ M Forward-Primer wt	0,5	Microsynth AG, Balgach Schweiz
10 μ M Reverse-Primer wt	0,5	Microsynth AG, Balgach Schweiz
10 μ M Forward-Primer tg	0,5	Microsynth AG, Balgach Schweiz
10 μ M Reverse-Primer tg	0,5	Microsynth AG, Balgach Schweiz
5 U/ μ l Taq Polymerase	0,1	Promega Corporation, Madison, WI, USA
H ₂ O	8,5	
DNA	5	

Tabelle 5: MOG-IgG-Primersequenzen

Name	Gen	Nukleotid-Sequenz
8.18C5-sense #1	anti-MOG IgH (8.18C5)	5'TGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGT3'
8.18C5-AS #2	anti-MOG IgH (8.18C5)	5'GGAGACTGTGAGAGTGGTGCCT3'
mIgH-sense #1	Ig heavy chain	5'ATTGGTCCCTGACTCAAGAGATG3'
mIgH-AS #2	Ig heavy chain	5'TGGTGCTCCGCTTAGTCAAA3'

Tabelle 6: Thermocycler-Programm für die 2D2-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anmerkung
1.	95	2	
2.	95	1	
3.	58	1	
4.	72	1	nach Schritt 4. wieder zu 2. (30 mal)
5.	72	10	
6.	14	unendlich	

Tabelle 7: Thermocycler-Programm für die MOG-IgG-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anmerkung
1.	95	2	
2.	95	1	
3.	61	1	
4.	72	1	nach Schritt 4. wieder zu 2. (30 mal)
5.	72	10	
6.	14	unendlich	

2.1.3.1 Materialien

Tabelle 8: Verwendete Materialien und Geräte bei der Genotypisierung

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Lyse-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 5 mM EDTA 200 mM NaCl 0,2% SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Proteinase K	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

2.1.4 Perfusion und Präparation

Nach Erkrankungsbeginn wurden die Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten für die histologische Untersuchung asserviert. Zur Beurteilung des akuten Stadiums erfolgte bei den Tieren die Perfusion am Höhepunkt der Erkrankung nach zwei bis sechs Tagen. Zur Beurteilung des chronischen Stadiums wurden die Tiere nach einem Zeitraum von einem, drei, sechs oder neun Monaten perfundiert. Es wurde eine Injektionslösung aus 2,4 ml Ketamin und 2 ml Xylazin mit 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl) auf 10 ml aufgefüllt. Den Mäusen wurde hiervon 100 µl/10 g Körpergewicht (KG) intraperitoneal verabreicht, sodass der Kornealreflex ausfiel und keine Schmerzreize mehr wahrgenommen wurden. Hiernach wurden der Thorax eröffnet und das Herz freigelegt. In das rechte Herzhorn erfolgte eine Inzision und über den linken Ventrikel mit einer Kanüle die Perfusion mit eiskaltem PBS (*phosphate buffered saline*) und anschließend mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS. Danach wurde eine Nachfixierung in 4%igem PFA für 48 Stunden bei 4 °C vollzogen. Daraufhin konnten das Gehirn und das Rückenmark der Mäuse präpariert und das Rückenmark in 3 mm dicke Scheiben zerteilt werden. Danach folgte in einem Einbettautomaten die Dehydrierung der Gewebe durch eine in ihrer Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe und das Einbetten in Paraffin. Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms in ca. 1 µm dicke Scheiben geschnitten, auf Objektträger gebracht und für 30 Minuten bei 58 °C in den Wärmeschrank gestellt.

2.1.4.1 Materialien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	Medistar GmbH, Ascheberg, Deutschland
NaCl	B. Braun GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Paraffin, Paraplast Plus	Tyco Healthcare GmbH, Neustadt an der Donau, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PFA (4%), in PBS gelöst	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylazin	Ecuphar, Oostcamp, Belgien
Ausgießstation, TES Valida	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Einbettautomat, Excelsior AS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlplatte, COP30	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Schlittenmikrotom, SM 2000 R	Leica, Wetzlar, Deutschland
Wärmeplatte, HI1220	Leica, Wetzlar, Deutschland

2.2 Histologische Färbungen

2.2.1 LFB-PAS-Färbung

2.2.1.1 Prinzip

Durch die LFB-Lösung wird Myelin bläulich angefärbt, da sie an Phospholipide bindet. Durch die Perjodsäure, durch die die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidieren, erscheinen diese durch Komplexbildung mit dem schwefelsauren Fuchsin des Schiff'schen Reagenz rot-violett. Die LFB-PAS-Färbung wurde in dieser Arbeit zur Darstellung der Demyelinisierung genutzt.

2.2.1.2 Ablauf

Zunächst erfolgten das Entparaffinieren der Rückenmarksquerschnitte durch Xylol und die Rehydrierung in einer in ihrer Konzentration absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 100% und 90%). Danach wurden die Schnitte in einer Küvette mit LFB-Lösung (1 g Luxol-Fast-

Blue, 1000 ml 96%iges Ethanol, 5 ml 10%ige Essigsäure) für einen Tag bei 60 °C inkubiert. Nach dem Einstellen der Schnitte in eine Küvette mit 90%igem Alkohol wurden sie differenziert, um den Überschuss der LFB-Lösung zu entfernen. Hierzu tauchte man sie in 0,05%iges Lithiumcarbonat und anschließend in 70%igen Alkohol und wusch sie mit Aqua dest. Nun gab man die Schnitte für fünf Minuten in 1%ige Perjodsäure und spülte sie für weitere fünf Minuten mit Leitungswasser und hiernach in Aqua dest. Danach gab man das Schiff'sche Reagenz für 20 Minuten auf die Schnitte und spülte sie für fünf Minuten in Leitungswasser. Daraufhin folgte das zweiminütige Färben mit Mayers Hämalaun und anschließendes Spülen mit Aqua dest. Nach kurzem Differenzieren in 1%iger Salzsäure-Ethanol-Lösung erfolgte das Bläuen in Leitungswasser. Für die Dehydrierung der Schnitte wurden sie in einer in ihrer Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100%, 100%) und Xylol getaucht. Zum Schluss erfolgte das Eindeckeln der Schnitte mit Entellan new.

2.2.1.3 Materialien

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien bei der LFB-PAS-Färbung

Bezeichnung	Hersteller
Chlorwasserstoff	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Entellan new	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG., Renningen, Deutschland
Lithiumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Perjodsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schiff'sches Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Solvent blue 38	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Xylol	Chemsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG., Renningen, Deutschland

2.2.2 Bielschowsky-Versilberung

2.2.2.1 Prinzip

Mit Hilfe der Bielschowsky-Versilberung werden Axone durch ihren Gehalt an Neurofibrillen durch Versilberung schwarz gefärbt.

2.2.2.2 Ablauf

Zunächst erfolgten das Entparaffinieren der Rückenmarksquerschnitte durch Xylol und die Rehydrierung in einer in ihrer Konzentration absteigenden Alkoholreihe. Nachdem die Schnitte für 20 Minuten in eine 20%ige Silbernitrat-Wasser-Lösung gegeben wurden, spülte man sie mit Aqua bidest. und inkubierte sie im Dunkeln für 15 Minuten mit einer Silbernitrat- und 32%iger Ammoniak-Aqua-bidest.-Lösung. Daraufhin wurden die Schnitte erneut mit Aqua bidest. gespült und mit Entwicklerlösung (20 mg Formalin, 100 ml Aqua bidest., 0,5 g Citronensäure, 0,1 ml 65%ige Salpetersäure) beträufelt (zehn Tropfen). Danach erfolgte die Inkubation dieser Schnitte für eine Minute in einer Lösung aus der oben genannten Silbernitrat-/Ammoniaklösung sowie 13 Tropfen der Entwicklerlösung. Nach erneuter Spülung mit Aqua bidest. wurde zur Fixierung 2%iges Natriumthiosulfat zugegeben. Für die Dehydrierung der Schnitte wurden sie in einer in ihrer Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100%, 100%) und Xylol getaucht. Zum Schluss erfolgte das Eindeckeln der Schnitte mit Entellan new.

2.2.2.3 Materialien

Tabelle 11: Verwendete Reagenzien bei der Bielschowsky-Versilberung

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniaklösung (32% in Aqua bidest.)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Entellan new	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formalin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG., Renningen, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salpetersäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Chemsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG., Renningen, Deutschland

2.2.3 Immunhistochemische Färbungen

In der vorliegenden Arbeit wurden Doppelfärbungen mit Hilfe immunhistochemischer Methoden angefertigt. Hierbei wurden die Labelled Strept-Avidin-Biotin-Methode (LSAB) und die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) angewandt. Mit Hilfe der LSAB-Methode wurde gegen NogoA und Olig2 gefärbt. Bei NogoA wurden Oligodendrozyten angefärbt, bei Olig2 Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen. Des Weiteren konnte mit dieser Methode gegen Mac3 und S100A9 gefärbt werden, wodurch Makrophagen sichtbar wurden. Im Anschluss wurde mit der APAAP-Methode gegen MBP gefärbt, wodurch sich das Myelin und die Läsionen erkennen lassen.

2.2.3.1 Prinzip der LSAB-Methode

Bei der sogenannten LSAB-Methode wird die Affinität zwischen (Strept-)avidin und Biotin genutzt. Zuerst wird auf das Präparat ein Primärantikörper gegeben, der gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist. Danach fügt man einen biotinylierten Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet sein muss, hinzu. Dieser bindet nun an den Primärantikörper. Daraufhin wird mit Peroxidase markiertes Avidin/Streptavidin aufgebracht, welches sich durch die Affinität zu Biotin an den Sekundärantikörper bindet. Nachdem man die Schnitte nun in die DAB-Lösung einbringt, wird das DAB von der Peroxidase oxidiert, und es ergibt sich ein braunes Reaktionsprodukt, das lokal präzipitiert. H_2O_2 dient in dieser Reaktion als Startgeber und wird zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt.

2.2.3.2 Ablauf (LSAB-Methode)

Als Erstes erfolgten das Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte, indem sie für zehn Minuten in Xylol und anschließend je fünf Minuten in eine in ihrer Konzentration absteigende Alkohol-Reihe (100%, 90%, 70%, 50%) und zuletzt in Aqua dest. gegeben und gespült wurden. Dann folgte die Vorbehandlung je nach Primärantikörper zur Antigendemaskierung. Hierzu wurden die Schnitte je nach Antikörper (Tabelle 13) in Plastikküvetten entweder mit Citrat-Puffer oder Tris-EDTA-Puffer gegeben und in einer Mikrowelle je fünf Mal für drei Minuten bei 800 Watt erhitzt. Anschließend wurden diese Plastikküvetten der Mikrowelle entnommen und mit entionisiertem Wasser gespült, und die Schnitte in eine Küvette mit PBS gestellt. Für die Blockierung der endogenen Peroxidase kamen die Schnitte für zehn Minuten in 3%iges H_2O_2 (45 ml PBS + 5 ml 30%iges H_2O_2) und wurden danach mit PBS gespült. Für das Blockieren unspezifischer Bindungen wurde für zehn Minuten 120 μ l 10%iges Goat-Serum (in PBS) auf die Schnitte gegeben. Daraufhin wurde der Primärantikörper eingebracht und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Spülen mit PBS wurde der biotinylierte und in 10%iger Goat-/PBS-Lösung verdünnte Sekundärantikörper (Tabelle 14) aufgetragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wonach wiederum mit PBS gespült wurde. Danach wurde die 1:1000 mit Goat-/PBS-Lösung verdünnte Avidin-Peroxidase aufgebracht und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS gespült. Die

Entwicklung der Schnitte erfolgte in einer mit 50 ml PBS, 1 ml DAB-Stammlösung und 20 µl 30%igen H₂O₂ gefüllten Küvette, wobei die Farbintensität mit Hilfe eines Mikroskops kontrolliert wurde. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit entionisiertem Wasser gespült und in eine Schaukel eingebracht, woraufhin sie für 30 Sekunden in Mayers Hämalaun getaucht wurden. Die Schnitte wurden kurz in Aqua dest. gespült, in 1%ige Salzsäure-Ethanol-Lösung getaucht und für sieben Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Danach erfolgte die Dehydrierung der Schnitte durch eine in ihrer Konzentration aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100%, 100%) mit abschließendem Xylol für je fünf Minuten.

2.2.3.3 Prinzip der APAAP-Methode

Bei dieser immunhistochemischen Färbung wird ein bereits gebildeter löslicher Enzym/Anti-Enzym-Immunkomplex verwendet, bestehend aus Alkalischer-Phosphatase und dem dagegen gerichteten Antikörper Anti-Alkalische-Phosphatase. Bestandteile dieses Komplexes sind zum einen ein unkonjugierter Primäantikörper, ein unkonjugierter Sekundäantikörper und ein löslicher Enzym-Immunkomplex. Zunächst bindet der unkonjugierte Primäantikörper an ein bestimmtes Antigen. Der unkonjugierte Sekundäantikörper, welcher gegen die Immunglobuline der Spezies gerichtet sein muss, aus der der Primäantikörper und der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes stammen, bindet mit einem seiner Fab-Arme an den Fc-Teil des Primäantikörpers. Mit seinem zweiten Fab-Arm bindet er den Antikörper des Enzym-Immunkomplexes. Gibt man nun die Substrat-Chromogenlösung hinzu, in diesem Fall Fast Blue, wird das Antigen durch enzymatische Umsetzung sichtbar gemacht und erscheint in einem blauen Farbton. Das Substrat ist Naphtholphosphatester, welches durch die alkalische Phosphatase zu Phosphat und Phenolkomponenten umgesetzt wird. Es entstehen unlösliche Azofarbstoffe, indem die Phenole mit den Diazoniumsalzen, welche die farblosen Chromogene darstellen, reagieren.

2.2.3.4 Ablauf (APAAP-Methode)

Im Anschluss an den oben beschriebenen Ablauf der LSAB-Methode erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem Primäantikörper gegen das Antigen MBP (Tabelle 13). Hierbei wurden je 100 µl des verdünnten Primäantikörpers auf die Präparate gegeben und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TBS-Puffer (*tris-buffered saline*) pH 7,4 (Tris + NaCl + Aqua dest.) gespült und der in Tabelle 14 aufgeführte mit alkalischer Phosphatase konjugierte Sekundäantikörper aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur wurde wiederum mit TBS gespült. Für die Entwicklung der Schnitte wurden sie in die Färbelösung Fast Blue (49 ml Tris-Puffer pH 8,2 + 1 ml Naphthol-AS-Mix-Phosphate-Lösung (200 mg Naphthol-AS-Mix-Phosphate + 20 ml N,N-Dimethylformamid) + 50 µl Levamisol-Lösung + 25 mg Fast Blue BB Salt) gegeben, wobei auch hier die Farbintensität unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Danach wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült, für 30 Sekunden in Mayers

Hämalaun gegeben und anschließend wieder mit Aqua dest. gespült. Daraufhin wurden die Schnitte für sieben Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zum Schluss wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Aquatex wässrig eingedeckelt.

2.2.3.5 Materialien

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien und Geräte bei den immunhistochemischen Färbungen

Bezeichnung	Hersteller
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Avidin-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Citrat-Puffer (pH 6,0)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Chlorwasserstoff	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
DAB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Fast Blue BB Salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Goat-Serum (Donor Herd)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HCl	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mayers Hämalaun	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Naphthol-AS-Mix-Phosphate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Honeywell, Morristown, NJ, USA
PBS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-EDTA Puffer (pH 8,0)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Chemsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG., Renningen, Deutschland
Mikrowelle	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland

2.2.3.6 Verwendete Antikörper

Tabelle 13: Primärantikörper

Antigen	Spezies	Klonnr.	Hersteller	Vorbehandlung	färbt
Mac3 (M3/84)	Ratte	553322	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA	Mikrowelle, Citrat-Puffer	Makrophagen/ Mikroglia
MBP	Ratte	12	Abcam plc., Cambridge, England	Mikrowelle, Citrat-Puffer	Myelin
NogoA	Maus	11C7	Prof. Doron Merkler, Genf, Schweiz	Mikrowelle, Tris- EDTA-Puffer	Oligodendrozyte n
Olig2	Hase	-	IBL International, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz	Mikrowelle, Tris- EDTA-Puffer	Oligodendrozyte n und ihre Vorläufer
S100A9	Hase	-	Johannes Roth, Münster, Deutschland	Mikrowelle, Citrat-Puffer	Monozyten/ Makrophagen

Tabelle 14: Sekundärantikörper

Bezeichnung	konjugiert mit	Hersteller
Biotin conjugated Goat anti Rabbit IgG (H+L)	Biotin	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulins/ Biotinylated	Biotin	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Biotin conjugated Goat anti Rat igG (H+L)	Biotin	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Alkine Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat anti Rat IgG (H+L)	Alkalische Phosphatase	Jackson ImmunoResearch, Ely, England

2.2.4 Auswertung und Statistik

Die Schnitte der LFB-PAS-Färbung wurden zunächst eingescannt. Hiernach wurden am Computer mit der Software Fiji ImageJ die Fläche der weißen Substanz des Rückenmarks und die Läsionsgröße vermessen und in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

Die Rückenmarksquerschnitte, die immunhistochemisch mit Hilfe der LSAB- oder APAAP-Methode mit MBP doppelt-gefärbt wurden, wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops und eines standardisierten Zählgitters in der 400-fachen Vergrößerung untersucht. Es erfolgte jeweils die Bestimmung der Läsionsfläche sowie die darin enthaltene Zellzahl. Die Dichte der Zellen wurde pro mm² angegeben. Im Einzelnen wurden bei der NogoA-Färbung die reifen Oligodendrozyten und bei der Olig2-Färbung die Oligodendrozyten und deren Vorläufer gezählt. Bei den Kontrollmäusen wurde die Dichte der Zellen in der weißen Substanz des Rückenmarks ermittelt und pro mm² angegeben. Hierbei wurde bei jedem vorhandenen Rückenmarksquerschnitt eine Mindestfläche von 31.250 µm² ausgewertet.

Bei der S100A9-Färbung wurde die Läsionsfläche sowie die darin enthaltene Zellzahl der neu in die Läsion eingewanderten Monozyten und Makrophagen ermittelt. Die Dichte ist als Zellzahl pro mm² angegeben.

Mithilfe der Mac3-Färbung wurden die Rückenmarksquerschnitte einer jeden Maus bzgl. der Morphologie der Makrophagen und aktivierten Mikroglia beurteilt. Die Mäuse wurden aufgrund dieser Beurteilung ihrer Rückenmarksquerschnitte in die Scores 0 bis 3 eingeteilt. Score 0 bedeutet Makrophagen freie Läsionsflächen. Score 1 gab man den Läsionen mit verzweigten Makrophagen bzw. aktivierten Mikrogliazellen mit ihren Ausläufern. Score 2 teilte man Läsionen mit vergrößerten, schaumzelligen Makrophagen, jedoch ohne MBP-positive Myelinabbauprodukten im Zytoplasma zu. Score 3 erhielten die Läsionen mit

großen, runden, schaumzelligen Mac3-positiven Makrophagen mit MBP-positiven Myelinabbauprodukten im Zytoplasma, als Indiz für aktive Myelinphagozytose.

Bei der Bielschowsky-Versilberung wurden die Axone mit Hilfe eines Lichtmikroskops und eines standardisierten Zählgitters bei 400-facher Vergrößerung ermittelt. Ausgewertet wurden hierfür vergleichbar große Läsionsausschnitte zweier Rückenmarksquerschnitte pro Maus mit einer Mindestfläche von insgesamt $6.250 \mu\text{m}^2$. Die Dichte der Axone wurde pro mm^2 angegeben. Bei den Kontrollmäusen wurde ebenfalls die Dichte der Axone ermittelt, wobei pro Maus ebenfalls zwei Rückenmarksquerschnitte ausgewertet wurden und die eben genannte Gesamtmindestfläche innerhalb der weißen Substanz des Rückenmarks analysiert wurde.

Die ermittelten Messwerte wurden mit Hilfe der Software GraphPad in Form von Diagrammen dargestellt.

Bezüglich der Statistik wurden die Werte auf Normalverteilung mit dem *KS normality test* getestet. Da die Werte keine Normalverteilung aufwiesen, führten wir hiernach den *Kruskal Wallis Test* mit dem *Dunn's multiple comparisons test* als Posttest durch. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

2.2.4.1 Materialien

Tabelle 15: Verwendete Materialien bei der histologischen Auswertung

Bezeichnung	Hersteller
BX51 Olympus Lichtmikroskop ausgestattet mit DP71 Digital- und XM10 Monochromkamera	Olympus, Hamburg, Deutschland
GraphPad Prism 5.01 (Statistische Analysegraphen)	GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA
Fiji ImageJ (Bildverarbeitung und Bildanalyse)	National Institutes of Health und Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, Madison, WI, USA
VS120 Virtual slide microscope	Olympus, Hamburg, Deutschland

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in einem spontanen EAE-Mausmodell die Läsionsentwicklung in Abhängigkeit der Krankheitsdauer zu charakterisieren. Insbesondere die Frage, ob demyelinisierte Läsionen in chronischen Krankheitsstadien remyelinisieren können oder entmarkt bleiben, sollte untersucht werden. Dafür wurde ein besonderer Fokus auf die myelinbildenden Oligodendrozyten gelegt. Des Weiteren wurden die Entzündungsaktivität und ein potentieller axonaler Verlust in den demyelinisierten Bereichen analysiert.

Die zu untersuchenden doppelt-transgenen OSE-Mäuse, welche man aus einer Kreuzung aus 2D2-Mäusen mit anti-MOG T-Zellen und TH-Mäusen mit anti-MOG B-Zellen erhielt, entwickelten spontan eine EAE. Sie wurden verlaufsbeobachtet und gelangten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ausbruch der Krankheit zur histologischen Beurteilung (Abbildung 2). Anschließend wurden neben der Dichte der Oligodendroglia die der Monozyten/Makrophagen und Axone sowie die Morphologie der Makrophagen/Mikroglia in den Rückenmarksläsionen der Maus histopathologisch untersucht.

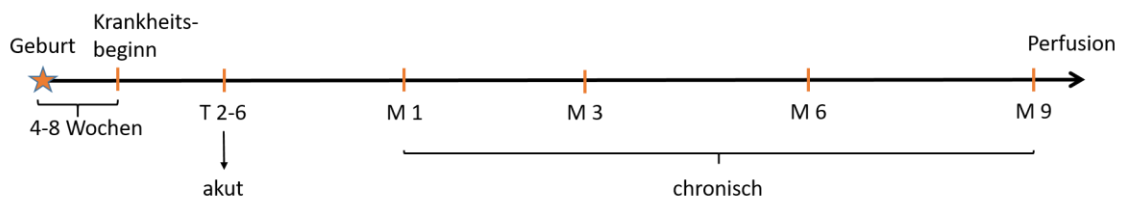


Abbildung 2: **Versuchsaufbau mit Zeitpunkten der Untersuchung:** Die Mäuse erkrankten im Alter von ca. vier bis acht Wochen an EAE. Um das akute Stadium zu beurteilen, erfolgte bei einigen Tieren die Untersuchung auf dem Höhepunkt der Krankheit nach zwei bis sechs Tagen. Um das chronische Stadium zu beurteilen, wurden die Tiere nach einem Monat, drei Monaten, sechs Monaten oder neun Monaten nach dem Ausbruch der Krankheit untersucht.

3.1 Die Demyelinisierung nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer ab

Um zu untersuchen, ob chronische EAE-Läsionen remyelinisieren bzw. um das Ausmaß der Demyelinisierung im Rückenmark zu ermitteln, wurden histologische Schnitte des Rückenmarks angefertigt und mit LFB-PAS gefärbt. Die entmarkten Areale erschienen hierdurch farblos bzw. rosa und die myelinhaltigen Areale bläulich (Abbildung 3). Mit Hilfe der Färbung wurde das entmarkte Areal im akuten Krankheitsstadium (zwei bis sechs Tage) und in den chronischen Krankheitsstadien (ein, drei, sechs und neun Monate) gemessen und in ein prozentuales Verhältnis zur weißen Substanz des Rückenmarks gesetzt (Abbildung 4).

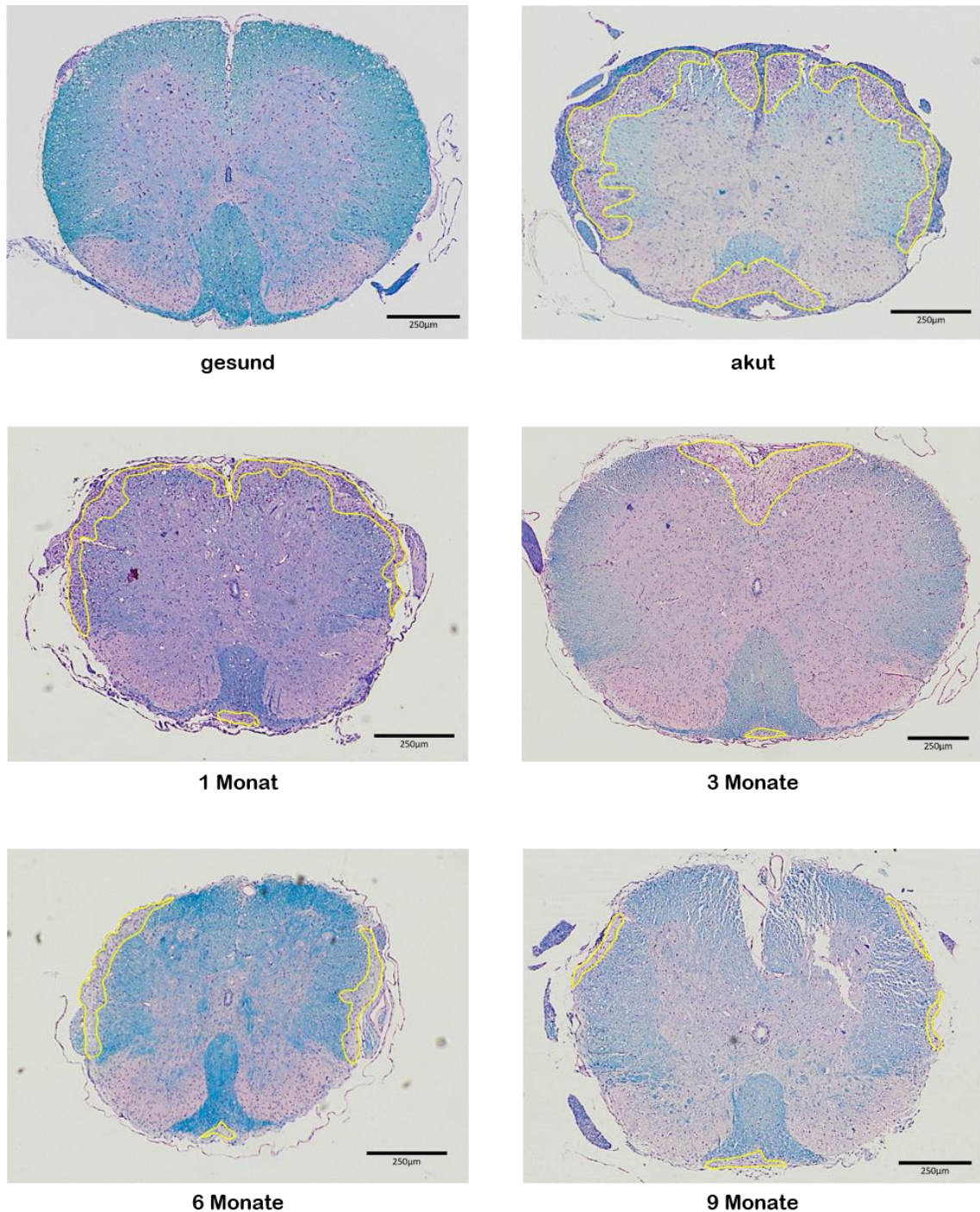


Abbildung 3: **Rückenmarksquerschnitte mit Läsionsflächen:** Repräsentative Bilder der histologischen Färbung LFB-PAS, welche Myelin blau färbt. Es sind die gesunden Kontrollmäuse sowie Mäuse in der akuten Krankheitsphase (zwei bis sechs Tage) und den chronischen Krankheitsphasen (ein, drei, sechs und neun Monate) dargestellt. Die gelb umrandeten Areale zeigen die entmarkten Läsionen innerhalb der weißen Substanz des Rückenmarks. Der Messbalken entspricht 250 μm.

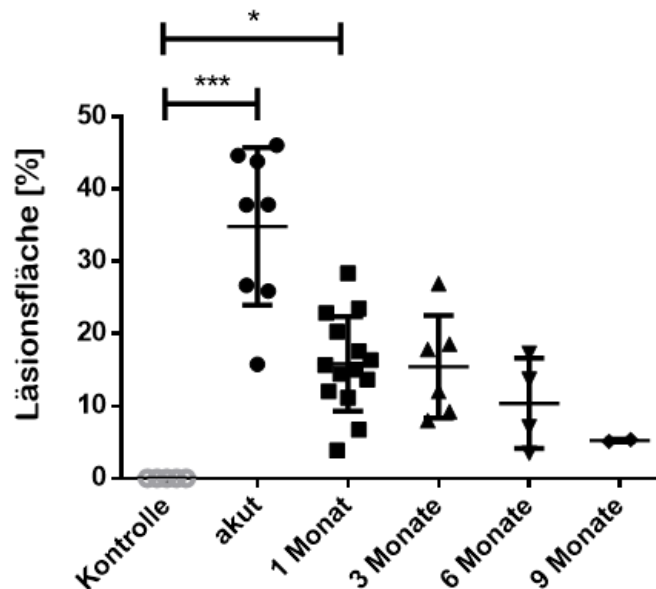


Abbildung 4: **Das demyelinisierte Areal nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer ab:** Prozentualer Anteil der jeweiligen Läsionsflächen an der weißen Substanz des Rückenmarks in der akuten Krankheitsphase (zwei bis sechs Tage) und den chronischen Krankheitsphasen (ein, drei, sechs und neun Monate) der Maus (Anzahl der Mäuse: Kontrolle n=5; akut n=8; 1 Monat n=14; 3 Monate n=5; 6 Monate n=4; 9 Monate n=2). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Als statistischer Test wurde der *Kruskal Wallis Test*, mit dem *Dunn's multiple comparisons test* als Posttest, angewendet (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Die gesunden Kontrollmäuse zeigten keine Läsionen. Bei den Mäusen im akuten Krankheitsstadium war durchschnittlich $35 \pm 11\%$ (Mittelwert \pm SD) der weißen Substanz des Rückenmarks demyelinisiert. Der Prozentsatz an entmarkter Fläche war zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den akut erkrankten Mäusen signifikant unterschiedlich (*** $p < 0,001$). Im ein- und dreimonatigem Krankheitsstadium waren $15 \pm 7\%$ der weißen Substanz demyelinisiert, wobei hierbei der Unterschied zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den Mäusen mit einer einmonatigen Krankheitsdauer signifikant war (* $p < 0,05$). Bei den Mäusen im sechsmonatigen Krankheitsstadium wurde eine Läsionsfläche von $10 \pm 6\%$, und beim neunmonatigen Krankheitsstadium von $5 \pm 0\%$ ermittelt. Hier konnte hinsichtlich der entmarkten Flächen kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollmäusen ermittelt werden. Anhand der Werte ist demnach eine Abnahme der demyelinisierten Areale über die Krankheitsdauer erkennbar.

3.2 Die Dichte der Olig2-positiven Oligodendrozyten ist in den chronischen EAE-Läsionen reduziert

Um zu untersuchen, ob es zu einem Verlust von Olig2-positiven Oligodendrozyten in chronischen Läsionen kommt bzw. um die Anzahl derer in den entmarkten Läsionen zu

bestimmen, nutzten wir die immunhistochemische Doppelfärbung MBP/Olig2 (Abbildung 5). Hierbei wurde bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe des Lichtmikroskops und eines standardisierten Zählgitters die Zellzahl pro mm^2 in der Läsion ermittelt (Abbildung 6).

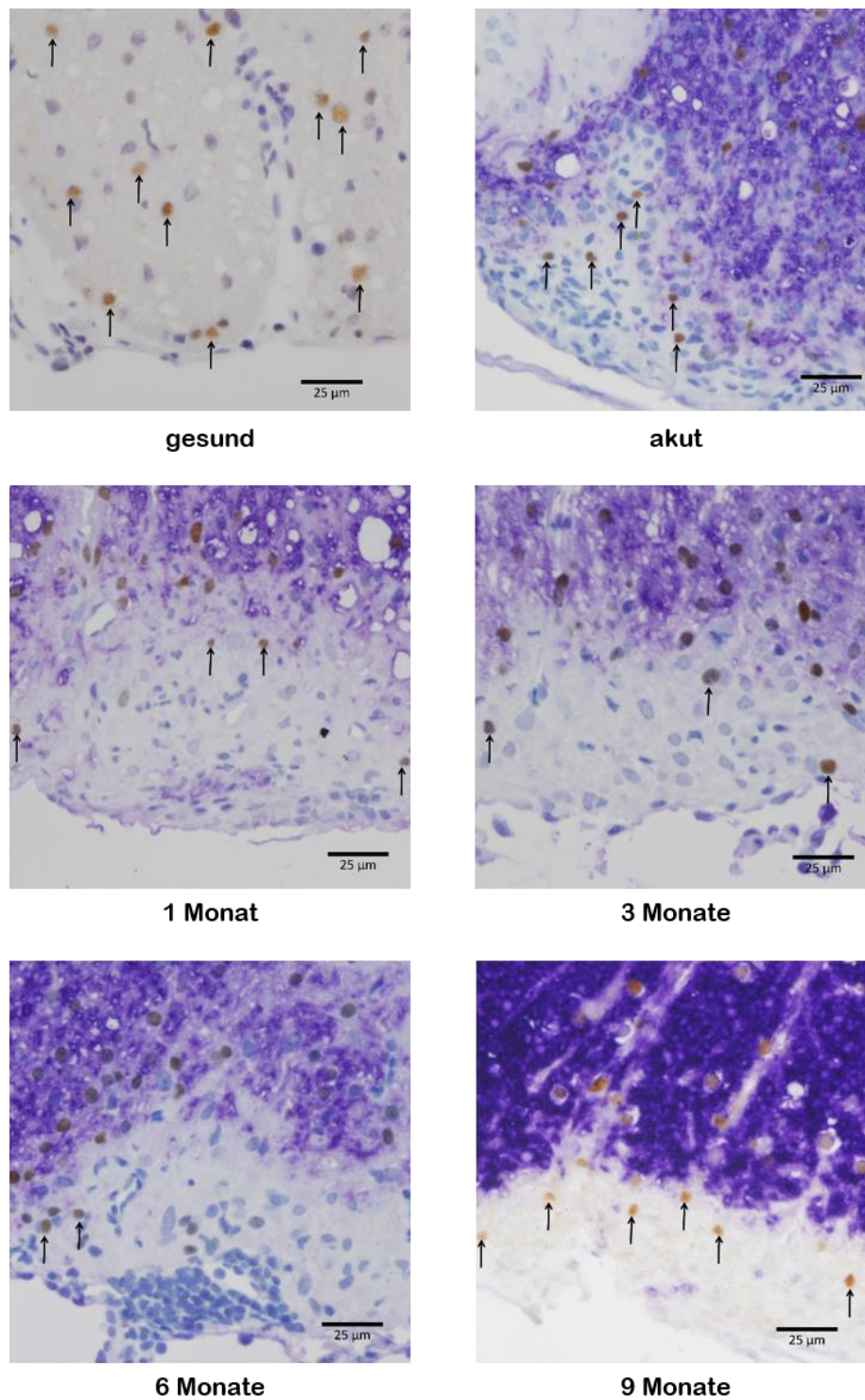


Abbildung 5: **Rückenmarksausschnitte mit Olig2-positiven Oligodendrozyten:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Doppelfärbung MBP (blau gefärbt) und Olig2 (braun gefärbt) von Mäusen in der akuten Krankheitsphase (zwei bis sechs Tage) und den chronischen Krankheitsphasen (ein, drei, sechs und neun Monate). Bei den erkrankten Mäusen sind die Zellen innerhalb der Läsionen und bei den gesunden Mäusen in der weißen

Substanz durch Pfeile gekennzeichnet. In den gesunden Mäusen wurde keine Anfärbung des Myelins mit MBP-Immunhistochemie durchgeführt. Der Messbalken entspricht jeweils 25 μm .

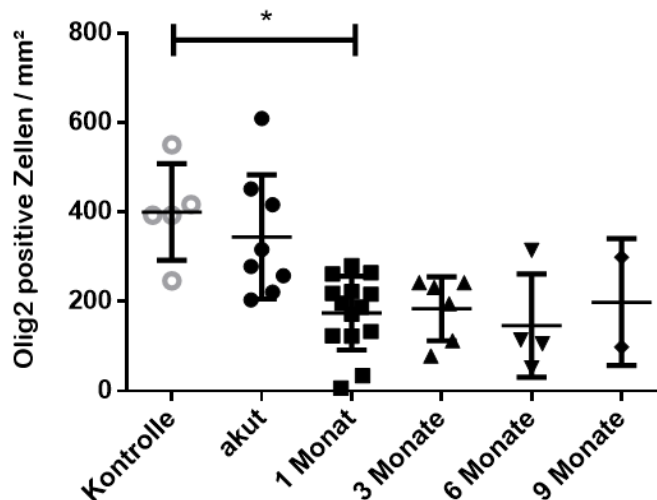


Abbildung 6: Die Dichte der Olig2-positiven Oligodendrozyten ist in den chronisch erkrankten Mäusen um etwa die Hälfte reduziert: Dichte der Olig2-positiven Zellen in der weißen Substanz von Kontrollmäusen und den entmarkten Läsionen der Mäuse in der akuten Krankheitsphase von zwei bis sechs Tagen und der Mäuse in den chronischen Krankheitsphasen von ein, drei, sechs und neun Monaten (Anzahl der Mäuse: Kontrolle $n=5$; akut $n=8$; 1 Monat $n=14$; 3 Monate $n=5$; 6 Monate $n=4$; 9 Monate $n=2$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Als statistischer Test wurde der *Kruskal Wallis Test*, mit dem *Dunn's multiple comparisons test* als Posttest, angewendet (* $p < 0,05$).

Bei den Mäusen in der akuten Krankheitsphase ist die mittlere Dichte der Oligodendrozyten ähnlich hoch wie bei den gesunden Kontrolltieren, deren Mittelwert bei 400 ± 108 Olig2-positiven Zellen/ mm^2 liegt. Bei den Mäusen mit einer Krankheitsdauer von ein bis neun Monaten sind die Mittelwerte im Vergleich um etwa die Hälfte reduziert. Es war nur ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den Mäusen mit einer einmonatigen Krankheitsdauer festzustellen (* $p < 0,05$).

3.3 Die Dichte der NogoA-positiven Oligodendrozyten ist in den akuten und späten chronischen EAE-Läsionen reduziert

Um zu untersuchen, ob es zu einem Verlust von NogoA-positiven Oligodendrozyten in chronischen Läsionen kommt bzw. um die Anzahl dieser reifen Oligodendrozyten in den entmarkten Läsionen zu bestimmen, nutzten wir die immunhistochemische Doppelfärbung MBP/NogoA (Abbildung 7). Hierbei wurde bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe des

Lichtmikroskops und eines standardisierten Zählgitters die Zellzahl pro mm^2 in der Läsion ermittelt (Abbildung 8).

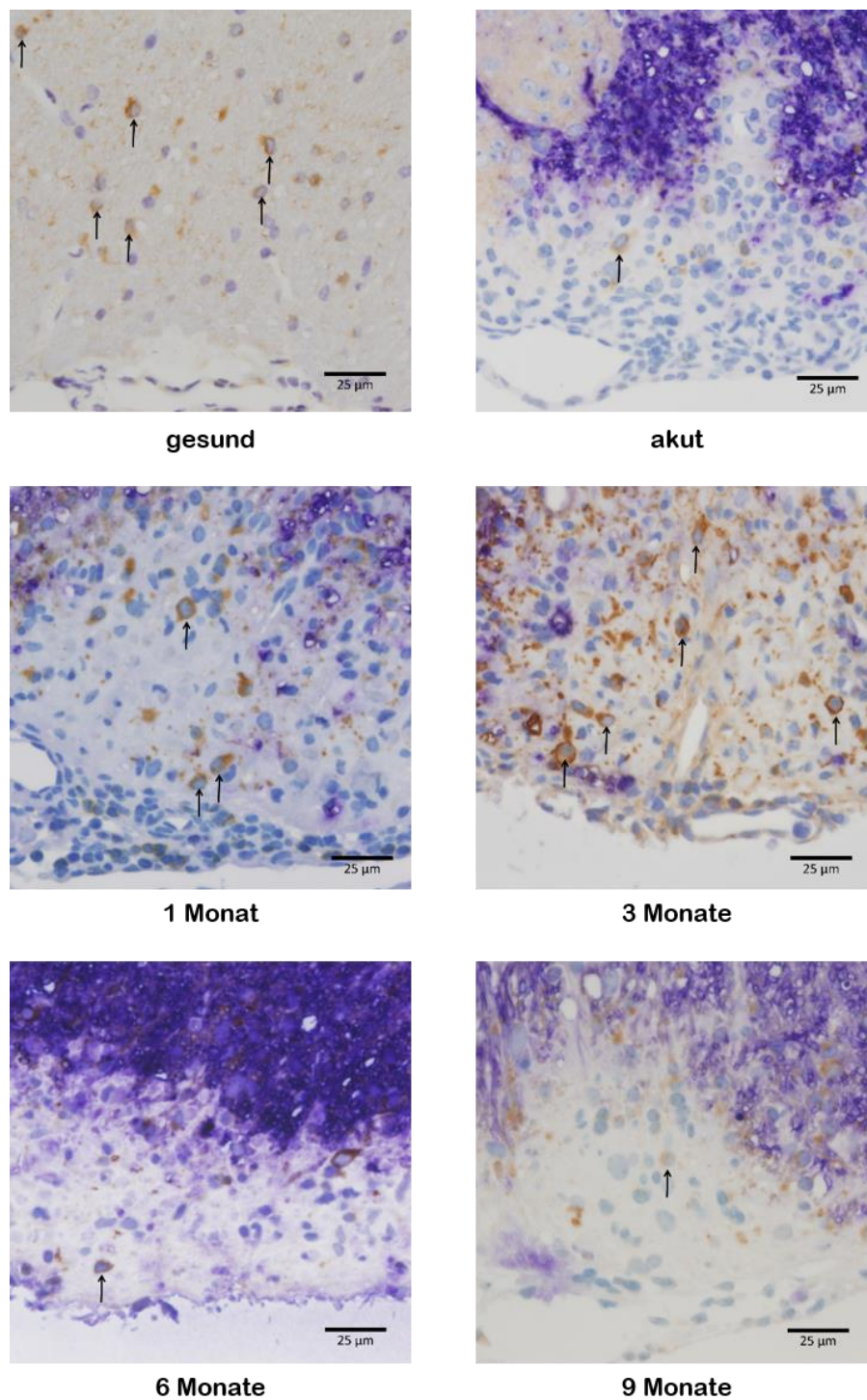


Abbildung 7: **Rückenmarksausschnitte mit NogoA-positiven Oligodendrozyten:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Doppelfärbung MBP (blau gefärbt)/NogoA (braun) der Mäuse in der akuten Krankheitsphase (zwei bis sechs Tage) und den chronischen Krankheitsphasen (ein, drei, sechs und neun Monate). Die reifen Oligodendrozyten stellen sich braun gefärbt mit blauem Zellkern (Hämalaun-Kerngegenfärbung) dar. Bei den erkrankten Mäusen sind sie innerhalb der Läsionen und bei

den gesunden Mäusen in der weißen Substanz durch Pfeile gekennzeichnet. In den gesunden Mäusen wurde keine Anfärbung des Myelins mit MBP-Immunhistochemie durchgeführt. Der Messbalken entspricht jeweils 25 μm .

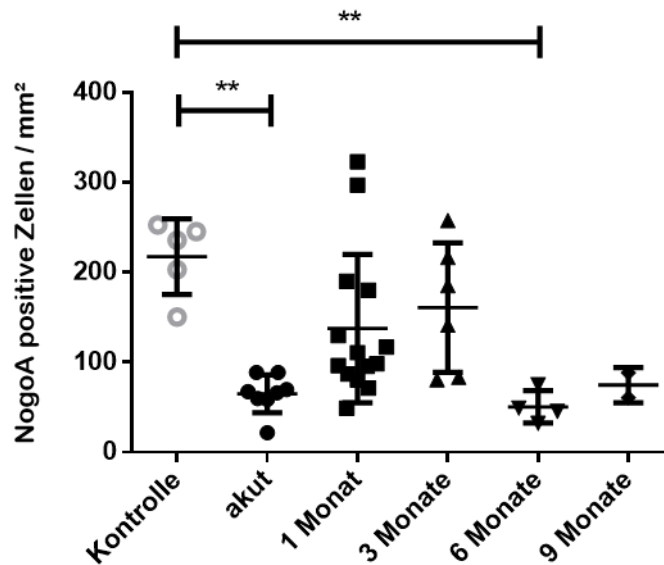


Abbildung 8: **Die Dichte der NogoA-positiven Oligodendrozyten ist in den akuten und späten chronischen EAE-Läsionen reduziert:** Dichte der NogoA-positiven Zellen in der weißen Substanz von Kontrollmäusen und den entmarkten Läsionen der Mäuse in der akuten Krankheitsphase von zwei bis sechs Tagen und den Mäusen in den chronischen Krankheitsphasen von ein, drei, sechs und neun Monaten (Anzahl der Mäuse: Kontrolle n=5; akut n=8; 1 Monat n=14; 3 Monate n=5; 6 Monate n=4; 9 Monate n=2). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Als statistischer Test wurde der *Kruskal Wallis Test*, mit dem *Dunn's multiple comparisons test* als Posttest, angewendet (** $p < 0,01$).

Im Vergleich zum Mittelwert der gesunden Kontrollmäuse, der bei 218 ± 42 NogoA-positiven Zellen/ mm^2 liegt, ist die Anzahl der NogoA-positiven Zellen bei den Mäusen mit akuter EAE auf etwa ein Drittel reduziert (** $p < 0,01$). Die mittlere Anzahl dieser steigt bis drei Monate auf 161 ± 72 NogoA-positiven Zellen/ mm^2 und erreicht demnach nicht das Niveau der Kontrollgruppe. Die Dichte NogoA-positiver Zellen in Läsionen von Mäusen mit einer sechsmonatigen Krankheitsdauer ist gegenüber der Kontrollgruppe reduziert und mit 51 ± 18 NogoA-positiven Zellen/ mm^2 ähnlich dem von Mäusen in der akuten Krankheitsphase. Es war ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den Mäusen mit einer sechsmonatigen Krankheitsdauer festzustellen (** $p < 0,01$). Vergleichbar reduziert ist die Dichte NogoA-positiver Zellen in Läsionen von Mäusen mit einer neunmonatigen Krankheitsdauer.

3.4 Die Dichte frisch eingewanderter Entzündungszellen ist nur in akuten EAE-Läsionen stark erhöht

Obwohl der Rückgang der Läsionsgröße über die Zeit in der LFB-PAS-Färbung darauf hindeutet, dass Remyelinisierung stattfindet, ist diese nicht komplett. Darüber hinaus ist ein starker Rückgang an Oligodendrozyten in chronischen Läsionen zu beobachten. Eine Erklärung für diesen Rückgang könnte eine kontinuierliche entmarkende Aktivität oder eine schubhafte wiederholte Makrophageninfiltration verbunden mit erneuter Myelinphagozytose sein. Dies würde zu einer dauerhaften oder wiederholten Oligodendrozytenschädigung führen, was letztlich auch zu einer Erschöpfung des Oligodendrozytenvorläuferpools führen könnte. Einhergehend mit diesen Überlegungen untersuchten wir die Phagozyten innerhalb der Läsionen in den verschiedenen Krankheitsstadien.

Um kürzlich eingewanderte Monozyten/Makrophagen und damit frisch entzündlich infiltrierte Läsionen festzustellen, nutzten wir die immunhistochemische Doppelfärbung MBP/S100A9 (Abbildung 9). Hierbei wurde bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe des Lichtmikroskops und eines standardisierten Zählgitters die Zellzahl pro mm² in der Läsion ermittelt (Abbildung 10).

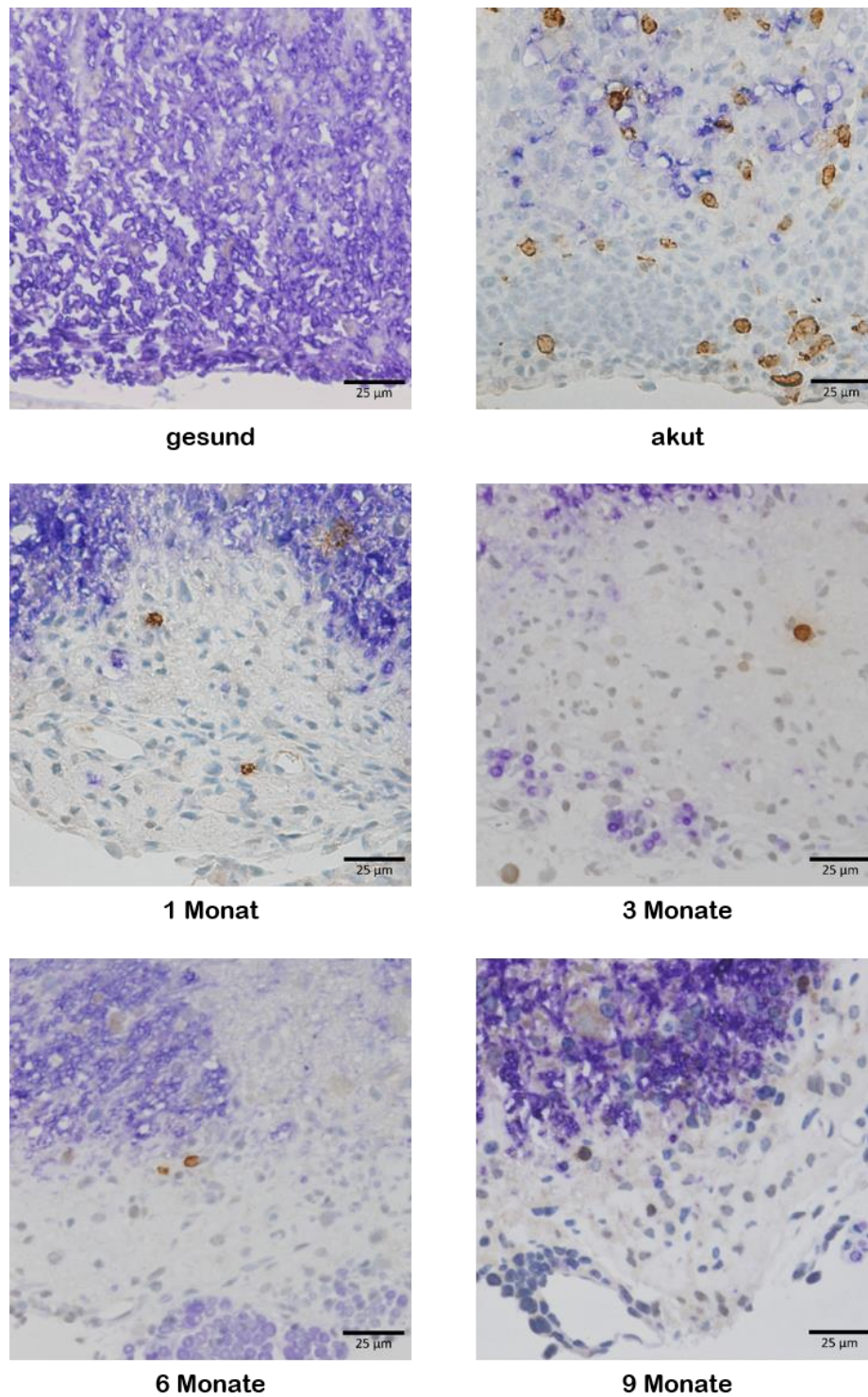


Abbildung 9: **Rückenmarksausschnitte mit S100A9-positiven Zellen:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Doppelfärbung MBP (blau gefärbt)/S100A9 (braun gefärbt) der gesunden Kontrolltiere sowie in der akuten Krankheitsphase (zwei bis sechs Tage) und den chronischen Krankheitsphasen (ein, drei, sechs und neun Monate). Kürzlich eingewanderte Monozyten und Makrophagen sowie auch Granulozyten stellen sich braun gefärbt dar. Der Messbalken entspricht jeweils 25 µm.

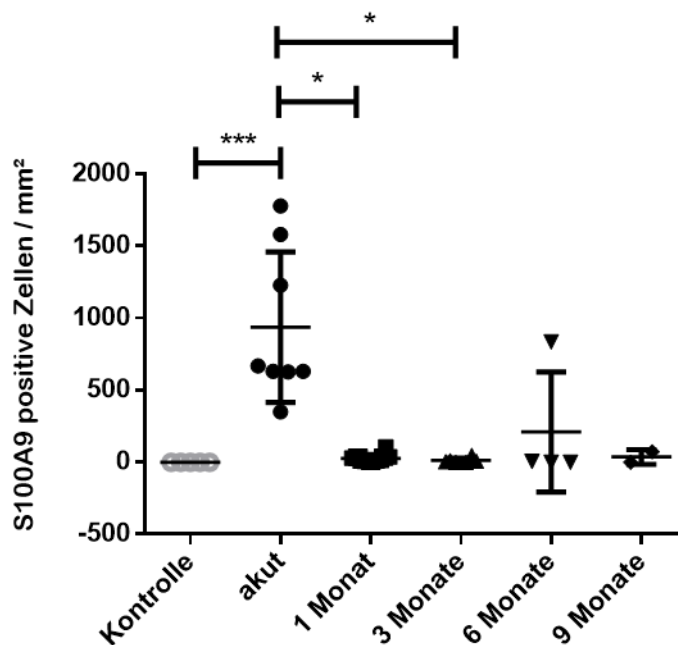


Abbildung 10: **Die Dichte der S100A9-positiven Zellen ist nur in den akuten EAE-Läsionen stark erhöht:** Bei den gesunden Kontrollmäusen waren keine S100A9-positiven Zellen vorhanden. Dichte der S100A9-positiven Zellen in den entmarkten Läsionen der Mäuse in der akuten Krankheitsphase von zwei bis sechs Tagen und der Mäuse in den chronischen Krankheitsphasen von ein, drei, sechs und neun Monaten (Anzahl der Mäuse: Kontrolle n=5; akut n=8; 1 Monat n=14; 3 Monate n=5; 6 Monate n=4; 9 Monate n=2). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Als statistischer Test wurde der *Kruskal Wallis Test*, mit dem *Dunn's multiple comparisons test* als Posttest, angewendet (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Die gesunden Kontrollmäuse zeigen keine Läsionen und keine angefärbten Zellen. Bei den Mäusen in der akuten Krankheitsphase ist die Dichte S100A9-positiver Zellen im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant erhöht und liegt bei 936 ± 522 S100A9-positiven Zellen/mm² (***) $p < 0,001$). Die Mittelwerte der Mäuse mit einer Krankheitsdauer von ein bis neun Monaten sind nahe Null, ähnlich dem der Kontrollmäuse. Nur eine Maus mit einer sechsmonatigen Krankheitsdauer zeigt als Ausreißer eine erneute entzündliche Aktivität in einem Rückenmarksquerschnitt, wodurch der Mittelwert auf 210 ± 417 S100A9-positiven Zellen/mm² steigt. Es war ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Dichte S100A9-positiver Zellen zwischen den akut erkrankten Mäusen und den Mäusen mit einer einmonatigen Krankheitsdauer (* $p < 0,05$) und ebenfalls zwischen den akut erkrankten Mäusen und den Mäusen mit einer dreimonatigen Krankheitsdauer (* $p < 0,05$) festzustellen.

3.5 Die Makrophagenaktivität nimmt in chronischen EAE-Läsionen ab

Um die entzündliche und entmarkende Aktivität der Läsionen im zeitlichen Verlauf besser untersuchen zu können, nutzten wir zusätzlich zu dem Marker S100A9 die immunhistochemische Doppelfärbung MBP/Mac3. Wir teilten jede Maus aufgrund ihrer Makrophagen-Morphologie der Rückenmarksquerschnitte mittels eines vierstufigen Scores in Gruppen ein (Abbildung 11).

Diese in Gruppen eingeteilten Mäuse sind in der unten stehenden Tabelle eingetragen. In der Tabelle ist zu sehen, dass die Mäuse mit einer kürzeren Krankheitsdauer tendenziell einen höheren Score als die Mäuse mit einer längeren Krankheitsdauer haben. Da eine Maus mit einer sechsmonatigen Krankheitsdauer bereits als Ausreißer in der Doppelfärbung MBP/S100A9 festgestellt wurde, spiegelte sich dies auch in der Färbung MBP/Mac3 wider. Hierbei erreichte einer ihrer Rückenmarksquerschnitte den Score 3, während die restlichen Rückenmarksquerschnitte lediglich die Scores 0 und 1 erreichten. Daher wurde diese Maus in der Tabelle zusätzlich mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

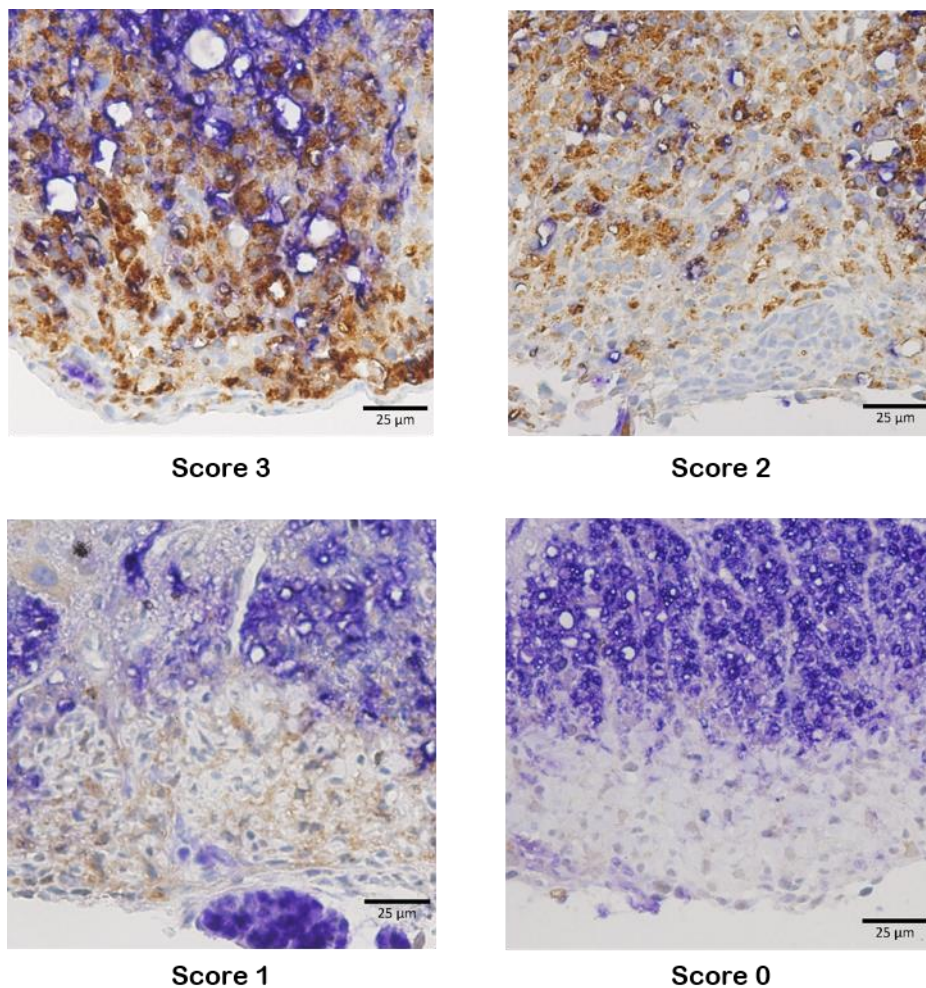


Abbildung 11: **Scores der Makrophagen-Morphologie:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Doppelfärbung MBP (blau gefärbt)/Mac3 (braun gefärbt) für die

Einteilung der Makrophagen-Morphologie in verschiedene Scores. Die Makrophagen stellen sich braun gefärbt dar. Score 3 zeigt Makrophagen mit MBP-Granula, hinweisend auf aktive Myelinphagozytose. Score 2 zeigt, dass die Zellen vergrößert sind, ohne Granula im Zytoplasma. Bei Score 1 sind die Ausläufer der Makrophagen zu sehen. Score 0 bedeutet, dass keine Makrophagen vorhanden sind. Der Messbalken entspricht jeweils 25 µm.

Tabelle 16: Verteilung der Mäuse auf die Scores der Makrophagen-Morphologie

	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
akut	0	0	0	8
1 Monat	2	6	6	0
3 Monate	3	2	0	0
6 Monate	2	1+(1)*	0	(1)*
9 Monate	2	0	0	0

3.6 Die Axondichte in den Läsionen nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer ab

Um zu analysieren, ob es mit längerer Krankheitsdauer zu einem axonalen Verlust in den spinalen Entmarkungsläsionen der Mäuse kommt, und um die Dichte der Axone bei gesunden Mäusen und innerhalb der Läsionen während der verschiedenen Krankheitsphasen zu beobachten, nutzten wir die Versilberung nach Bielschowsky (Abbildung 12).

Hierbei wurde bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe des Lichtmikroskops und eines standardisierten Zählgitters die Axonzahl pro mm² in der Läsion ermittelt (Abbildung 13).

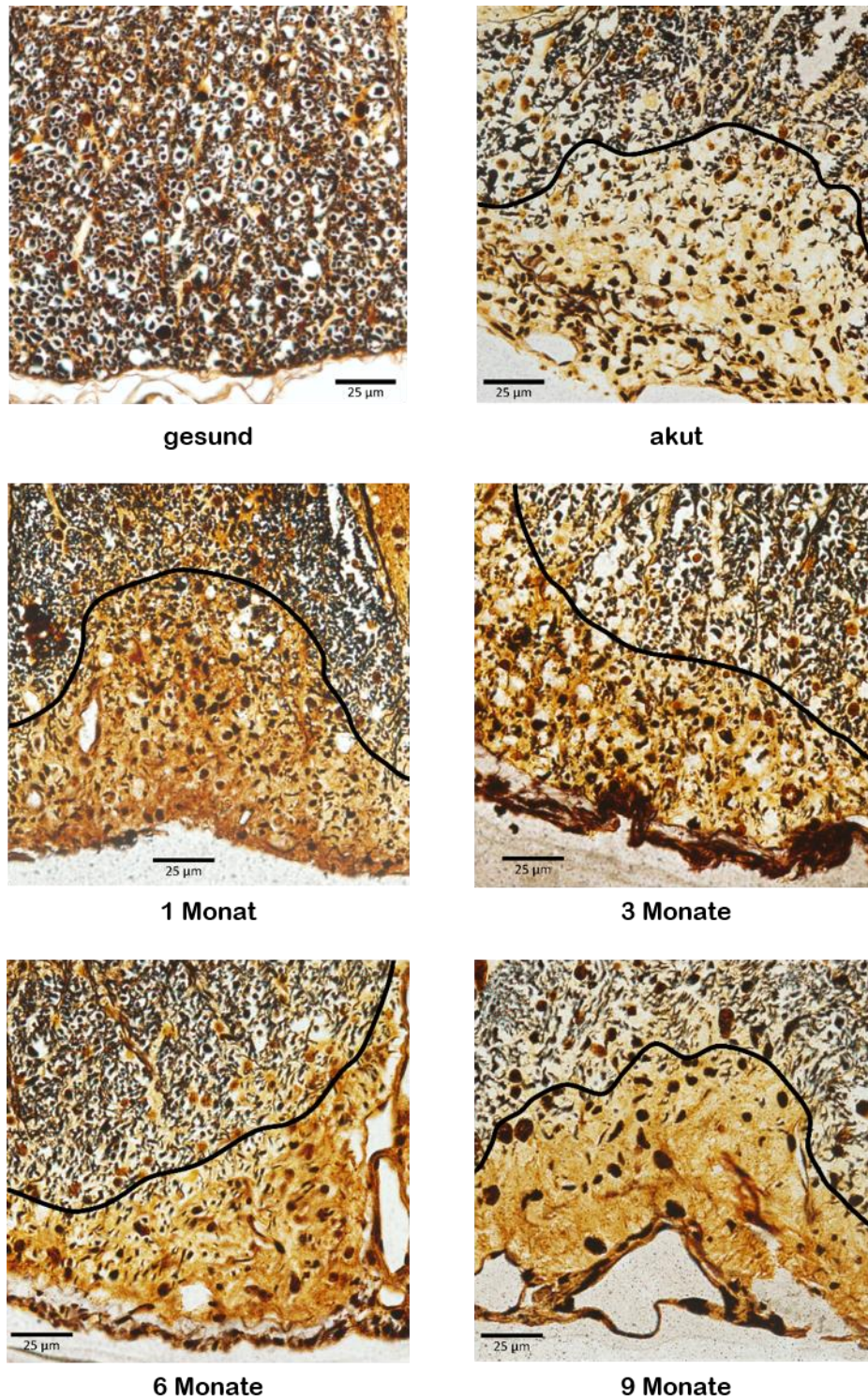


Abbildung 12: **Rückenmarksausschnitte mit Axonen:** Repräsentative Bilder der Versilberung nach Bielschowsky der gesunden Kontrolltiere sowie in der akuten Krankheitsphase (zwei bis sechs Tage) und den chronischen Krankheitsphasen (ein, drei, sechs und neun Monate). Die Axone stellen sich schwarz gefärbt dar. Die schwarz umrandeten Areale kennzeichnen die Läsionen innerhalb der weißen Substanz. Der Messbalken entspricht jeweils 25 µm.

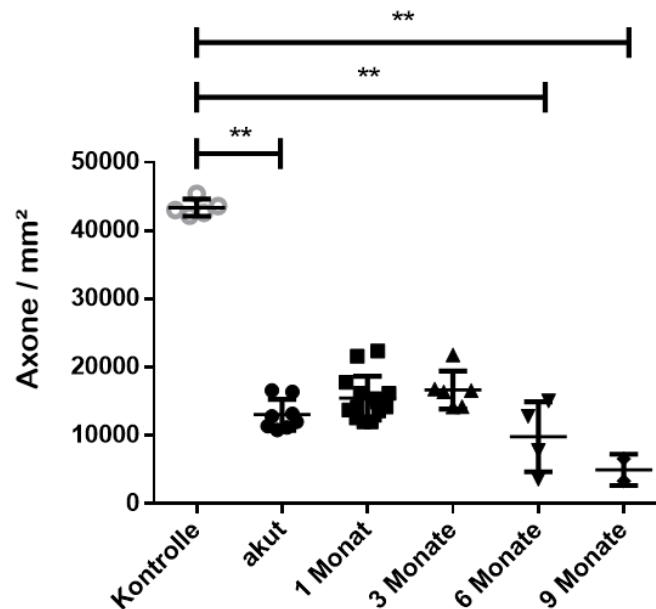


Abbildung 13: **Die Axondichte nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer ab:** Dichte der Axone in der weißen Substanz bei gesunden Kontrollmäusen und den entmarkten Läsionen der Mäuse in der akuten Krankheitsphase von zwei bis sechs Tagen und der Mäuse in den chronischen Krankheitsphasen von ein, drei, sechs und neun Monaten (Anzahl der Mäuse: Kontrolle n=5; akut n=8; 1 Monat n=14; 3 Monate n=5; 6 Monate n=4; 9 Monate n=2). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Als statistischer Test wurde der *Kruskal Wallis Test*, mit dem *Dunn's multiple comparisons test* als Posttest, angewendet (** $p < 0,01$).

Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren mit einem Mittelwert von 43360 ± 1252 Axonen/mm² ist die Dichte der Axone aller erkrankten Mäuse generell reduziert. Bei den akuten Mäusen besteht eine Reduktion auf 13050 ± 2275 Axone/mm², wobei hier ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den akut erkrankten Mäusen festzustellen war (** $p < 0,01$). Es sollte erwähnt werden, dass es in akuten Läsionen durch Influx von Wasser und Immunzellen zu einer Verdrängung von Axonen kommt. Die starke Reduktion der Axonzahl spiegelt auch diese Verdrängung wider und muss nicht unbedingt einen axonalen Verlust in diesem Ausmaß bedeuten.

Zwischen den Mäusen in der akuten Krankheitsphase und den Mäusen mit einer Krankheitsdauer von ein und drei Monaten ist die Dichte annähernd gleichbleibend. Bei den Mäusen mit einer Krankheitsdauer von sechs und neun Monaten ist im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine signifikante Reduktion bis 4980 ± 2291 Axone/mm² zu verzeichnen. Es war ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den Mäusen mit einer sechsmonatigen Krankheitsdauer (** $p < 0,01$) sowie zwischen den gesunden Kontrollmäusen und den Mäusen mit einer neunmonatigen Krankheitsdauer (** $p < 0,01$) festzustellen.

4 Diskussion

Mithilfe des Tiermodells der EAE lassen sich die Mechanismen der Autoimmunerkrankung MS und die damit einhergehende Schädigung des ZNS untersuchen (Gold et al. 2006).

In dieser Arbeit wurden akute und chronische Läsionen im zeitlichen Verlauf in einem spontanen Mausmodell der EAE charakterisiert. Hierfür wurden die Mäuse nach Ausbruch der Krankheit zu verschiedenen Zeitpunkten histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die Beurteilung des akuten Krankheitsstadiums erfolgte nach zwei bis sechs Tagen, und die des chronischen Krankheitsstadiums nach ein, drei, sechs und neun Monaten. Ein besonderer Schwerpunkt lag in dieser Arbeit auf der Untersuchung der Oligodendroglia im zeitlichen Verlauf und der Frage, ob chronische Läsionen remyelinisieren.

In den Rückenmarksquerschnitten der erkrankten Mäuse fanden sich in der weißen Substanz entmarkte Läsionen. Um eine Aussage über das Ausmaß einer Demyelinisierung oder gegebenenfalls Remyelinisierung zu treffen, bestimmte ich die Größe der Entmarkungsläsionen in der LFB-PAS-Färbung. Hierbei zeigte sich, dass die Läsionen im Laufe der Krankheitsdauer an Größe abnehmen. Da die myelinbildenden Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen für eine Remyelinisierung verantwortlich sind, wurde die Dichte dieser Zellen ermittelt. Hier wurde zur Beurteilung Olig2 als genereller Oligodendrozytenmarker und NogoA als spezifischer Marker für reife Oligodendrozyten genutzt. Dabei zeigte sich eine kontinuierliche Reduktion der Dichte beider Marker in den chronischen EAE-Läsionen mit zunehmender Krankheitsdauer.

Des Weiteren wurde die Dichte von Monozyten/Makrophagen sowie die Morphologie der Makrophagen/aktivierten Mikroglia in den Rückenmarksläsionen der Maus betrachtet. Dies diente der Untersuchung der Entzündungsaktivität der Läsionen und der Frage, ob eine erneute Infiltration von Entzündungszellen in chronischen Läsionen zur wiederholten Entmarkung führte. Meine Ergebnisse zeigten, dass nur im akuten Stadium eine erhöhte Dichte an Entzündungszellen mit einer phagozytierenden Morphologie festzustellen war.

Um die Frage zu klären, ob es im Laufe der Erkrankung zu einem Axonverlust kommt, wurde die Dichte der Axone ermittelt. Hierbei fand ich heraus, dass es zu einer fortschreitenden Reduktion der Axondichte in den chronischen Krankheitsphasen kam.

4.1 Das akute Krankheitsstadium geht mit hohem Demyelinisierungsausmaß und hoher Immunzellinfiltration einher

Betrachtet man die Läsionen in den akut erkrankten Mäusen, so waren die demyelinisierten Bereiche in der weißen Substanz des Rückenmarks gegenüber denen der chronischen Krankheitsstadien am großflächigsten. Es ließ sich außerdem erkennen, dass im akuten Stadium viele kürzlich infiltrierte Makrophagen vorhanden sind. Die phagozytierende

Morphologie der Makrophagen/aktivierten Mikroglia in den akuten EAE-Stadien deutet ebenfalls darauf hin, dass eine akute Entzündung im Gange ist und sie mit einer massiven Phagozytose des Myelins verbunden ist. Meine Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen bei MS-Patient*innen. So wurde auch in akut demyelinisierenden MS-Läsionen festgestellt, dass Makrophagen bzw. phagozytierende Mikrogliazellen in hoher Dichte auftreten und sie im Vergleich zu späteren Krankheitsstadien am höchsten ist (Adams und Poston 1990; Boyle und McGeer 1990; Brück et al. 1996). Weitere Studien zeigten, dass in frischen MS-Läsionen Axone demyelinisiert werden und die Makrophagenanzahl im Verhältnis zur Schädigung des Gewebes stand (Trapp 2004; Yamasaki et al. 2014). Kuhlmann et al. teilen aktiv demyelinisierende MS-Läsionen in früh- und spät aktive Läsionen ein. Diese Einteilung beruht auf der Art der phagozytierten Myelinproteine, wobei früh aktive Läsionen durch die Anwesenheit von CNP, MOG und MAG und spät aktive durch PLP und MBP in den Phagolysosomen gekennzeichnet sind (Kuhlmann et al. 2017).

Ich stellte außerdem in den akut entmarkten EAE-Läsionen einen Verlust von NogoA-positiven reifen Oligodendrozyten im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren fest. Daraus schließe ich, dass die aktive Inflammation und massive Phagozytose des Myelins durch Makrophagen mit Schädigung bzw. Verlust der reifen Oligodendrozyten einhergeht. In humanen MS-Autopsien früher MS-Läsionen konnte gezeigt werden, dass als Folge eines Oligodendrozytenverlustes die Makrophagen nicht-vitales Myelin abräumen (Prineas und Parratt 2012). Es besteht jedoch auch die gegenläufige These, dass die Veränderung der Oligodendrozyten-Morphologie in inflammatorischen Läsionen von außen nach innen verläuft, sprich die Myelinschädigung der Oligodendrozytenschädigung vorausgeht. Daraus wurde abgeleitet, dass die Oligodendrozyten mit ihren kürzeren und weniger Fortsätzen wahrscheinlich längere Zeit in diesem Zustand überleben können. Die Möglichkeit Myelinscheiden neu zu bilden, könnte dabei erhalten bleiben (Romanelli et al. 2016). Dass die überlebenden reifen Oligodendrozyten an der Remyelinisierung beteiligt sein könnten, konnte kürzlich auch in Tierversuchen bestätigt werden. Dabei gingen von dem gleichen Oligodendrozyten sowohl bisherige als auch neu gebildete Myelinscheiden aus. Man nimmt an, dass die Oligodendrozyten, neben der bisherigen Myelinscheiden, mit Hilfe ihrer Fortsätze wieder Kontakt zu demyelinisierten Axonen aufnehmen und diese remyelinisieren (Duncan et al. 2018).

Zusätzlich zu den reifen Oligodendrozyten untersuchte ich im Rahmen dieser Arbeit auch ihre Vorläuferzellen. Die Dichte an Olig2-positiven Oligodendrozyten war im akuten Krankheitsstadium sehr hoch, vergleichbar mit der Dichte in gesunden Kontrollmäusen. Im Vergleich zur sehr geringen Dichte der NogoA-positiven Oligodendrozyten sind damit verhältnismäßig mehr Vorläuferzellen als reife Oligodendrozyten vorhanden. So zeigte eine Studie an MS-Patient*innen, dass der Prozentsatz an Läsionen, die prämyelinisierende Oligodendrozyten enthielten, umgekehrt proportional zur Krankheitsdauer war. Das heißt, nach kurzer Krankheitsdauer enthielt die Läsion noch viele prämyelinisierende Oligodendrozyten (Chang et al. 2002). Dementsprechend war in unserem Versuch im akuten

Stadium entweder nur die Dichte reifer, und somit myelinbildender Oligodendrozyten als Folge der Immunreaktion gering und die Vorläuferzellen blieben weitgehend verschont, oder es gab bereits in der kurzen Krankheitsphase einen Signalweg, der die Vorläuferzellen dazu veranlasste zu proliferieren und in die Läsion einzuwandern, um nachfolgend zu myelinisierenden Oligodendrozyten zu differenzieren und letztlich die Schädigung der Axone einzudämmen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass im akuten Krankheitsstadium sowohl das Demyelinisierungsausmaß der Läsionen als auch die Inflammation und Phagozytoseaktivität der Makrophagen im Vergleich zu den chronischen Krankheitsstadien am höchsten war. Es konnte eine gewisse Dichte an Vorläuferzellen sowie an reifen Oligodendrozyten verzeichnet werden, wobei die der Vorläufer höher war. Somit könnten parallel zur Demyelinisierung bereits remyelinisierende Prozesse in akuten EAE-Läsionen stattfinden. Da außerdem ein entzündlicher Demyelinisierungsprozess bei MS remyelinisierungsfördernd ist, könnte es sein, dass das Läsionsausmaß der spontanen EAE ohne Remyelinisierung größer hätte ausfallen können (Franklin 2002). Dass akut demyelinisierte Läsionen ein hohes Potential zur Remyelinisierung haben, lässt sich auch in akuten, Toxin induzierten Entmarkungsmodellen beobachten. In einem Lysolecithin-induzierten Rattenmodell wurden die Auswirkungen einer Makrophagendepletion auf die Remyelinisierungsrate untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Makrophagen mit der Remyelinisierungseffizienz, gerade in frühen Stadien, korreliert. Nach dieser Hypothese, könnten entzündungshemmende Medikamente ggf. die Regeneration nach einer Entmarkung vermindern (Kotter et al. 2001). In einem weiteren Modell wurden Mäuse für kurze Zeit mit dem Oligodendrozytentoxin Cuprizin gefüttert. Sobald sie hiernach normale Nahrung erhielten, konnte eine Neubesiedlung mit reifen Oligodendrozyten in den Läsionen beobachtet werden und Axone wurden remyelinisiert (Mason et al. 2004). Des Weiteren geht man davon aus, dass auch bei MS bestimmte Zytokine förderlich für die Remyelinisierung sind. Mit Hilfe von Cuprizin-induzierten Mausmodellen konnte festgestellt werden, dass z. B. IL-1 β sowie TNF- α stimulierend auf die Remyelinisierung durch Oligodendrozyten wirken (Arnett et al. 2001; Mason et al. 2001).

Im Folgenden wird nun auf die chronischen Krankheitsstadien eingegangen.

4.2 Die chronischen Krankheitsstadien deuten trotz Reduktion der Läsionsgröße auf eine Inaktivität der Läsionen hin

In meinen Experimenten würde eine stetige demyelinisierende Aktivität eine Zunahme der Läsionsgröße im Laufe der EAE-Erkrankung bedeuten. Ich stellte jedoch in den chronischen Krankheitsstadien eine kontinuierliche Reduktion der Läsionsgröße fest, was auf eine Remyelinisierung hindeuten könnte.

Um eine mögliche Remyelinisierung nachzuweisen, untersuchte ich die Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen in den chronischen Krankheitsstadien. Grund dafür ist die Annahme, dass bei der Remyelinisierung die durch Oligodendrozyten stattfindende physiologische Myelinisierung wiederholt wird. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten: Oligodendrozytenvorläuferzellen proliferieren und wandern zu den demyelinisierten Axonen, wo sie sich zu reifen Oligodendrozyten differenzieren und die Axone myelinisieren (Stangel 2004). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass Vorläuferzellen im Gewebe vorliegen, in die Läsionen einwandern und sich dort differenzieren (Franklin und Gallo 2014). Meine Ergebnisse zeigten, dass es in den chronischen EAE-Stadien, verglichen mit dem akuten Stadium, zu einer Reduktion der Dichte der Olig2-positiven Oligodendrozyten kommt, was auf einen generellen Verlust von Oligodendrozyten hindeutet. Betrachtet man nun die NogoA-positiven Oligodendrozyten, wurde bei den Mäusen mit ein- und dreimonatiger Krankheitsdauer ein leichter Anstieg von reifen Oligodendrozyten festgestellt, der auf die Differenzierung von Vorläuferzellen oder die Rekrutierung von Oligodendrozyten hinweisen könnte. Ein Teil der Olig2-positiven Oligodendrozyten, die im akuten Stadium noch in hoher Zahl vorlagen, könnte sich differenziert haben und nun in der ein- und dreimonatigen Krankheitsphase NogoA exprimieren. Diese Zellen könnten im Zuge der Differenzierung auch Axone remyelinisiert haben. In den Mäusen mit einer Krankheitsdauer von sechs und neun Monaten war jedoch wieder eine deutlich geringere Dichte an reifen Oligodendrozyten zu verzeichnen, sodass die Dichte der NogoA-positiven Zellen ähnlich niedrig wie im akuten Stadium war. Ebenso war die Dichte der Olig2-positiven Oligodendrozyten in den späten chronischen EAE-Stadien sehr gering. Demnach sind in diesem Stadium sowohl sehr wenige reife Oligodendrozyten als auch eine geringe Anzahl wohl nicht mehr differenzierender Vorläuferzellen vorhanden. So gehen meine Ergebnisse konform mit MS-Studien, bei denen man in den Läsionen des chronischen Stadiums nur selten reife Oligodendrozyten fand, obwohl noch Vorläuferzellen vorhanden waren. Daraus wurde abgeleitet, dass im Laufe der Erkrankung die Fähigkeit der Vorläuferzellen zur Differenzierung abnimmt (Kuhlmann et al. 2008). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Vorläuferzellen in ihrem Differenzierungsprozess aufgrund gewisser Transkriptionsfaktoren stagnieren. Diese Transkriptionsfaktoren, z. B. Id2 oder Sox6, unterdrücken die Expression von Myelin-Genen und hemmen damit die Ausdifferenzierung zu myelinisierenden muren Oligodendrozyten. Diese Tatsache könnte die Remyelinisierung trotz noch vorhandener Oligodendrozyten limitieren (Emery 2010). Neben diesem Differenzierungsversagen geht man zudem davon aus, dass die Remyelinisierungsfähigkeit allgemein mit zunehmendem Alter des Individuums abnimmt (Hampton et al. 2012; Ruckh et al. 2012). So wurde z. B. in einem Rattenmodell, mit zunehmendem Alter der Tiere, eine beeinträchtigte Rekrutierung an Oligodendrozytenvorläuferzellen festgestellt, was zu einer altersbedingten Abnahme der Remyelinisierungseffizienz führte (Sim et al. 2002). Eine weitere Erklärung für den Mangel an Remyelinisierung, trotz einer gewissen Verfügbarkeit von Oligodendrozytenvorläufern in

chronischen MS-Läsionen, könnte in ihrer Erschöpfung aufgrund ständiger De- und Remyelinisierung liegen (Lassmann 1998). Hingegen wurde bei einem EAE-Rattenmodell gezeigt, dass auch nach wiederholten induzierten kortikalen Demyelinisierungsepisoden keine große Beeinträchtigung der Rekrutierung und Bildung der Oligodendroglia sowie der Remyelinisierungskapazität zu erkennen war (Rodriguez et al. 2014). Es gibt jedoch auch die Theorie, dass die fehlende Remyelinisierungskapazität von chronischen MS-Läsionen nicht auf das Fehlen von Oligodendrozytenvorläufern zurückzuführen ist, sondern auf das Milieu in der chronischen Läsion, das eine Remyelinisierung verhindert. Eine atypische molekulare Struktur chronisch entmarkter Axone oder eine Verschiebung des Gleichgewichts an Wachstumsfaktoren, die die Myelinisierung steuern, könnten beispielsweise damit in Verbindung stehen (Chang et al. 2002). Bei einem durch Cuprizin induzierten Demyelinisierungsmodell der Maus schien der Grund für eine fehlende Remyelinisierung eher in der Abnahme der Oligodendrozyten in den chronisch demyelinisierten Läsionen als in der Unmöglichkeit chronisch entmarkter Axone remyelinisiert zu werden, zu liegen. Nachdem die Mäuse zwölf Wochen lang mit Cuprizin behandelt wurden, stieg man auf normale Nahrung um und beobachtete keine Regeneration der Oligodendrozyten. Als man den Mäusen jedoch nach der Cuprizin Behandlung adulte Oligodendrozytenvorläufer in chronisch demyelinisierte Läsionen transplantierte, kam es nach der Umstellung auf normale Nahrung zu einer Regeneration reifer Oligodendrozyten und einer Remyelinisierung (Mason et al. 2004).

Ursächlich für eine fehlende Remyelinisierung und Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen könnten auch veränderte Entzündungsreaktionen sein. Die reduzierten Infiltrate mit Entzündungszellen in chronischen Läsionen der MS, im Gegensatz zu den aktiven Entzündungsreaktionen in frühen MS-Läsionen, deuten auf diese Möglichkeit hin (Kuhlmann et al. 2008). Bei MS geht man davon aus, dass die Remyelinisierungskapazität durch ein leicht entzündliches Milieu gefördert wird. Gleichzeitig könnte eine zu lang andauernde oder zu oft stattfindende Entzündungsaktivität die Oligodendrozyten soweit schädigen, dass es zu einer Erschöpfung des Vorläuferpools kommen könnte. Dies veranlasste mich zur Untersuchung der Immunzellinfiltration in den chronischen Entmarkungsläsionen. Meine Ergebnisse in den chronischen Tieren mit einer ein- bis neunmonatigen Krankheitsphase zeigten eine sehr geringe Anzahl von frisch eingewanderten S100A9-positiven Makrophagen und Monozyten verglichen mit dem akuten Krankheitsstadium. Auch die Mac3-positiven Makrophagen/Mikroglia zeigten eine Veränderung in der Morphologie im Laufe der Erkrankung. Diese zog sich von den akuten Läsionen, in denen noch myelinphagozytierende schaumzellige Makrophagen (Score 3) vorlagen, bis hin zum späten chronischen Stadium, in dem die Läsionen letztlich Mac3 komplett als Marker verloren (Score 0). Ebenso identifizierte man in aktiven MS-Läsionen viele Immunzellen, wie Makrophagen und aktivierte Mikroglia, mit phagozytiertem Myelin. Viele der zunächst aktiven Läsionen wurden schließlich inaktiv, zeigten keine Hinweise mehr auf eine aktive Phagozytose und die Dichte der Phagozyten nahm ab. Das lässt den Schluss

zu, dass die Dichte dieser Zellen einen Hinweis auf das Alter der Läsion gibt (Trapp 2004; Kuhlmann et al. 2017).

Grundsätzlich stellte ich myelinphagozytierende schaumzellige Makrophagen (Score 3) nur noch sehr selten und ausschließlich in vereinzelt Rückenmarksquerschnitten der Mäuse mit einer einmonatigen Krankheitsdauer fest. Da hierbei jedoch die Dichte an S100A9-positiven Zellen nahe Null war, ähnlich dem Kontrollwert, befindet sich die Immunzellreaktion dieser Läsionen vermutlich gerade im Rückgang und zeugt nicht von einem erneuten Infiltrat. Nur ein Rückenmarksquerschnitt einer Maus mit einer Krankheitsdauer von sechs Monaten zeigte in meinen Experimenten ein erneutes Infiltrat mit S100A9-positiven Zellen und eine myelinphagozytierende Morphologie der Makrophagen (Score 3). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass neue Läsionen sporadisch auftreten und in den Versuchen unterrepräsentiert sind, da die Untersuchung der Tiere nur eine Momentaufnahme darstellt. Dagegen spricht allerdings, dass die Rückenmarksquerschnitte einer jeden Maus keine sehr unterschiedlich aussehenden Läsionen aufwiesen und sich die Morphologie der Makrophagen nicht drastisch unterschied. Des Weiteren waren ab einem Krankheitsstadium von drei Monaten höchstens vereinzelt noch schaumzellige Makrophagen ohne sichtbare MBP-positive Granula (Score 2) zu erkennen, und mit der Dauer der Erkrankung wurde die Makrophagendichte und –aktivität immer geringer bis hin zum Score 0. Somit ist eine klare Tendenz zur Abnahme der Immunzellreaktion erkennbar. Man kann also in unserem Versuch von einem monophasischen Krankheitsverlauf der ganz überwiegenden Mehrzahl der Mäuse ausgehen.

Unter Vernachlässigung der Maus im sechsmonatigen Krankheitsstadium mit einem erneuten Infiltrat schlussfolgerte ich daher, dass es innerhalb der chronischen Krankheitsstadien keine andauernden oder wiederkehrenden Entzündungs- und Demyelinisierungsphasen gab. Demnach nahm die Oligodendrozytenanzahl vermutlich nicht als Folge einer Makrophagenaktivität kontinuierlich ab, sondern es nahmen wohl andere Mediatoren Einfluss auf den Oligodendrozytenverlust. Dieser beschriebene Krankheitsverlauf, ohne Remissionen oder Rückfälle, ist in der Regel typisch für die doppeltransgenen OSE-Mäuse (Krishnamoorthy et al. 2006).

Zusammenfassend beobachtete ich trotz Feststellung einer vermutlichen Inaktivität der Läsionen, einer geringen Dichte an Oligodendroglia und demnach einer fehlenden oder zumindest mangelnden Remyelinisierung eine deutliche Reduktion der Läsionsgröße im Verlauf der chronischen Krankheitsstadien. Dass jedoch Teile der Läsionen, insbesondere am Rand, oder kleine Läsionen remyelinisiert wurden, kann mit unseren Methoden nicht ausgeschlossen werden. Dazu bedarf es weiterer Untersuchungen, beispielsweise mit Hilfe der Elektronenmikroskopie.

4.3 Die Reduktion der Axondichte spricht für eine mögliche Atrophie der Läsionen

Um die Läsionen auf eine Atrophie hin zu untersuchen, betrachtete ich die Axondichte in der Bielschowsky-Versilberung im Verlauf der Krankheitsdauer. Es wird angenommen, dass ein axonaler Verlust eine wichtige Rolle für die Atrophie von MS-Läsionen spielt und die axonale Degeneration sich in nicht entzündlichen Läsionen fortsetzt (Trapp und Stys 2009). So wurde auch bei chronischen MS-Läsionen ein Zusammenhang zwischen der andauernden Axondegeneration und der Krankheitsdauer der Patient*innen festgestellt (Schirmer et al. 2011). Im Vergleich zu den Mäusen im akuten Krankheitsstadium, bei denen die Axondichte im Verhältnis zu den Kontrollmäusen stark reduziert war, konnte bei den Mäusen im ein- und dreimonatigen Krankheitsstadium ein leichter Anstieg der Axondichte verzeichnet werden. Zu beachten ist jedoch, dass akute Läsionen ödematös sind und es dadurch zu einer Verdrängung der Axone kommen kann. Die Axonreduktion muss daher nicht einen axonalen Verlust in dem beobachteten Ausmaß bedeuten. Wahrscheinlicher ist, dass der Axonverlust während des Krankheitsverlaufs kontinuierlich voranschreitet. Auch bei den NogoA-positiven Oligodendrozyten war bei den Mäusen im ein- und dreimonatigen Krankheitsstadium ein leichter Anstieg ihrer Dichte zu erkennen. Grundsätzlich sind Oligodendrozyten wichtig für den Erhalt der Axone. So besteht auch bei MS die These, dass axonaler Verlust durch eine Stoffwechsel unterstützende Einheit aus Oligodendrozyt, Myelin und Axon verhindert wird, da diese einen physischen und nutritiven Schutz des Axons bietet. Ist dies nicht gegeben, kann es letztlich zu einer kontinuierlichen axonalen Degeneration kommen, was dazu führt, dass die Axondichte in chronisch demyelinisierten Plaques niedriger ist als bei remyelinisierten Plaques (Trapp 2004; Stadelmann et al. 2019). Auf eine fehlende Remyelinisierung deutet bei unseren Mäusen ebenfalls der weitere Abfall der Axondichte im sechs- und neunmonatigen Krankheitsstadium hin, denn eine fehlende Remyelinisierung kann langfristig zu Axonschäden und dem Verlust von Axonen bis hin zur Atrophie der Läsion führen.

Interessant an dieser Stelle wäre zu erörtern, ob es neben der Relation von Axon zu Oligodendrozyt noch weitere Faktoren bei MS gibt, die mit einem Axonverlust in Verbindung gebracht werden könnten. Bislang ist wenig über die Mechanismen der axonalen Schädigung bekannt. Aus Untersuchungen schließt man, dass es bei chronisch demyelinisierten Axonen zu einer sogenannten chronisch virtuellen Hypoxie kommen kann. Diese entsteht dadurch, dass die erregbaren demyelinisierten Axone mehr Energie für die Impulsweiterleitung benötigen, jedoch eine reduzierte ATP-Produktion aufweisen. Dieser Zustand, bedingt durch u. a. einer mitochondrialen Dysfunktion oder Störungen im Ionenhaushalt, kann letztlich zur chronischen Nekrose der Axone führen (Trapp und Stys 2009). Bezüglich der Mitochondrien konnte außerdem gezeigt werden, dass sie zwar vermehrt zu demyelinisierten Axonen wandern, jedoch ihren Höhepunkt erst erreichen nachdem die Degeneration der Axone stattfand (Licht-Mayer et al. 2020). In Tierstudien

stellte sich zudem heraus, dass die demyelinisierungsassoziierte Axondegeneration sowohl altersabhängig als auch genetisch bedingt sein könnte. Hierzu verwendete man mit Cuprizin intoxicierte C57BL/6-Mäuse verschiedenen Alters und Schweizer Albinomäuse des ICI-Stammes. Zum einen war der Axonverlust bei den älteren Mäusen höher als bei den jungen. Zum anderen wurde in den Albinomäusen, die eine viel höhere Cuprizindosis verabreicht bekamen, retrospektiv eine niedrigere Inzidenz der Axondegeneration gegenüber der C57BL/6-Mäuse verzeichnet (Blakemore 1973a; Blakemore 1973b; Blakemore 1974; Irvine und Blakemore 2006).

Zusammenfassend kann ich anhand der mir zur Verfügung stehenden Methoden eine mögliche Remyelinisierung von Teilen der Läsionen oder kleiner Läsionen nicht ausschließen. Dennoch sprechen viele Punkte für eine Atrophie großer Teile der Läsionen. Einer der wichtigsten Punkte ist die Abnahme der Axondichte, welche als Anhaltspunkt für die Atrophie von Läsionen angesehen wird. Ein weiterer Punkt ist die Abnahme der Oligodendrozytendichte. Die Reduktion dieser Zellen kann dazu führen, dass Axone verloren gehen, weil sie nicht remyelinisiert werden. Als letztes ist auf die Inaktivität der Läsionen aufgrund der fehlenden Immunzellinfiltration und Phagozytoseaktivität der Makrophagen hinzuweisen.

Nachfolgend werden Aspekte meiner Ergebnisse des spontanen doppelt-transgenen Mausmodells Aspekten chronisch inaktiver MS-Läsionen gegenüber gestellt.

4.4 Chronische Läsionen im spontanen doppelt-transgenen EAE-Modell spiegeln Merkmale inaktiver MS-Läsionen wider

Die chronischen EAE-Läsionen in unserem spontanen doppelt-transgenen Mausmodell weisen viele Merkmale chronisch inaktiver demyelinisierter MS-Läsionen auf und bieten sich daher als experimentelles Hilfsmittel an.

Zu diesen Merkmalen zählt zum einen der Verlust von Oligodendrozyten. Meine Ergebnisse in der Olig2- und NogoA-Färbung zeigten eine starke Reduktion der Oligodendrozyten in späten Krankheitsphasen. Ein fast vollständiger Verlust von Oligodendrozyten wurde ebenfalls in inaktiven MS-Läsionen festgestellt (Hametner et al. 2013).

Ein weiteres Merkmal ist, dass keine aktive Demyelinisierung in den chronischen Läsionen festzustellen ist und die Mikroglia/Makrophagen keine aktivierte Morphologie zeigen. So war bei unseren Mäusen in den späteren chronischen Krankheitsstadien keine ablaufende Phagozytose mehr auszumachen, was auf eine Inaktivität der Läsionen hindeutet. Auch bei MS können Läsionen inaktiv und hypozellulär sein. Sie beinhalten nur wenige Makrophagen/Mikroglia (Kuhlmann et al. 2017).

Bezüglich der Verteilung der Makrophagen/Mikroglia innerhalb der MS-Läsionen besitzen sie in den sogenannten kombiniert aktiv/inaktiven Läsionen jedoch ein hypozelluläres, inaktives Zentrum mit einem schmalen Rand aus aktivierten Mikroglia und Makrophagen,

die im Zytoplasma MBP und PLP enthalten. Diese werden als sogenannte schwelende Läsionen bezeichnet, welche einer langsamen, anhaltenden Demyelinisierung unterliegen könnten. Es steht jedoch noch zur Debatte, ob diese Läsionen nicht doch eine neu aufflammende Entzündung darstellen oder sie von einer früheren Demyelinisierung herrühren (Frischer et al. 2009; Kuhlmann et al. 2017). Eine derartige Verteilung der Zellen im Rückenmarksquerschnitt der Maus innerhalb der verschiedenen Läsionsstadien konnte ich nicht feststellen.

Ein weiteres gemeinsames Merkmal zwischen den chronischen EAE- und inaktiven MS-Läsionen kann in der deutlichen Reduktion der Axone gesehen werden (Mews et al. 1998).

Für das spontane doppelt-transgene EAE-Modell ist in der Regel ein Krankheitsverlauf ohne Remissionen typisch (Krishnamoorthy et al. 2006). Dementsprechend lässt die Verwendung dieser Art von EAE-Mäusen nicht die Möglichkeit zu, Rückfälle zu studieren (Ransohoff 2012). Anders als bei diesem EAE-Modell macht jedoch bei MS der schubförmig-remittierende Krankheitsverlauf mit 90% den höchsten Prozentsatz aus, wovon allerdings 50% in den sekundär chronisch-progredienten Verlauf übergehen (Saguil et al. 2014).

Obwohl das spontane doppelt-transgene Mausmodell nicht die komplette Vielschichtigkeit der MS-Pathologie abdeckt, müssen für dieses Modell, vergleichbar mit der MS, die Mäuse ebenfalls nicht immunisiert oder T-Zell transferiert werden. Da noch nach einem möglichen Antikörper für MS gesucht wird und der Auslöser für MS noch nicht gefunden ist, kann dieses Modell auf experimenteller Ebene zur Erforschung der MS oder neuer therapeutischer Ansätze nützlich sein.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Schlussfolgernd zeigen meine Ergebnisse eine Abnahme des demyelinisierten Läsionsareals mit zunehmender Krankheitsdauer in einem spontanen Modell der EAE. Außerdem konnte ein oligodendroglialer und axonaler Verlust in chronischen EAE-Läsionen verzeichnet werden. Auch die Makrophageninfiltration war in den chronischen Krankheitsverläufen sehr gering, was auf eine Inaktivität der Läsionen hindeutet. Meine Ergebnisse sprechen demnach für eine begrenzte oder fehlende Remyelinisierung während der chronischen Krankheitsstadien. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Teile der Läsionen oder kleine Läsionen bereits früh remyelinisiert wurden, was zur Abnahme der Läsionsgröße zu den späten chronischen EAE-Zeitpunkten beigetragen hat. Um dies zu untersuchen, wären weitere Studien erforderlich. Beispielsweise sollte die Gesamtanzahl an Läsionen in akuten und späten Krankheitsstadien erfasst werden. So könnte festgestellt werden, ob die Gesamtzahl der Läsionen durch Remyelinisierung abnimmt. Des Weiteren könnten Messungen der Myelinscheidendicke mit Hilfe der Elektronenmikroskopie dazu dienen, neu gebildetes Myelin eindeutig zu identifizieren, da remyelinisierte Axone dünnere Myelinscheiden im Vergleich zu unbeschädigten Axonen besitzen (Kuhlmann et al. 2017). Um den Zeitpunkt der Remyelinisierung besser feststellen zu können, wären Marker wie

beispielsweise BCAS1, welcher myelinbildende Oligodendrozyten in MS-Läsionen sichtbar macht, für die Stadiendifferenzierung der Oligodendrozytenreifung von Nutzen (Fard et al. 2017).

Es ist derzeit noch nicht geklärt, was bei einer MS-Läsion ausschlaggebend dafür ist, ob eine vollständige oder partielle Remyelinisierung stattfindet, ob sie in eine inaktiv chronisch demyelinisierte Läsion übergeht oder ob die Demyelinisierungaktivität weiterhin in unterschiedlichem Maße voranschreitet (Stadelmann et al. 2019).

Abschließend kann man aus der vorliegenden Arbeit folgern, dass das spontane doppeltransgene Mausmodell der EAE viele Charakteristika mit der Autoimmunerkrankung MS gemeinsam hat. Es eignet sich deshalb dazu, sowohl akute als auch chronische Krankheitsstadien zu erforschen und Behandlungsmethoden, insbesondere in Hinblick auf axonale Protektion und Oligodendrozytenerhalt, zu testen.

5 Zusammenfassung

MS ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS unbekannter Ätiologie, die mit Entmarkungsläsionen einhergeht. Neben den chronisch entmarkten Läsionen gibt es im ZNS auch remyelinierte Areale. Diesen Remyelinisierungsprozess zu fördern, ist therapeutisch ein wichtiger Ansatz, um langfristige Schäden nach Schüben abzuschwächen bzw. ihnen entgegenzuwirken.

Mit Hilfe von Tiermodellen lassen sich bestimmte Mechanismen der MS erschließen. Auch für die Untersuchung der Remyelinisierung werden dabei größtenteils akute demyelinisierende Tiermodelle verwendet, in denen die Remyelinisierung häufig sehr effizient ist. Es gibt jedoch einen Mangel an chronischen Modellen, welche wichtig sind, um chronische MS-Läsionen besser zu verstehen oder remyelinisierungsfördernde bzw. axonprotektive Therapien zu testen.

Um solch ein chronisches Modell zu entwickeln, verwendeten wir ein spontanes doppeltransgenes Mausmodell der EAE. Es beruht auf der Kreuzung einzeltransgener Mäuse mit MOG spezifischen T-Zellen und MOG-Antikörpern. Die Mäuse, welche zu etwa 50% im Alter von vier bis acht Wochen eine spontane EAE entwickelten, wurden nach Ausbruch der Krankheit zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Untersuchung nach zwei bis sechs Tagen diente der Beurteilung des akuten Krankheitsstadiums und die Untersuchung nach ein, drei, sechs und neun Monaten der des chronischen Krankheitsstadiums. Mit Hilfe histologischer und immunhistochemischer Färbungen untersuchte ich anschließend die Entmarkungsläsionen innerhalb der weißen Substanz des Rückenmarks.

In dieser Arbeit wurde die Läsionsentwicklung akuter und chronischer EAE-Läsionen analysiert. Hierzu ermittelte ich mit Hilfe der LFB-PAS-Färbung die Größe der entmarkten Läsionen. Es zeigte sich, dass die entmarkten Areale im akuten Stadium am großflächigsten waren und es mit zunehmender Krankheitsdauer zu einer kontinuierlichen Reduktion des Läsionsausmaßes kam. Um die Dichte der reifen Oligodendrozyten und ihrer Vorläuferzellen in den Läsionen zu bestimmen, verwendete ich die Marker NogoA und Olig2. Bei Betrachtung des akuten Stadiums stellte ich einen Verlust von reifen NogoA-positiven Oligodendrozyten fest. Die späten chronischen Stadien waren durch eine sehr geringe Dichte der Oligodendrozyten sowie deren Vorläuferzellen charakterisiert, was darauf hindeuten könnte, dass chronische EAE-Läsionen nicht mehr remyelinisieren. Des Weiteren untersuchte ich die entzündliche Aktivität der Läsionen, um Hinweise auf eine mögliche wiederholte Entmarkung in chronischen Läsionen zu finden. Im akuten Stadium beobachtete ich eine hohe Dichte an frisch eingewanderten S100A9-positiven Makrophagen/Monozyten und schaumzelligen Mac3-positiven Makrophagen/aktivierten Mikroglia mit phagozytiertem MBP. Die späten chronischen Läsionen zeigten jedoch kaum S100A9-positive Zellen und phagozytierende Makrophagen/aktivierte Mikroglia. Um einen möglichen axonalen Verlust zu detektieren, ermittelte ich außerdem die axonale Dichte mit Hilfe der Bielschowsky-Versilberung. Im akuten Stadium war die Axondichte im Vergleich

zur Kontrolle erniedrigt. Weiterhin kam es im Krankheitsverlauf zur weiteren Abnahme der Axondichte innerhalb der Läsionen. Auch inaktive MS-Läsionen sind durch eine Hypozellularität, wie die der Oligodendroglia und der Makrophagen/Mikroglia, sowie eine Reduktion der Axondichte gekennzeichnet.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass vieles für eine Atrophie großer Teile der chronischen EAE-Läsionen spricht. Jedoch kann ich eine Remyelinisierung kleiner Läsionen oder Teile der Läsionen, insbesondere am Läsionsrand, mit den hier verwendeten Methoden nicht sicher ausschließen. Weitere Studien sind erforderlich, um den Umfang einer möglichen Remyelinisierung im Verlauf der EAE abschließend zu klären. Insgesamt bietet sich das spontane doppelt-transgene Mausmodell der EAE als experimentelles Hilfsmittel an, um die Entwicklung von aktiven Läsionen hin zu chronischen Läsionen zu untersuchen und in diesem Zusammenhang mögliche remyelinisierungsfördernde bzw. axonprotektive Substanzen zu testen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams CWM, Poston RN (1990): Macrophage histology in paraffin-embedded multiple sclerosis plaques is demonstrated by the monoclonal pan-macrophage marker HAM-56: correlation with chronicity of the lesion. *Acta Neuropathol* 80, 208–211
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JPY (2001): TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4, 1116–1122
- Ascherio A, Munger KL, Lünemann JD (2012): The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 8, 602–612
- Baker D, Amor S (2014): Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. *Mult Scler Relat Disord* 3, 555–564
- Balasubramaniyan V, Timmer N, Kust B, Boddeke E, Copray S (2004): Transient expression of Olig1 initiates the differentiation of neural stem cells into oligodendrocyte progenitor cells. *Stem Cells* 22, 878–882
- Barres BA, Raff MC (1993): Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 361, 258–260
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001): Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871–927
- Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK (2003): Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197, 1073–1081
- Bettelli E, Baeten D, Jäger A, Sobel RA, Kuchroo VK (2006): Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest* 116, 2393–2402
- Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG (2014): Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp* 86, 1–5
- Blakemore WF (1973a): Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. *J Neurol Sci* 20, 63–72
- Blakemore WF (1973b): Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci* 20, 73–83
- Blakemore WF (1974): Remyelination of the superior cerebellar peduncle in old mice following demyelination induced by cuprizone. *J Neurol Sci* 22, 121–126
- Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ (2014): Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 128, 191–213
- Boiko A, Vorobeychik G, Paty D, Devonshire V, Sadovnick D, the UBC MS Clinic Neurologists (2002): Early onset multiple sclerosis: A longitudinal study. *Neurology* 59, 1006–1010
- Boyle EA, McGeer PL (1990): Cellular immune response in multiple sclerosis plaques. *Am J Pathol* 137, 575–584

- Brück W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA, Lassmann H (1996): Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology* 195, 588–600
- Brück W, Bitsch A, Kolenda H, Brück Y, Stiefel M, Lassmann H (1997): Inflammatory central nervous system demyelination: Correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann Neurol* 42, 783–793
- Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003): Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206, 181–185
- Cepok S (2001): Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 124, 2169–2176
- Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002): Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346, 165–173
- Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, Cui L (2018): The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 318, 1–7
- Clements CS, Reid HH, Beddoe T, Tynan FE, Perugini MA, Johns TG, Bernard CC, Rossjohn J (2003): The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11059–11064
- Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G (2010): Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362, 402–415
- Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, Hartung HP, Seeltrayers P, Sørensen PS, Rovaris M (2001): Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 357, 1576–82
- de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, A't Hart B (2002): Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169, 5415–5423
- Dodd DA, Niederoest B, Bloechlinger S, Dupuis L, Loeffler JP, Schwab ME (2005): Nogo-A,-B, and-C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *J Biol Chem* 280, 12494–12502
- Duncan ID, Radcliff AB, Heidari M, Kidd G, August BK, Wierenga LA (2018): The adult oligodendrocyte can participate in remyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 1807–1816
- Emery B (2010): Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330, 779–782
- Fard MK, van der Meer F, Sánchez P, Cantuti-Castelvetri L, Mandad S, Jäkel S, Fornasiero EF, Schmitt S, Ehrlich M, Starost L (2017): BCAS1 expression defines a population of early myelinating oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Sci Transl Med* 9, 1–12
- Feinstein A (2002): An examination of suicidal intent in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 59, 674–678
- Franklin RJ (2002): Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3, 705–714
- Franklin RJ, Gallo V (2014): The translational biology of remyelination: Past, present, and future. *Glia* 62, 1905–1915

- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132, 1175–1189
- Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, Nave KA, Simons M (2014): Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI (3, 4, 5) P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 156, 277–290
- Gold R, Rieckmann P (Hrsg.): Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose. 3. Auflage; UNI-MED Verlag, Bremen 2004
- Gold R, Linington C, Lassmann H (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953–1971
- Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI (2012): Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 367, 1098–1107
- Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H (2011): Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 134, 1914–24
- Hametner S, Wimmer I, Haider L (2013): Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Ann Neurol* 74, 848–861
- Hampton DW, Innes N, Merkler D, Zhao C, Franklin RJ, Chandran S (2012): Focal immune-mediated white matter demyelination reveals an age-associated increase in axonal vulnerability and decreased remyelination efficiency. *Am J Pathol* 180, 1897–1905
- Hein T, Hopfenmüller W (2000): Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71, 288–294
- Hemmer B, Kieseier B, Cepok S, Hartung HP (2003): New immunopathologic insights into multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3, 246–255
- Henze T (2004): Symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose. *psychoneuro* 30, 393–400
- Herrera BM, Ebers GC (2003): Progress in deciphering the genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 16, 253–258
- Ho MK, Springer TA (1983): Tissue distribution, structural characterization, and biosynthesis of Mac-3, a macrophage surface glycoprotein exhibiting molecular weight heterogeneity. *J Biol Chem* 258, 636–642
- Holness CL, Simmons DL (1993): Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81, 1607–1613
- Huber AB, Schwab ME (2000): Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem* 381, 407–419
- Irvine KA, Blakemore WF (2006): Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 175, 69–76
- John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF (2002): Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat Med* 8, 1115–1121

- Kamm CP, Mattle H (2014): Neurologie: Neue Medikamente zur Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose. *Swiss Med Forum* **14**, 981–982
- Kantarci O, Wingerchuk D (2006): Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* **19**, 248–254
- Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL, Zheng B, Ho PP, Jordan KA, Murray BM, Barres B, Tessier-Lavigne M, Bernard CC (2004): The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Neurosci* **7**, 736–744
- Kesselring J: Multiple Sklerose. In: Brandt T, Cohen R, Helmchen H, Schmidt LR (Hrsg.): *Psychiatrie, Neurologie, Klinische Psychologie*. 4. Auflage, W. Kohlhammer Verlag, Stuttgart 2005, 106–130
- Kieseier BC, Hartung HP (2003): Multiple paradigm shifts in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* **16**, 247–252
- Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Van Rooijen N, Franklin RJ (2001): Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia* **35**, 204–212
- Krishnamoorthy G, Lassmann H, Wekerle H, Holz A (2006): Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Investig* **116**, 2385–2392
- Kuhlmann T, Miron V, Cuo Q, Wegner C, Antel J, Brück W (2008): Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* **131**, 1749–1758
- Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H (2017): An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol* **133**, 13–24
- Kurtzke JF (1980): Epidemiologic contributions to multiple sclerosis. An overview. *Neurology* **30**, 61–79
- Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* **33**, 1444–52
- Kurtzke JF (2000): Multiple sclerosis in time and space-geographic clues to cause. *J Neurovirol* **6**, 134–140
- Lassmann H (1998): Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* **4**, 93–98
- Leitlinien 31 2012 Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose.
<https://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose#diagnostik>; Zugriff am 15.02.2019
- Levine S, Sowinski R (1973): Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *J Immunol* **110**, 139–143
- Licht-Mayer S, Campbell GR, Canizares M, Mehta AR, Gane AB, McGill K, Ghosh A, Fullerton A, Menezes N, Dean J (2020): Enhanced axonal response of mitochondria to demyelination offers neuroprotection: implications for multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* **140**, 143–167
- Lindner M, Heine S, Haastert K, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Grothe C, Baumgärtner W, Stangel M (2008): Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol* **34**, 105–114

- Litzenburger T, Fässler R, Bauer J, Lassmann H, Lington C, Wekerle H, Iglesias A (1998): B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* **188**, 169–180
- Liu H, Ng CE, Tang BL (2002): Nogo-A expression in mouse central nervous system neurons. *Neurosci Lett* **328**, 257–260
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH (2000): Sonic hedgehog–regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**, 317–329
- Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* **46**, 907–911
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F (2014): Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* **83**, 278–286
- Lucchinetti C, Brueck W, Rodriguez M, Lassmann H (1998): Multiple sclerosis: Lessons from neuropathology. *Semin Neurol* **18**, 337–349
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK (2001): Interleukin-1 promotes repair of the CNS. *J Neurosci* **21**, 7046–7052
- Mason JL, Toews A, Hostettler JD, Morell P, Suzuki K, Goldman JE, Matsushima GK (2004): Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *Am J Pathol* **164**, 1673–1682
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* **50**, 121–127
- Mehta PD (1991): Diagnostic usefulness of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* **28**, 233–251
- Mei F, Wang H, Liu S, Niu J, Wang L, He Y, Etxeberria A, Chan JR, Xiao L (2013): Stage-specific deletion of *Olig2* conveys opposing functions on differentiation and maturation of oligodendrocytes. *J Neurosci* **33**, 8454–8462
- Mews I, Bergmann M, Bunkowski S, Gullotta F (1998): Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions. *Mult Scler* **4**, 55–62
- Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J (2017): P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* **65**, 375–387
- Mitew S, Hay CM, Peckham H, Xiao J, Koenning M, Emery B (2014): Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience* **276**, 29–47
- Morandi E, Tarlinton RE, Gran B (2015): Multiple sclerosis between genetics and infections: Human endogenous retroviruses in monocytes and macrophages. *Front Immunol* **6**, 641–647
- Nave KA (2010a): Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* **468**, 244–252

- Nave KA (2010b): Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 11, 275–283
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000): Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938–952
- O’connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benzerdjeb H, Truffinet P, Wang L, Miller A (2011): Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365, 1293–1303
- OCREVUS (Ocrelizumab) von Roche erhält Zulassung in der Europäischen Union für schubförmige Multiple Sklerose und primär progrediente Multiple Sklerose. <https://www.roche.com/de/media/releases/med-cor-2018-01-12.htm>; Zugriff am 29.08.2018
- Orrell RW (2005): Multiple sclerosis: The history of a disease. *J R Soc Med* 98, 287–291
- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006): Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165–3172
- Pedraza L, Fidler L, Staugaitis SM, Colman DR (1997): The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination. *Neuron* 18, 579–589
- Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R (1993): The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3, 191–197
- Phadke JG (1987): Survival pattern and cause of death in patients with multiple sclerosis: results from an epidemiological survey in north east Scotland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50, 523–531
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O’Connor PW (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald criteria”. *Ann Neurol* 58, 840–846
- Polman CH, O’Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A (2006): A randomized, placebo-controlled trial of Natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899–910
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292–302
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13, 227–231
- Prineas JW, Parratt JD (2012): Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* 72, 18–31
- Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G (2015): Animal models of multiple sclerosis. *Eur J Pharmacol* 759, 182–191
- Ransohoff RM (2012): Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci* 15, 1074–1077
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933): Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58, 39–53

- Rodriguez EG, Wegner C, Kreutzfeldt M, Neid K, Thal DR, Jürgens T, Brück W, Stadelmann C, Merkler D (2014): Oligodendroglia in cortical multiple sclerosis lesions decrease with disease progression, but regenerate after repeated experimental demyelination. *Acta Neuropathol* 128, 231–246
- Romanelli E, Merkler D, Mezydło A, Weil MT, Weber MS, Nikić I, Potz S, Meinel E, Matznick FEH, Kreutzfeldt M, et al. (2016): Myelinosome formation represents an early stage of oligodendrocyte damage in multiple sclerosis and its animal model. *Nat Commun* 7, 1–10
- Ruckh JM, Zhao JW, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Rao TN, Wagers AJ, Franklin RJ (2012): Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. *Cell Stem Cell* 10, 96–103
- Ruggieri M, Avolio C, Livrea P, Trojano M (2007): Glatiramer acetate in multiple sclerosis: A review. *CNS Neurosci Ther* 13, 178–191
- Saab AS, Tzvetanova ID, Nave KA (2013): The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr Opin Neurobiol* 23, 1065–1072
- Saguil A, Kane S, Farnell E (2014): Multiple sclerosis: A primary care perspective. *Mult Scler* 20, 644–652
- Satoh JI, Onoue H, Arima K, Yamamura T (2005): Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 129–138
- Satoh JI, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y (2016): TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology* 36, 39–49
- Schirmer L, Antel JP, Brück W, Stadelmann C (2011): Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 21, 428–440
- Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, Nagler B, Sibley WA, Tourtellotte WW, Willmon TL (1965): Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122, 552–568
- Sim FJ, Zhao C, Penderis J, 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* 22, 2451–2459
- Smith KJ, Kapoor R, Felts PA (1999): Demyelination: The role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol* 9, 69–92
- Stadelmann C, Brück W (2008): Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis. *J Neurol* 255, 12–18
- Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M (2019): Myelin in the central nervous system: structure, function, and pathology. *Physiol Rev* 99, 1381–1431
- Stangel M (2004): Remyelinating and neuroprotective treatments in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 13, 331–347
- Steinman L (2005): Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 4, 510–518

- Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallström E, Kerschensteiner M, Olsson T, Lington C, Lassmann H (1998): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* **8**, 681–694
- Stromnes IM, Goverman JM (2006): Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* **1**, 1810–1819
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* **17**, 162–173
- Tomassy GS, Dershowitz LB, Arlotta P (2016): Diversity matters: a revised guide to myelination. *Trends Cell Biol* **26**, 135–147
- Trapp BD (2004): Mechanisms of axonal loss and neuronal dysfunction in MS. *Adv Stud Med* **4**, 312–315
- Trapp BD, Stys PK (2009): Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **8**, 280–291
- van der Star BJ, Vogel DY, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S (2012): In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **11**, 570–588
- Vosoughi R, Freedman MS (2010): Therapy of MS. *Clin Neurol Neurosurg* **112**, 365–385
- Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695–705
- Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Coteleur AC (2014): Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* **211**, 1533–1549
- Yui S, Nakatani Y, Mikami M (2003): Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull* **26**, 753–760
- Zamvil SS, Steinman L (2003): Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* **38**, 685–688
- Zhou Q, Wang S, Anderson DJ (2000): Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix–loop–helix transcription factors. *Neuron* **25**, 331–343

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützend zur Seite standen, bedanken. Ein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler und Herrn Dr. med. Stefan Nessler für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit. Ebenso ein Dank an Frau Prof. Dr. med. Francesca Odoardi. An Frau Dr. rer. nat. Anne Winkler geht ein ganz besonderer Dank für die fortwährende tatkräftige Unterstützung und die freundliche Zusammenarbeit in stets harmonischer Atmosphäre. Nicht zu vergessen sei die Unterstützung der medizinisch-technischen Assistentinnen, insbesondere an Frau Katja Schulz einen herzlichen Dank für die Einführung in die immunhistochemischen Färbemethoden. Auch allen nicht genannten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Neuropathologie danke ich für das angenehme Arbeitsklima.