

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

Mikroglia-/Makrophagenphänotypen bei humanen Entmarkungserkrankungen (MS, NMO und PML)

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Cora Alexandra Nau-Gietz

aus Kassel

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer*in: Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. F. Odoardi

Prüfungskommission

Referent*in: Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler

Ko-Referent*in: Prof. Dr. F. Odoardi

Drittreferent*in: Prof. Dr. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 20.12.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Mikroglia-/Makrophagenphänotypen bei humanen Entmarkungserkrankungen (MS, NMO und PML)" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Demyelinisierende Erkrankungen	1
1.1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.2 Neuromyelitis optica	7
1.1.3 Progressive multifokale Leukenzephalopathie	10
1.2 Zusammenfassung „Demyelinisierende ZNS-Erkrankungen“	13
1.3 Mikroglia und Makrophagen	13
1.4 Mikroglia- und Makrophagen-Aktivierungsmuster bei der Multiplen Sklerose	16
1.5 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Untersuchtes Gewebe	19
2.2 Immunhistochemische Färbungen	25
2.2.1 Grundlagen	25
2.2.2 Verwendete Mikroglia- und Makrophagenmarker	26
2.2.3 Verwendete Materialien	27
2.2.4 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen	30
2.3 Klassifikation der Läsionen	33
2.3.1 MS-Läsionen	34
2.3.2 NMO-Läsionen	36
2.4 Histologische Auswertung	37
2.5 Statistische Auswertung	39
2.6 Ethik	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Altersabhängige Expression von Makrophagen- und Mikroglia-markern	40
3.2 Expression von Mikroglia- und Makrophagen-markern innerhalb der entzündlich-entmarkenden Läsionen von Entmarkungserkrankungen	42
3.2.1 KiM1P-positive Zellen in entzündlich-entmarkenden Läsionen	42
3.2.2 P2Y12-positive Zellen in entzündlich-entmarkenden Läsionen	43
3.2.3 TMEM119-positive Mikroglia in entzündlich-entmarkenden Läsionen	45
3.2.4 CCR2-positive inflammatorische Monozyten in entzündlich-entmarkenden Läsionen	46

3.3	Mikroglia und Makrophagen in der peri-Plaque weißen Substanz bei entzündlich entmarkender ZNS-Erkrankungen.....	48
3.3.1	KiM1P in der PPWM	48
3.3.2	P2Y12-positive Mikrogliazellen in der PPWM.....	49
3.3.3	TMEM119-positive Mikrogliazellen in der PPWM.....	51
3.3.4	CCR2 in der PPWM	52
3.4	Makrophagen- und Mikroglia-Phänotypen in der normal erscheinenden weißen Substanz	54
3.4.1	KiM1P in der NAWM.....	54
3.4.2	P2Y12-positive homöostatische Mikrogliazellen in der NAWM	55
3.4.3	TMEM119-positive Mikrogliazellen in der NAWM	57
3.4.4	CCR2-positive inflammatorische Monozyten in der NAWM	58
4	Diskussion.....	60
4.1	Expression von Mikroglia- und Makrophagen-markern in MS, NMO, PML und Kontrollen	60
4.1.1	Läsionen und peri-Plaque weiße Substanz.....	60
4.1.2	Normal erscheinende weiße Substanz	66
4.1.3	Ähneln das Aktivierungsmuster von Mikroglia- und Makrophagen bei der MS eher einer Virus- oder einer Autoimmunerkrankung?.....	69
4.2	Limitationen, Ausblick und offene Fragen	70
5	Zusammenfassung.....	74
6	Anhang	76
7	Literaturverzeichnis	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schema der Avidin-Biotin-Complex-Technik (Mulisch 2015 modifiziert nach Abb. 19.8).....	25
Abbildung 2	Läsionstypen bei der multiplen Sklerose.	35
Abbildung 3	Bestimmung der Läsionsareale am Beispiel einer chronisch-inaktiven MS-Läsion.	38
Abbildung 4	Expression von Mikroglia- und Makrophagen-Markern im Verlauf des Lebens in der weißen Substanz in ZNS-gesunden PatientInnen.	40
Abbildung 5	KiM1P-positive Zellen in entzündlich-entmarkenden Läsionen.	42
Abbildung 6	Dichte KiM1P-positiver Phagozyten in entzündlich-entmarkenden Läsionen.	43
Abbildung 7	P2Y12-positive Mikroglia in entzündlich-entmarkenden Läsionen.	44
Abbildung 8	Dichte P2Y12-positiver Mikrogliazellen in Läsionen entzündlicher ZNS-Erkrankungen.	44
Abbildung 9	TMEM119-positive Mikroglia in entzündlich-entmarkenden Läsionen.	45
Abbildung 10	Dichte TMEM119-positiver Mikrogliazellen in Läsionen entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen.	46
Abbildung 11	CCR2-positive inflammatorische Monozyten in entzündlich-entmarkenden Läsionen.	47
Abbildung 12	Dichte CCR2-positiver inflammatorischer Monozyten in Läsionen entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen.	47
Abbildung 13	KiM1P-positive Zellen in der peri-Plaque weißen Substanz.....	48
Abbildung 14	Dichte KiM1P-positiver Zellen in der peri-Plaque weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen.	49
Abbildung 15	P2Y12-positive Zellen in der peri-Plaque weißen Substanz.	50
Abbildung 16	Dichte P2Y12-positiver Mikrogliazellen in der peri-Plaque weißen Substanz entzündlicher ZNS-Erkrankungen.	50
Abbildung 17	TMEM119-positive Zellen in der peri-Plaque weißen Substanz.....	51
Abbildung 18	Dichte TMEM119-positiver Mikrogliazellen in der peri-Plaque weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen.	52
Abbildung 19	CCR2-positive inflammatorische Monozyten in der peri-Plaque weißen Substanz.	53
Abbildung 20	Dichte CCR2-positiver inflammatorischer Monozyten in der peri-Plaque weißen Substanz entzündlich-entmarkenden ZNS-Erkrankungen.	53
Abbildung 21	KiM1P-positive Mikroglia und Makrophagen in der normal erscheinenden weißen Substanz.	54
Abbildung 22	Dichte KiM1P-positiver Makrophagen/aktivierter Mikroglia in der normal erscheinenden weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen.	55
Abbildung 23	P2Y12-positive Mikroglia und Makrophagen in der normal erscheinenden weißen Substanz.	56

Abbildung 24	Dichte P2Y12-positiver homöostatischer Mikrogliazellen in der normal erscheinenden weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen.	56
Abbildung 25	TMEM119-positiv Mikrogliosa in der normal erscheinenden weißen Substanz.	57
Abbildung 26	Dichte TMEM119-positiv Mikrogliosa in der normal erscheinenden weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen.	58
Abbildung 27	CCR2-positiv inflammatorische Monozyten in der normal erscheinenden weißen Substanz.	59
Abbildung 28	Dichte CCR2-positiv inflammatorischer Monozyten in der normal erscheinenden weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen.	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Demyelinisierende ZNS-Erkrankungen im Überblick	13
Tabelle 2	Klinische Daten PatientInnen mit Multipler Sklerose	20
Tabelle 3	Klinische Daten PatientInnen mit Neuromyelitis optica	21
Tabelle 4	Klinische Daten PatientInnen mit progressiver multifokaler Leukenzephalopathie	22
Tabelle 5	Klinische Daten Alterskohorte KontrollpatientInnen ohne Hinweis auf entzündliche ZNS-Erkrankungen (grau hinterlegt)	23
Tabelle 6	Primärantikörper für die Immunhistochemie	27
Tabelle 7	Sekundärantikörper/ Systeme für die Immunhistochemie	28
Tabelle 8	Lösungen und Puffer für Immunhistochemie	28
Tabelle 9	Reagenzien und Enzyme	29
Tabelle 10	Verwendete Programme und Geräte	30
Tabelle 11	McDonald Kriterien 2017 nach Thompson et al. 2018	76
Tabelle 12	Therapie der Multiplen Sklerose nach Gold et. al 2014.....	77
Tabelle 13	Histologische Charakterisierung von aktiven, kombiniert aktiven/inaktiven und inaktiven MS Läsionen modifiziert nach Kuhlmann et al. 2017	78

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
AQP4	Aquaporin 4
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCR2	CC-Chemokine Rezeptor Typ 2
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CI	Konfidenzintervall
CMV	Cytomegalie-Virus
CNPase	<i>2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-ohosphodiesterase</i>
CNP	Cyclische Nukleotid Phosphodiesterase
DAB	3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EBV	Epstein Barr Virus
GFAP	Saures Gliafaserprotein
HCl	Salzsäure
HERV	Humane endogene Retroviren
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Iba 1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule-1</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
JC-Virus	John Cunningham Virus
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
LB	<i>Lesion border/ Läsionsrand</i>
LC	<i>Lesion center/ Läsionsmitte</i>
LETM	<i>Longitudinal extensive transverse myelitis</i>

LPS	Lipopolysaccharide
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MCP-1	<i>Monocyte-chemoattractant protein 1</i>
MBP	Myelin basisches Protein
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRP14	<i>Myeloid-related protein 14</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NAWM	<i>Normal appearing white matter/</i> Normal erscheinende weiße Substanz
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NMO	Neuromyelitis optica
NMOSD	Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen
OBIF	<i>Osteoblast induction factor</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PLP	Proteolipid-Protein
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PPMS	Primär-progrediente MS
PPWM	<i>Periplaque white matter/</i> peri-Plaque weiße Substanz
RR	<i>Relapsing-remitting</i>
RRMS	<i>Relapsing-remitting MS</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPMS	Sekundär progrediente MS
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TH	T-Helfer
TMEM119	Transmembranes Protein 119
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
VZV	Varicella-Zoster-Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Demyelinisierende Erkrankungen

Oligodendrozyten umwickeln mit ihren Fortsatzmembranen die Axone der Nervenzellen des Zentralnervensystems (ZNS) und erzeugen dadurch eine (mehrschichtige) Isolierschicht. Dies ermöglicht eine schnelle und effiziente Reizweiterleitung. Oligodendrozyten sind Teil eines komplexen Netzwerks aus Gliazellen und neuronalen Zellen. Ihre Aufgaben umfassen unter anderem die metabolische Unterstützung der Neurone durch Regulierung der Ionen- und Wasserhomöostase und die Anpassung an aktivitätsabhängige neuronale Signale. Die Energieversorgung von Nervenzellen ist von einer intakten Interaktion mit Gliazellen und im Bereich der Axone insbesondere von einer intakten Kopplung an Oligodendrozyten abhängig (Fünfschilling et al. 2012; Micu et al. 2018; Stadelmann et al. 2019).

Auf unterschiedliche Arten kann es im ZNS zum Verlust von Myelinscheiden kommen. Multiple Sklerose (MS), Neuromyelitis optica (NMO) und progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) sind demyelinisierende Erkrankungen des zentralen Nervensystems. MS ist eine chronisch, oft schubförmig verlaufende, entzündliche Erkrankung, die zu fokalen demyelinisierten Läsionen im Bereich des gesamten ZNS führen kann. Die Ätiologie ist bisher ungeklärt (Stadelmann et al. 2019). Die NMO-Spektrumerkrankungen (NMOSD) sind eine Gruppe von meist schubförmig verlaufenden Autoimmunerkrankungen des ZNS, bei denen klassischerweise Autoantikörper (AK) des Typs Immunglobulin (Ig) G gegen Aquaporin 4 (AQP4) auftreten (Jasiak-Zatonska et al. 2016). Die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) ist eine progredient verlaufende entmarkende zentralnervöse Erkrankung, die durch das John Cunningham (JC)-Polyomavirus verursacht wird. Die Erkrankung tritt vor allem bei immunsupprimierten Personen auf (Sahraian et al. 2012; Lanza Cariccio et al. 2018).

1.1.1 Multiple Sklerose

Die MS ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS. Die Erkrankung wurde erstmals 1868 von Jean Martin Charcot beschrieben (Zalc 2018). Die MS ist in Deutschland die häufigste chronische ZNS-Erkrankung junger Menschen. Sie verläuft in Schüben oder progredient und führt zu multifokalen Entmarkungsläsionen. Diese sind durch Inflammation, Demyelinisierung und axonale Schädigung charakterisiert (Gold et al. 2012). Die Ätiologie ist bis heute unbekannt. Eine durch T-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung (Wekerle 2008) und der

Zusammenhang mit viralen Infektionen als möglicher auslösender Mechanismus der Erkrankung (Steinbach et al. 2019) stehen im Interesse der Forschung.

1.1.1.1 Epidemiologie

Weltweit sind ca. 2 Millionen Menschen an MS erkrankt. Frauen sind von der schubförmig verlaufenden MS ca. 3 mal häufiger betroffen als Männer. Die Erkrankung manifestiert sich meist um das 30. Lebensjahr (Gold et al. 2012). Die schubförmige MS kann aber auch schon im Kindes- und Jugendalter auftreten (Banwell et al. 2007). Die primär progrediente MS betrifft etwa gleich häufig Frauen und Männer und manifestiert sich typischerweise in der vierten oder fünften Lebensdekade (Gold et al. 2012). Die MS tritt am häufigsten nördlich des Äquators in den gemäßigten Breiten auf bei Menschen europäischer Abstammung (Ebers und Sadovnick 1994). In Migrationsstudien konnte gezeigt werden, dass Menschen unter 15 Jahren das Erkrankungsrisiko des Migrationslands annehmen, wohingegen über 15-jährige MigrantInnen das Erkrankungsrisiko des Herkunftslands behalten (Martyn et al. 1997). Es besteht ein Zusammenhang zwischen Vitamin D-Spiegel, ultravioletter (UV) Strahlung und der Anfälligkeit für MS. Diese werden häufig als Erklärungsansatz des Breitengradeffekts herangezogen. Ein erhöhter Vitamin D-Spiegel, insbesondere vor dem 20. Lebensjahr, ist mit einem geringeren Erkrankungsrisiko assoziiert. UV-Strahlung scheint auch protektiv zu wirken, was sich sowohl durch die Wirkung auf Vitamin D als auch durch unabhängige Wirkungen auf das Immunsystem erklären lässt (Baecher-Allan et al. 2018). Die Anfälligkeit für die Erkrankung hängt ebenfalls stark mit der Genetik zusammen. In großen Genomstudien konnten über 200 Risikoloci identifiziert werden. Einige Polymorphismen in Genen, die sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunität regulieren, sind ebenfalls mit einem erhöhten Krankheitsrisiko assoziiert. Hierbei sind insbesondere Gene, die die Funktion von zytotoxischen und regulatorischen T- und Mikrogliazellen regulieren, von Bedeutung. Eineiige Zwillinge von Erkrankten haben eine Erkrankungswahrscheinlichkeit von 20-30%. Es besteht auch ein Zusammenhang mit Fettleibigkeit bei Kindern und Rauchen. Aus unbekanntem Gründen steigt die Inzidenz dieser Krankheit in westlichen Ländern, insbesondere bei Frauen (Stadelmann et al. 2019).

1.1.1.2 Ätiologie- /Pathogenesetheorien

Die Ätiologie der MS ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es existieren zahlreiche Theorien über die Entstehung der Krankheit. Sowohl genetische, ethnische, sozioökonomische als auch Umweltfaktoren können die Krankheitsentstehung beeinflussen (Baecher-Allan et al. 2018).

Der Autoimmunhypothese liegt zugrunde, dass autoreaktive CD4-positive Lymphozyten die Entzündungsreaktion im ZNS auslösen (Nakahara et al. 2012). Sowohl T-Helfer(TH)-1 Zellen als auch TH17-Zellen scheinen in der Lage zu sein, die Demyelinisierung und die axonalen Schäden zu verursachen (Legroux und Arbour 2015). Autoreaktive Zellen gegen ZNS-Bestandteile sind nicht unbedingt pathologisch und auch teilweise bei Gesunden zu finden, wo sie allerdings in niedrigerer Anzahl und mit geringerer Affinität vorkommen (Bielekova et al. 2004). Bei der Autoimmunhypothese wird angenommen, dass gegen Myelin-Epitope gerichtete autoreaktive T-Zellen durch einen bislang noch unbekanntem Stimulus in der Peripherie aktiviert werden. Dies führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der aktivierten T-Zellen. Die Adhäsionsmoleküle ermöglichen die Interaktion mit Endothelzellen und die Transmigration der aktivierten T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Im ZNS werden diese T-Zellen durch Antigen-präsentierende-Zellen, die Myelin-Epitope präsentieren, re-stimuliert und beginnen mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise Interferon(IFN)- γ und Interleukin(IL)-17. Diese proinflammatorischen Zytokine aktivieren residente Mikrogliazellen und erhöhen wiederum die Permeabilität der BHS. Dies führt zur weiteren Rekrutierung zusätzlicher inflammatorischer Zellen und infolgedessen zur Demyelinisierung und axonalen Schädigung (Legroux und Arbour 2015; Sospedra und Martin 2016). Des Weiteren steht die Rolle bestimmter Populationen von Effektor-T-Zellen, regulatorischen Zellen und B-Zellen im besonderen Interesse bei der Entstehung der Multiplen Sklerose (Baecher-Allan et al. 2018). Die Autoimmunhypothese gilt als wahrscheinlich, konnte aber bis heute nicht bewiesen werden (Nakahara et al. 2012; Kuhlmann et al. 2017).

Auch eine virale Infektion gilt als mögliche Ursache für die Entstehung einer MS. Viren können auf unterschiedliche Weise ins ZNS gelangen. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) bspw. kann über eine Infektion der Endothelzellen in das ZNS gelangen. Andere Viren können als blinde Passagiere mithilfe von Immunzellen in das ZNS eintreten. Manche Viren sind darüber hinaus in der Lage, entlang von peripheren Axonen (bspw. Masernvirus) einzuwandern oder können über eine Infektion des Plexus choroideus ins ZNS gelangen [bspw. Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)] (Getts et al. 2013).

Verschiedene Studien zur Epidemiologie, insbesondere die oben genannten Migrationsstudien zur MS, weisen auf einen starken Umweltzusammenhang des MS-Erkrankungsrisikos hin. Es wird vermutet, dass zwischen der Exposition gegenüber auslösendem Umweltfaktor (z. B. Virusinfektion) und der ersten klinischen Manifestation der MS eine beträchtliche Zeit vergehen

könnte. Virusinfektionen können nicht nur direkt ZNS-Zellen infizieren, sondern auch Selbsttoleranzmechanismen auf verschiedene Wege durchbrechen. Bekannte Mechanismen hierfür sind bspw. molekulare Mimikry, Epitop-Ausweitung („*epitope spreading*“), *Bystander*-Aktivierung und virales Déjà-Vu. Die Ausweitung von Epitopen und die *Bystander*-Aktivierung sind Mechanismen, bei denen die entzündliche Umgebung, die durch die Infektion hervorgerufen wurde, zur unbeabsichtigten Stimulation vorhandener autoreaktiver T-Zellen führt. Im Gegensatz dazu basieren molekulare Mimikry und virales *Déjà Vu* auf dem Vorhandensein von T-Zellen, die eine Kreuzreaktivität zwischen einem Antigen des ZNS und einem angetroffenen Pathogen aufweisen. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Pathogen-induzierte entzündliche Veränderungen in der Gewebemikroumgebung für spätere Autoimmunangriffe zu prädisponieren scheinen (Getts et al. 2013; Steinbach et al. 2019).

Frühe Infektionen mit Viren wie bspw. dem Epstein-Barr-Virus (EBV), Varicella-Zoster-Virus (VZV) (Sotelo und Corona 2011), Masernvirus (Getts et al. 2013) oder dem Humanen Herpesvirus 6 (Soldan et al. 1997) sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für MS assoziiert. Auch humane endogene Retroviren (HERV), die Erbinformationen in das menschliche Genom integrieren können, werden als mögliche Ursache für die MS diskutiert. HERVs sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, z. B. endogenen Psychosen, Psoriasis, Diabetes mellitus Typ 1, rheumatoider Arthritis und verschiedenen malignen Tumoren (Emmer et al. 2014). Im Vergleich zu gesunden Personen weisen MS-PatientInnen genetische Unterschiede in der Promotorregion von HERV-Fc1 auf (Nexø et al. 2011). Es wurde berichtet, dass die HERV-Expression durch unterschiedliche Faktoren wie bspw. Östradiol oder Lichtexposition beeinflusst werden kann. Auch EBV-, Herpes-Simplex-Virus (HSV) 1- und Cytomegalie-Virus-Infektionen (CMV) können zu einer Transaktivierung von HERVs führen. Des Weiteren wird diskutiert, ob virale Superantigene, die zur Aktivierung von T- und B-Zellen führen, zu der Entstehung der MS beitragen (Emmer et al. 2014).

1.1.1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie

Klinisch werden bei der MS unterschiedliche Stadien und Verläufe unterschieden. Zu diesen gehören das klinisch isolierte Syndrom (KIS), die schubförmige MS (*relapsing-remitting* MS = RRMS), die sekundär progrediente MS (SPMS) und die primär progrediente MS (PPMS). Beim klinisch isolierten Syndrom manifestieren sich erste Symptome einer möglichen Multiplen Sklerose, ohne dass die Diagnosekriterien erfüllt sind. Die Diagnosekriterien sind in Tabelle 11 im Anhang aufgeführt. Am häufigsten ist die RRMS, die bei ca. 80% der PatientInnen auftritt. Bei dieser Form kommt es zu neurologischen Ausfällen in Form von Schüben, die teilweise

reversibel sein können. Eine sichere Behinderungszunahme zwischen den Schüben ist nicht zu beobachten. Die sekundär progrediente Form entwickelt sich aus dem schubförmigen Verlauf und ist durch eine Zunahme der Behinderung mit oder ohne aufgesetzte Schübe charakterisiert. Mindestens 50% der unbehandelten PatientInnen leiden nach durchschnittlich 10 Jahren an einer sekundären Progredienz. Ca. 10-15% der PatientInnen erkranken an der primär progredienten Form, diese zeichnet sich durch eine Behinderungszunahme ohne vorherigen schubförmigen Verlauf aus. Bei dieser Verlaufsform ist eine spastische Gangstörung typisch. Seltener zeigen die PatientInnen ein progredientes zerebelläres Syndrom und weisen deutlich weniger entzündliche Veränderungen in der kranialen Magnetresonanztomographie (MRT) auf (Gold et al. 2012).

Frühsymptome der MS sind häufig Sensibilitätsstörungen, einseitige Optikusneuritis, Gangunsicherheit und Gangstörung. Ein Schub wird durch neue oder wiederkehrend auftretende klinische Symptome definiert, die in der klinischen Untersuchung objektiviert oder von PatientInnen subjektiv berichtet werden. Hierbei ist wichtig, dass die Defizite mindestens 24 Stunden anhalten, mindesten 30 Tage seit dem Beginn eines vorausgegangenen Schubs vergangen sind und keine Änderung der Körpertemperatur bzw. Anzeichen einer Infektion vorliegen (Lublin und Reingold 1996).

Die klinische Diagnose der MS stützt sich auf die Anamnese, hierbei sind vor allem Hinweise für vorangegangene Ereignisse mit Schubcharakter wichtig. Des Weiteren sollten Autoimmunerkrankungen, Fatigue, Depressionen, Konzentrationsstörungen sowie Beschwerden im Bereich der Blasen-, Mastdarm- und Sexualfunktion erfragt werden. Die gründliche neurologische Untersuchung wird zur Objektivierung der neurologischen Ausfälle sowie zur Abklärung von Differentialdiagnosen durchgeführt. Evozierte Potenziale und die MRT gehören zur Diagnostik der MS. Die Liquoruntersuchung ist zur Abgrenzung gegenüber erregerbedingten Erkrankungen und zum Nachweis von intrathekalen oligoklonalen Banden als Hinweis auf eine intrathekale Immunglobulinbildung und einen chronisch-entzündlichen Prozess relevant. Eine umfassende rheumatologische und infektiologische Laboruntersuchung ist durchzuführen. Des Weiteren etabliert sich die optische Kohärenztomografie als Untersuchungsmethode, dort kann bei MS-PatientInnen eine Reduktion der Axondichte festgestellt werden (Gold et al. 2012).

Die Diagnose der Multiplen Sklerose wird anhand der 2017 überarbeiteten McDonald-Kriterien gestellt (Schwenkenbecher et al. 2019).

Die Therapie der Multiplen Sklerose setzt sich aus einer Basistherapie und einer Schubtherapie zusammen. Zusätzlich kann eine Eskalationstherapie bei Nichtansprechen notwendig werden. Bei der Schubtherapie kommen Glukokortikoid-Pulstherapie oder als 2. Wahl die Plasmaseparation zum Einsatz. Die Basistherapie richtet sich nach der klinischen Verlaufsform. Medikamente die zum Einsatz kommen, sind Interferon-beta, Glatirameracetat, Fingolimod, Natalizumab, Mitoxantron und bei Nichtansprechen auf die Therapie Azathioprin und Cyclophosphamid (Gold et al. 2014). Die Stufentherapie der MS ist im Anhang in Tabelle 12 dargestellt.

1.1.1.4 Pathologie

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Der pathologische MS-Prozess beinhaltet eine Störung der BHS, multifokale Entzündungen, Demyelinisierung, Oligodendrozytenverlust, reaktive Gliose und axonale Degeneration (Lucchinetti et al. 2000; Baecher-Allan et al. 2018). MS-Läsionen können im gesamten ZNS auftreten, sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz. Am häufigsten sind sie am Sehnerv, im Rückenmark, im Hirnstamm und in der periventrikulären weißen Substanz zu finden. Darüber hinaus ist unmittelbar an den Subarachnoidalraum grenzendes Gewebe besonders anfällig für Demyelinisierung (Stadelmann et al. 2011). Die kortikale Demyelinisierung kann Großhirn und Kleinhirn betreffen und ist mit einem entzündlichen Infiltrat der Leptomeningen assoziiert (Lassmann et al. 2007). Neben fokalen Läsionen kommt es bei der MS auch zu einer Atrophie des Gehirns (Stadelmann et al. 2011). Es wird angenommen, dass in den frühen Phasen die Entzündungsreaktion die treibende Ursache des Krankheitsverlaufs ist, während in den progredienten Phasen neurodegenerative Prozesse überwiegen (Lassmann et al. 2007). Es wurden zwei verschiedene Neurodegenerationsmuster im Cortex identifiziert: oxidative Schädigung kortikaler Neurone und retrograde Neurodegeneration aufgrund einer axonalen Schädigung in der weißen Substanz (Haider et al. 2016).

Die Läsionen sind histopathologisch durch ein entzündliches Infiltrat gekennzeichnet, welches sich vor allem aus Mikrogliazellen, Makophagen und wenigen T-Zellen zusammensetzt, und weisen einen Verlust von Myelin sowie eine axonale Schädigung auf. Läsionen sind häufig rund/oval und können konfluieren. Auch die oft als normal erscheinende weiße Substanz (normal appearing white matter = NAWM) bezeichnete weiße Substanz von MS-PatientInnen ist durch eine Aktivierung der Mikrogliazellen gekennzeichnet und assoziiert mit diffusem axonalen Schaden und Demyelinisierung (Lassmann et al. 2007). Es kommt auch fernab von Läsionen in der NAWM zu verringerter axonaler Dichte und neuronalen Atrophien (Stadelmann et al. 2011). Teilweise findet v.a. an den Läsionsrändern eine Neubildung von Myelin statt, die als

Remyelinisierung bezeichnet wird. Eine effiziente Remyelinisierung ist jedoch nur bei 20% der MS-PatientInnen zu finden (Patrikios et al. 2006). MS-Läsionen lassen sich in verschiedene Stadien unterschiedlicher Aktivität unterteilt. Die Läsionen werden nach entmarkender und entzündlicher Aktivität eingeteilt. Es werden aktive und demyelinisierende Läsionen, aktive und post-demyelinisierende, kombiniert-aktive/inaktive und demyelinisierende Läsionen, kombiniert aktive/inaktive und post-demyelinisierende Läsionen und chronisch-inaktive demyelinisierte Läsionen unterschieden (Kuhlmann et al., 2017).

Aktive Läsionen sind der anfängliche Phänotyp von MS-Läsionen. Sie sind am häufigsten bei MS-Patienten mit kurzer Krankheitsdauer bzw. beim schubförmigen Krankheitsverlauf zu finden (Kuhlmann et al. 2017). Kombiniert aktive/inaktive Läsionen sind bei Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 10 Jahren und einem progredienten Krankheitsverlauf der dominierende Läsionstyp (Lucchinetti et al. 2000; Kuhlmann et. al. 2017).

1.1.2 Neuromyelitis optica

Die NMO, auch Devic-Syndrom genannt, ist eine seltene demyelinisierende entzündliche Erkrankung des ZNS. Erste Berichte über PatientInnen mit Myelitis und vollständiger Erblindung stammen aus dem frühen 19. Jahrhundert. Eugène Devic und sein Student Fernand Gault veröffentlichten 1894 eine Übersichtsarbeit über das Erkrankungsbild. (Jarius et al. 2014). Lange galt die NMO als eine Variante der Multiplen Sklerose, bis die Entdeckung der Aquaporin 4-Antikörper das Verständnis der Erkrankung veränderte (Lennon et al. 2005). Dieser Antikörper wird auch als „NMO-IgG“ (Lennon et al. 2005) bezeichnet. Heute gilt die NMO als eigenständige Krankheit. 10-25% der NMO-Fälle sind AQP4-IgG-seronegativ. Weiter Antikörper, wie Aquaporin 1-Antikörper und Antikörper gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) werden diskutiert (Jasiak-Zatonska et al. 2016).

1.1.2.1 Epidemiologie

Die Datenlage für Inzidenz und Prävalenz der NMO ist lückenhaft. In der westlichen Welt wird die Prävalenz auf 4.4/100.000 Einwohner geschätzt (Trebst et al. 2014). Die Dunkelziffer der NMO-PatientInnen könnte noch höher sein, da diese insbesondere vor der Zeit der Serumantikörperbestimmung häufig als MS-PatientInnen fehldiagnostiziert wurden (Jarius et al. 2014). Mehr Frauen als Männer leiden an NMO (Verhältnis 9:1). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 39 Jahren und damit im Durchschnitt ca. 10 Jahre höher als bei der MS. Auch frühe Fälle im Kindesalter wurden beschrieben. Die NMO verläuft meist schubförmig, kann aber auch monophasisch verlaufen. Im Vergleich zur MS ist die NMO häufiger mit anderen

Autoimmunerkrankungen assoziiert wie bspw. dem Sjögren-Syndrom, dem systemischen Lupus erythematodes oder der Sarkoidose (Trebst et al. 2014).

1.1.2.2 Klinik, Diagnostik und Therapie

Anti-AQP4-Serum-AK sind bei bis zu 80% der PatientInnen mit NMO im Serum nachweisbar. Etwa 90% der PatientInnen leiden an einem schubförmig rezidivierenden Krankheitsverlauf, bei dem Attacken von Optikusneuritis, meist beidseits, und Myelitis unvorhersehbar auftreten. Die restlichen 10% der NMO-PatientInnen weisen einen monophasischen Verlauf auf. Dieser zeigt häufiger eine beidseitige Optikusneuritis und Myelitis. Im Vergleich zur MS sind die Krankheitsverläufe drastischer. Ohne Behandlung sind spontane Remissionen seltener, und es kommt schneller zu einer irreversiblen neurologischen Behinderung (Jarius et al. 2014).

Leitsymptome sind die longitudinale extensive transverse Myelitis (>3 Wirbelkörpersegmente) und die schwere, rezidivierende und teilweise beidseitige Optikusneuritis, sie treten selten auch gleichzeitig auf. Die Myelitis zeigt meistens einen akuten bis subakuten Verlauf. Komplette Querschnittssyndrome, Para- und Tetraparesen, aber auch milde Verläufe wurden beschrieben (Trebst et al. 2011). Es kann zu Sensibilitätsstörungen unterhalb der Läsionen und für die Erkrankung charakteristischen Blasenstörungen kommen. Außerdem können NMO-PatientInnen unter einer Spastik der Extremitäten und unter radikulären Schmerzen leiden. Die Optikusneuritis führt häufig zur Erblindung oder persistierenden Visusminderung (Pandit 2015). Der Nachweis von AQP4-Antikörpern im Serum von PatientInnen erhöht das Risiko für Rezidive und die Ausbildung einer klassischen NMO. Der Großteil der mit einer NMO in Zusammenhang stehenden Todesfälle resultiert aus einer schweren aufsteigenden zervikalen Myelitis oder einer Beteiligung des Hirnstamms. Dies kann zum Atemstillstand führen (Jarius et al. 2014). Die PatientInnen können zusätzlich Symptome wie Vertigo, Nystagmus, Ptosis, Ataxie, Hörverlust und Trigeminusneuralgie entwickeln (Wingerchuk et al. 2006). Eine Hirnstammbeteiligung kann sich klinisch durch Übelkeit, Erbrechen und einen anhaltenden Schluckauf manifestieren (Misu et al. 2007). Außer der klassischen NMO gibt es weitere Erkrankungen, bei denen AQP4-Ak nachgewiesen werden können. Diese Erkrankungen werden auch als NMO-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD) zusammengefasst. Dazu gehören die isolierte longitudinale extensive transverse Myelitis (LETM), die Läsionen über mehr als 3 Segmente aufweist, die monophasische oder rekurrende isolierte Optikusneuritis, Hirnstammsyndrome, Zwischenhirnsyndrome, Hirnnervenaufälle, ein Area-postrema-Syndrom oder zerbrale Syndrome (Trebst et al. 2011).

Die Diagnose der Neuromyelitis optica beruht auf der Anamnese, einer körperlichen Untersuchung und einer Labordiagnostik mit Antikörpertestung, wobei ein fehlender Antikörpernachweis die NMO nicht ausschließt. Zur Sicherung der Diagnose wird eine Liquoruntersuchung durchgeführt. Oligoklonale Banden sind nur bei 20% der PatientInnen nachweisbar (Pandit 2015). Weiter stützt sich die Diagnostik auf eine spinale und zerebrale Magnetresonanztomographie-Untersuchung (MRT). Als klinische Indexereignisse gelten Optikusneuritis und akute Myelitis. Darüber hinaus müssen zwei der drei zusätzlichen Kriterien erfüllt sein. Zu diesen zählen 1. eine Läsion des Rückenmarks in der MRT, die sich über drei oder mehr Wirbelsegmente erstreckt, 2. ein MRT des Gehirns, das die diagnostischen Kriterien für MS nach Paty nicht erfüllt, oder 3. im Serum nachweisbare AQP4-Antikörper. Sind diese Kriterien erfüllt, kann die Diagnose „NMO“ gestellt werden (Wingerchuk et al. 2006; Jarius et al. 2014).

Die Neuromyelitis optica ist eine unheilbare, seltene Erkrankung. Aufgrund der spärlichen Datelage ist noch keine evidenzbasierte NMO-Therapieempfehlung zu finden. Die Konsensusgruppe empfiehlt aufgrund des schweren Verlaufs bei gesicherter Diagnose die rasche Einleitung einer immunsuppressiven Therapie. Je nach Ausprägung des klinischen und radiologischen Befunds kommen Immunsuppressiva wie Azathioprin oder der B-Zell-depletierende anti-Cluster of Differentiation (CD) 20-Antikörper Rituximab zum Einsatz. Beim Vorliegen von Kontraindikationen, dem Auftreten von Nebenwirkungen oder Nichtansprechen auf die Therapie kann auch eine Therapie mit Mycophenolatmofetil oder Mitoxantron begonnen werden und bei schweren Verläufen eine Eskalationstherapie mit Cyclophosphamid (Trebst et al. 2011). Neuere Therapiemöglichkeiten sind Anti-C5-Komplementinhibitor (Eculizumab), Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor (Satralizumab) und CD19 Antikörper wie Inebilizumab (Brod 2020).

1.1.2.3 Pathologie

Histopathologisch zeigen sich bei der NMO entzündlich demyelinisierende Läsionen und ein ausgeprägter Astrozytenverlust, die im Rückenmark sowohl die weiße als auch die graue Substanz betreffen können. Zu den Prädilektionsstellen der NMO gehören die Nervi optici, der Hirnstamm und das Rückenmark. Diese Bereiche weisen die höchsten AQP4-Konzentrationen, v.a. in der grauen Substanz, auf. Zeitweise kann es in NMO-Läsionen zu einem kompletten Verlust von AQP4-positiven Astrozyten kommen (Misu et al. 2007; Roemer et al. 2007). 60-70% der PatientInnen weisen zusätzlich zerebrale Läsionen auf. Diese sind bei der NMO typischerweise in periventrikulären Bereichen und im Hypothalamus zu finden (Pittock et al. 2006).

AQP4 ist ein Transmembranprotein, das den Wassereintritt in spezifische Zellen des Gehirns reguliert. Es wird hauptsächlich von Astrozyten und vorwiegend in deren Fortsätzen exprimiert

(Verkman et al. 2013). Das Protein ist auch in anderen Geweben wie bspw. der Lunge, der Plazenta und in Nierenepithelzellen zu finden (Graber et al. 2008). Die Detektion von AQP4-IgG-Antikörpern ist im Serum sensitiver als im Liquor. Die Schwere des Astrozytenschadens korreliert nicht mit den AQP4-IgG-Serumspiegeln (Wu et al. 2019). Tierexperimente mit AQP4-AK deuten darauf hin, dass für den Beginn der Erkrankung eine Störung der BHS von Bedeutung sein könnte (Jarius et al. 2014; Winkler et al. 2021).

Perivaskulär lassen sich in frühen NMO-Läsionen Ablagerungen von Antikörpern und aktiviertem Komplement identifizieren. Die AQP4-AK binden an die AQP4-Kanäle an den Astrozytenfortsätzen, die das primäre Ziel der autoimmunen Entzündungsreaktion darstellen. Es kommt zu einer Komplement- und Antikörper-vermittelten Astrozytenlyse. Zusätzlich scheinen Effektorzellen wie natürliche Killerzellen und Granulozyten durch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität den Astrozytenschaden zu verstärken. Dies führt zu einer weiteren Schädigung der BHS, was wiederum das Eintreten von AQP4-IgG ins ZNS erleichtert. NMO-Läsionen beginnen mit der Fragmentierung und dem Verlust von Astrozyten. Später kommt es zur Oligodendrozytenapoptose und schließlich zum Verlust von Myelinscheiden. Die Anzahl von adulten Oligodendrozyten und von Oligodendrozytenvorläuferzellen ist in NMO-Läsionen deutlich reduziert (Misun et al. 2007; Wrzos et al. 2014; Wu et al. 2019). Oligodendrozyten- und Astrozytenbestandteile sind teilweise in Phagozyten darstellbar. In NMO-Läsionen kommt es auch zur axonalen Schädigung (Parratt und Prineas 2010; Jarius et al. 2014). Die NMO-Läsionen des ZNS sind durch einen Astrozytenverlust und eine weitreichende Demyelinisierung gekennzeichnet. Es lassen sich frühe bzw. aktive von späten bzw. inaktiven Läsionen unterscheiden. Die Unterscheidungsmerkmale sind im Material- und Methodenteil dieser Arbeit zu finden.

1.1.3 Progressive multifokale Leukenzephalopathie

Die PML ist eine seltene demyelinisierende Viruserkrankung des ZNS. Sie wurde 1958 zum ersten Mal als eigenständige Erkrankung klinisch beschrieben (Åström et al. 1958). Sie verläuft häufig schwer und oft tödlich. Die Erkrankung war bis zum Auftreten des durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) verursachten Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) relativ unbekannt. Die PML ist eine der häufigsten opportunistischen Infektionen bei dieser Erkrankungsbild. Nach der Entdeckung eines signifikant erhöhten PML-Risikos unter der Therapie mit Natalizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen α_4 -Integrin, einem Adhäsionsmolekül, welches für das Einwandern von Leukozyten in Entzündungsherde wichtig ist und zur Behandlung schwerer Verläufe der Multiplen Sklerose eingesetzt wird, erregte die Erkrankung

in der medizinischen und wissenschaftlichen Gemeinschaft zusätzliche Aufmerksamkeit (Pavlovic et al. 2015).

1.1.3.1 Epidemiologie

92% aller Erwachsenen sind mit dem John Cunningham-Virus (JC-Virus), einem Polyomavirus, infiziert. Die PML manifestiert sich jedoch fast ausschließlich bei immundefizienten Personen. Auch therapeutische Immunsuppression, die Therapie mit monoklonalen Antikörpern (bspw. Natalizumab bei Multipler Sklerose, Rituximab) und neoplastische Erkrankungen können das Auftreten der Krankheit begünstigen (Meyding-Lamadé et al. 2018). Die MS-Therapie mit Natalizumab ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die PML assoziiert. Das Risiko steigt mit zunehmender Behandlungsdauer, insbesondere wenn die Therapie länger als 24 Monate durchgeführt wird oder vorher mit einem anderen Immunsuppressivum, unabhängig von Dauer, Art und Abstand, therapiert wurde (Gold et al. 2012).

1.1.3.2 Klinik, Diagnostik und Therapie

Klinisch manifestiert sich die PML meist mit neuropsychologischen Auffälligkeiten und Sehstörungen. Es kann zu Paresen, aphasischen Symptomen, Krampfanfällen, Ataxie, Dysarthrie und Kopfschmerzen kommen. Späte Phasen sind von Ataxie, Demenz, Tetraparese, kortikaler Blindheit und präfinalen Dezerebrationszeichen geprägt (Meyding-Lamadé et al. 2018). Die HIV-assoziierte PML weist eine Letalität von 20-25% auf (Meyding-Lamadé et al. 2018). Ca. 80% der PML-Überlebenden weisen schwere neurologische Defizite auf (Koralnik 2006).

Die PML tritt fast nur bei PatientInnen mit Immunschwäche auf (bspw. HIV-Infektion, Immunsuppression, lymphoproliferative Erkrankung, Chemotherapie, Therapie mit monoklonalen Antikörpern), weshalb diese anamnestisch von besonderem Interesse sind (Sahraian et al. 2012). Nach der Anamnese werden der neurologische Status erhoben und eine MRT-Bildgebung durchgeführt. Zur Verifizierung der Diagnose wird ein Virusnachweis im Liquor durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die Sensitivität der PCR ist durch Hypermutation der Virusstämme begrenzt. Bei hochgradigem Verdacht ist eine erneute Bestimmung, auch in unterschiedlichen Referenzlaboren, durchzuführen. Im Zweifelsfall kann auch eine Hirnbiopsie in Betracht gezogen werden (Meyding-Lamadé et al. 2018).

Derzeit existiert keine evidenzbasierte Therapie oder Prophylaxe für die PML. Die Erkrankung hat eine schlechte Prognose und ist daher bei der Entwicklung neuer Immuntherapien eine gefürchtete Nebenwirkung. Die Behandlung der PML konzentriert sich auf die Immunrekonstitution. Hierdurch kommt es zur Wiederherstellung der Immunantwort auf die Infektion mit dem JC-Virus. Im Zuge der anti-viralen Immunantwort droht die Gefahr eines entzündlichen

Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS), das medikamentös unterdrückt werden muss (Metz et al. 2012; Pavlovic et al. 2015). Bei AIDS-Patienten kann durch die Therapie der Grunderkrankung und den damit verbundenen Anstieg der Immunkompetenz die Symptomatik verbessert werden (Sahraian et al. 2012). Bei Patienten unter Natalizumab-Therapie wird nach dem sofortigen Therapiestopp eine Plasmapheresebehandlung zur Elimination des Wirkstoffes empfohlen. Es gibt keine allgemeine Therapieempfehlung für die Behandlung der PML. Cidofovir (Nukleotidanalogen), Camptothecin (Topoisomerase-I-Inhibitor) oder β -Interferon wirkten sich in Fallberichten positive aus. Des Weiteren kommen Mefloquin, ein antiparasitäres Arzneimittel mit ungeklärtem Wirkmechanismus, und Mirtazapin, welches die virale Zellinvasion durch serotonerge 5HT_{2A}R-Rezeptor-Blockade vermindert, probatorisch als antivirale Therapie in der PML zum Einsatz (Meyding-Lamadé et al 2018).

1.1.3.3 Pathologie

In der Regel sind die Läsionen bilateral, asymmetrisch und bevorzugt in der subkortikalen hemisphärischen weißen Substanz lokalisiert. Läsionen der grauen Substanz sind ganz bevorzugt intrakortikal und weniger subpial zu beobachten. Des Weiteren weisen kortikale demyelinisierende Herde weniger entzündliche Infiltrate auf als Läsionen im Bereich der weißen Substanz (Koralnik 2006; Moll et al. 2008; Junker et al. 2020).

Die weiße Substanz enthält bei der PML meist multifokale Demyelinisierungsherde. Häufig sind entlang der Grenze zwischen der Großhirnrinde und der weißen Substanz kleine runde Entmarkungsherde zu finden (Love 2006). In den Läsionen sind viele schaumzellige Makrophagen, aber in der Regel nur wenige Lymphozyten enthalten, welche vor allem perivaskulär zu beobachten sind. Im fortgeschrittenen Stadium enthält die weiße Substanz große konfluente Entmarkungsherde, die teilweise zentrale Kavitationen aufweisen. Am Rand aktiver Demyelinisierungsläsionen befinden sich Oligodendrozyten mit vergrößerten Kernen, die mit JC-Virus infiziert sind. Des Weiteren können auch große Astrozyten mit bizarren, pleomorphen, hyperchromatischen Kernen in den Läsionen auftreten (Love 2006). Die Demyelinisierung bei der PML wird durch eine Infektion der Oligodendrozyten und Astrozyten durch das JC-Virus erklärt. Diese führt zu einem lytischen Oligodendrozytentod mit lokaler Virusausbreitung und anschließender Demyelinisierung (Corbridge et al. 2019)

1.2 Zusammenfassung „Demyelinisierende ZNS-Erkrankungen“

In der vorliegenden Arbeit werden einander gegenübergestellt: Die NMO als klassische Antikörper-mediierte Astrozyten-depletierende und demyelinisierende Autoimmunerkrankung, die PML als Beispiel einer demyelinisierenden Virusinfektion und die MS mit bereits erwähnter ungeklärter Ätiologie. Tabelle 1 fasst die relevanten Fakten der einzelnen Erkrankungen zusammen.

Tabelle 1 Demyelinisierende ZNS-Erkrankungen im Überblick

Demyelinisierende ZNS-Erkrankungen im Überblick			
Erkrankung	Neuromyelitis optica	Progressive multifokale Leukenzephalopathie	Multiple Sklerose
Klinische Erstmanifestation	Beidseitige Optikusneuritis, Myelitis	Sehstörungen, Paresen, Aphasie, Krampfanfälle, Ataxie, Dysarthrie, Kopfschmerzen ⁹	Sensibilitätsstörungen, einseitige Optikusneuritis, Gangunsicherheit, Gangstörung ²
♀: ♂	9:1 ³		3:1 ⁴
Erkrankungsalter	Mittleres Erkrankungsalter 39 Jahre ¹	bei Immunsuppression ⁵	Mittleres Erkrankungsalter 30 Jahre ⁴
Prädilektionsstellen	Nervi optici, Hirnstamm, Rückenmark ⁵	Weißer Substanz der zerebralen Hemisphären, Kortex ⁷	Kortex (insbesondere subarachnoidal), periventriculäre weiße Substanz, Sehnerv, Rückenmark, Hirnstamm ⁷
Betroffene Zellen in Läsionen der weißen Substanz	Primärer Astrozytenverlust mit sekundärem Oligodendrozytenverlust	Lytisches Oligodendrozytensterben, Oligodendrozytenapoptose ⁷	Myelinschädigung und Oligodendrozytenverlust ⁷
Liquor	Selten (20%) oligoklonale Banden ⁹	Virusnachweis PCR im Liquor ⁹	Meist oligoklonale Banden ⁴
Pathogenese	Aquaporin ⁴ Antikörper ⁷	JC Virus ⁷	autoimmun?

¹ Jarius et al. 2014, ² Lublin und Reingold 1996, ³ Trebst et al. 2014, ⁴ Gold et al. 2012, ⁵ Misu et al. 2007, ⁶ Stadelmann et al. 2011, ⁷ Stadelmann et al. 2019, ⁸ Meyding-Lamadé et al. 2018, ⁹ Pandit 2015

1.3 Mikroglia und Makrophagen

Das ZNS beherbergt Mikroglia im Parenchym und periphere Makrophagen im Plexus choroideus, im perivaskulären Raum und in den Meningen, die die primäre Abwehr gegenüber Infektionen bilden und zur Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS beitragen (Wang et al. 2019). Makrophagen und Mikrogliazellen sind mesodermalen Ursprungs und für die primäre

Immunreaktion von Bedeutung. Makrophagen sind phagozytierende Zellen, die sich von zirkulierenden peripheren Monozyten herleiten und in vielen Organen Aufräumarbeiten und Abwehrfunktionen wahrnehmen (Kettenmann et al. 2011). Mikrogliazellen werden im Dottersack gebildet und wandern während der Embryogenese vor der Etablierung der BHS in das ZNS ein (Colonna und Butovsky 2017). Die intakte BHS stellt postnatal eine Barriere für Makrophagen aus der Peripherie dar (Ransohoff und Cardona 2010). Mikrogliazellen sind eine langlebige und sich selbst erneuernde Population. Der Mikrogliazellpool scheint während des gesamten Lebens des Organismus bestehen zu bleiben. Im Gegensatz dazu stammen Plexus-Makrophagen hauptsächlich von aus dem Blut stammenden nach der Geburt immigrierten Monozyten ab (Butovsky und Weiner 2018).

Es besteht eine große morphologische Ähnlichkeit zwischen aktivierten bzw. phagozytierenden Mikrogliazellen und aus dem Blut in das ZNS eingewanderten Makrophagen. Periphere Makrophagen können unter bestimmten Umständen ins ZNS einwandern und sind dort insbesondere für die Abräumung von nekrotischem oder geschädigtem Gewebe von Bedeutung (Djukic et al. 2006). Makrophagen und Mikrogliazellen werden als bedeutend für die Entstehung zahlreicher neurologischer Erkrankungen, wie beispielsweise der amyotrophen Lateralsklerose, der Alzheimer-Krankheit und der Multiplen Sklerose, diskutiert (Butovsky und Weiner 2018; Wang et al. 2019).

Mikroglia und Makrophagen haben sehr dynamische Phänotypen. Im ruhenden Zustand sind Mikroglia (residente Mikrogliazellen) verzweigte Zellen mit mehreren Fortsätzen, mit denen sie ihre Umgebung abtasten. Mikrogliafortsätze halten Kontakt zu Neuronen, Astrozyten und Blutgefäßen und überwachen den Funktionszustand von Synapsen. Verletzungen oder Entzündungsreize führen dazu, dass die Mikrogliazellen von einer verzweigten in eine amöboide Form übergehen. Der Zellkörper vergrößert sich, während sich die Zellfortsätze verkürzen. Die amöboide Morphologie spiegelt einen hochaktivierten Zustand wider, dieser ist mit Phagozytose und proinflammatorischen Funktionen verbunden (Colonna und Butovsky 2017).

Mikrogliazellen können sowohl inflammatorisch als auch antiinflammatorisch wirken, dies ist von ihrem Aktivierungsgrad und -typ abhängig. Mikroglia werden nach ihrem Aktivierungsmuster in vitro vereinfacht in zwei Phänotypen unterteilt. Der M1-Phänotyp wird typischerweise durch $\text{IFN-}\gamma$, Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)- α oder Lipopolysaccharide (LPS) induziert, wohingegen der M2-Phänotyp durch IL-10, IL-4 oder Prostaglandin (PG) E2 aktiviert wird. Der M1-Phänotyp ist an der Induktion von Gewebeschädigung beteiligt, während der M2-Phänotyp mit antiinflammatorischer Wirkung bzw. Gewebereparatur assoziiert ist (Boven et al. 2006;

Vogel et al. 2013). Die Einteilung in M1- und M2-Phänotyp stellt zwar die vielfältigen und teilweise gegensätzlichen Eigenschaften bzw. Funktionen von Mikroglia dar, wird aber besonders in vivo zunehmend kritisch gesehen und hinterfragt. In der Realität scheinen intermediäre Phänotypen und deutlich komplexere Aktivierungsmuster vorzuherrschen (Zhou et al. 2017). In MS-Läsionen können sowohl M1-assoziierte als auch M2-assoziierte Aktivierungsmarker nachgewiesen werden (Zrzavy et al. 2017; Butovsky und Weiner 2018; Jäckle et al. 2020).

Mikrogliazellen erfüllen physiologisch verschiedene wichtige und komplexe Funktionen im ZNS. Sie interagieren mit Neuronen und Gliazellen. Sie phagozytieren überflüssige synaptische Verbindungen und Axone und helfen so, neuronale Schaltkreise im sich entwickelnden und adulten Gehirn zu formen. Des Weiteren tragen Mikrogliazellen auf zweierlei Weise zur Neurogenese bei: durch Phagozytose überschüssiger neugeborener Zellen und durch Förderung der Neurogenese durch die Sekretion von trophischen Faktoren. Mikroglia sezernieren verschiedene Neurotrophine wie z.B. den *nerve growth factor* (NGF) und den *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). In Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die BDNF-Sekretion der Mikrogliazellen die lernabhängige Synapsenbildung fördert. Es wird vermutet, dass Mikrogliazellen durch die Neurotrophinsekretion in pränatalen Stadien die Synaptogenese beeinflussen. Mikrogliazellen exprimieren zahlreiche weitere Trophine, Interleukine und Wachstumsfaktoren. Auch an der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Oligodendrozyten und ihren Vorläuferzellen sind Mikrogliazellen beteiligt. Des Weiteren interagieren sie eng mit Astrozyten. Es konnte gezeigt werden, dass nach laserinduzierter Mikroverletzung Astrozyten Mikroglia-Fortsätze mithilfe von Adenosintriphosphat (ATP) an die Stelle der Verletzung lenken (Butovsky und Weiner 2018).

Studien an Hippocampus-Schnittkulturen haben gezeigt, dass Mikrogliazellen auch für den Schutz vor Exzitotoxizität von Bedeutung sind (Colonna und Butovsky 2017). Des Weiteren sind Mikrogliazellen für das chemotaktische Anlocken anderer Immunzellen von Bedeutung und können Antigene präsentieren (Butovsky und Weiner 2018). Unter bestimmten pathologischen Bedingungen können bei gestörter Blut-Hirn-Schranke periphere Monozyten aus dem Blut in das ZNS gelangen und sich dort teilweise als Gewebsmakrophagen etablieren (Djukic et al. 2006). Die Unterscheidung von residenten Mikrogliazellen und eingewanderten Makrophagen galt aufgrund fehlender Marker lange Zeit als schwierig. Durch die Entdeckung neuer Mikroglia-spezifischer Markerproteine können die Herkunft und die Aktivierungszustände der Mikrogliazellen und der Makrophagen im ZNS nun besser charakterisiert werden (Haage et al. 2019).

Um Mikrogliazellen von peripheren Makrophagen zu unterscheiden, werden spezifisch von Mikrogliazellen exprimierte Markerproteine genutzt. P2Y₁₂-Rezeptor (kurz: P2RY₁₂ oder P2Y₁₂) wird von homöostatischen Mikrogliazellen an der Zelloberfläche exprimiert und ist ein G-Protein gekoppelter purinerges Rezeptor für Adenosindiphosphat (ADP). Das Protein wird ebenfalls von Thrombozyten exprimiert. Die Inhibition von P2Y₁₂ wird klinisch zur antithrombotischen Therapie (bspw. Clopidogrel) genutzt (Bogie et al. 2014; Moore et al. 2015; Mildner et al. 2017). Die genaue Rolle dieses Rezeptors in der Steuerung der Mikrogliafunktion ist unbekannt. Das Typ I-Transmembranprotein TMEM119 wird ebenfalls spezifisch von Mikrogliazellen exprimiert und als Markerprotein genutzt (Bennett et al. 2016). Die TMEM119-Expression auf Mikrogliazellen wird durch die Gabe von Zytokinen wie bspw. IFN γ oder LPS herunterreguliert. Ursprünglich wurde TMEM119 als *osteoblast induction factor* (OBIF) auf der Oberfläche von Mausosteoblasten identifiziert. Die Funktion dieses Proteins in Mikroglia und Osteoblasten ist unbekannt (Satoh et al. 2016b).

Das CD68-Oberflächenprotein, u.a. durch den Antikörper-Klon KiM1P markiert, wird sowohl von Mikrogliazellen als auch von peripheren Makrophagen exprimiert und wird als Panphagozytenmarker beschrieben (Bitsch et al. 1998). Der CC-Chemokin-Rezeptor Typ 2 (CCR2) ist gemeinsam mit dem *monocyte-chemoattractant protein 1* (MCP-1), auch CC-Chemokinligand 2 (CCL2) genannt, für die Leukozytenmigration von Bedeutung. CCR2 wird von peripheren eingewanderten Makrophagen exprimiert (Prins et al. 2014). Das *myeloid-related protein 14* (MRP14) wird von vor kurzem ins Gehirn eingewanderten Makrophagen exprimiert (Brück et al. 1995).

1.4 Mikroglia- und Makrophagen-Aktivierungsmuster bei der Multiplen Sklerose

An Gewebe von MS-PatientInnen wurden nach der Identifizierung der jeweiligen Markerproteine Analysen zur Unterscheidung von Mikroglia und peripheren Makrophagen durchgeführt. Sowohl Mikroglia als auch Makrophagen akkumulieren in aktiv demyelinisierenden Läsionen und phagozytieren Myelin. In frühen Erkrankungsstadien scheinen sie die Demyelinisierungskaskade zu initialisieren, wohingegen sie in späteren Stadien die Remyelinisierung fördern und eine krankheitslindernde Wirkung diskutiert wird (Wang et al. 2019). Die Unterscheidung zwischen Mikrogliazellen und aus dem Blut eingewanderten Makrophagen galt lange als schwierig (Zrzavy et al. 2017). MS-PatientInnen zeigen eine Öffnung der BHS, und es ist eine ausgeprägte Makrophageninfiltration ins Gehirn zu sehen. Die Herkunft und die Aktivatoren der für die

Entzündungsreaktion bei der MS verantwortlichen Zellen sind von zentralem Interesse für das Verständnis der Erkrankung (Butovsky et al. 2014; Zrzavy et al. 2017).

Vorangegangene immunhistochemische Analysen anderer Arbeitsgruppen zeigten folgendes Aktivierungsmuster bei MS-PatientInnen: MS-PatientInnen wiesen in der NAWM einen höheren Aktivierungsgrad der Mikroglia auf als KontrollpatientInnen. Dieser höhere Aktivierungsgrad schien mit zunehmender Erkrankungsdauer zuzunehmen. Die Analysen ergaben, dass in der NAWM von Menschen mit MS und gesunden Kontrollen die Gesamtzahl der P2Y12- und TMEM119-exprimierenden Mikroglia verringert war, wobei nur die Dichte der P2Y12-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollen signifikant reduziert war (Zrzavy et al. 2017). In derselben Publikation wurde gezeigt, dass in aktiven MS-Läsionen eine große Anzahl Makrophagen- und Mikroglia-ähnlicher Zellen zu finden ist. Die meisten wurden als proinflammatorisch (M1) aktiviert beschrieben und exprimierten kein P2Y12. Es wurde beschrieben, dass aktive MS-Läsionen makrophagenähnliche TMEM119-positive Zellen enthalten, die Myelin-Abbauprodukte aufweisen. Ca. 45% der makrophagenähnlichen Zellen in aktiven Läsionen seien positiv für TMEM119, damit wahrscheinlich mikroglialen Ursprungs (Zrzavy et al. 2017). Des Weiteren wurden langsam wachsende Läsionen, die durch einen phagozytierenden Rand aus Mikroglia und Makrophagen gekennzeichnet sind, ausgewertet. Die Quantifizierung dieser Zellen ergab: Ein Teil der Makrophagen und Mikroglia am aktiven Läsionsrand exprimiere TMEM119, während die Expression von antiinflammatorischen Markern wie bspw. CD206 und CD163 niedrig war. Im Gegensatz dazu enthielten vollständig inaktive Läsionen nur wenige Makrophagen oder Mikroglia-ähnliche Zellen und der Marker P2Y12 wurde erneut exprimiert. Auf diesen P2Y12-positiven Zellen fand man teilweise auch entzündungsfördernde, proinflammatorische Aktivierungsmarker zu finden gewesen. Die Anzahl der TMEM119-positiven Zellen schienen in inaktiven Läsionen reduziert zu sein. Die Autoren vermuteten, dass der Verlust des homöostatischen P2Y12-Markers mit der Läsionsaktivität zusammenhängt. Des Weiteren stellten sie die These auf, dass eine größere Untergruppe von phagozytierenden Zellen in MS-Läsionen aus dem Mikroglia-Pool zu stammen scheint und zusätzlich myeloide Zellen aus der Peripherie einwanderten (Zrzavy et al. 2017; Wageningen et al. 2019).

1.5 Ziele der Arbeit

1. Charakterisierung der altersabhängigen Expression von Makrophagen- und Mikrogliamarkern bei Autopsiefällen ohne entzündliche ZNS-Erkrankung

2. Charakterisierung der Dichte und des Aktivierungszustands von Mikrogliazellen und Makrophagen in Läsionen und in der normal erscheinenden weißen Substanz bei Multipler Sklerose, Neuromyelitis optica und progressiver multifokaler Leukenzephalopathie.

3. Zeigen sich Unterschiede im Ursprung und in der Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen zwischen viraler Infektion (PML) und Autoimmunerkrankungen (NMO) des ZNS? Ähnelt das Aktivierungsmuster von Mikroglia- und Makrophagen bei der MS eher einer Virus- oder einer Autoimmunerkrankung?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchtes Gewebe

Untersucht wurde in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Autopsiegewebe aus der Sammlung des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen. Die Gewebelöcke entstammen aus allen Bereichen des Großhirns. Bei einzelnen PatientInnen wurden auch Kleinhirn, Mesencephalon und Pons untersucht. Rückenmarkspräparate wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Für die Analyse wurde nur Läsionen der weißen Substanz verwendet.

Es wurden 26 Autopsien von MS-PatientInnen untersucht (Altersspanne: 28 - 74 Jahre; Durchschnittsalter: 53 Jahre). In Tabelle 2 sind die verfügbaren klinischen und neuropathologischen Daten der MS-PatientInnen dargestellt.

Des Weiteren wurde Autopsiegewebe von sieben PatientInnen mit NMO (Altersspanne: 16 - 77 Jahre; Durchschnittsalter: 53 Jahre) untersucht. Die verfügbaren klinischen Daten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Darüber hinaus wurden 13 PatientInnen mit PML (Altersspanne: 28 - 78; Durchschnittsalter: 48 Jahre) untersucht. Tabelle 4 enthält eine Übersicht über die klinischen Daten.

Um einen Überblick über die altersabhängige Expression der Mikroglia- und Makrophagenmarker zu erhalten, wurden insgesamt 33 Autopsien von PatientInnen ohne neuropathologische Auffälligkeiten (0 - 90 Jahre) untersucht. Tabelle 5 zeigt zusammenfassend die klinischen und neuropathologischen Daten dieser Kohorte. Es wurden ausschließlich Schnitte/Blöcke untersucht, bei denen die neuropathologischen Routineuntersuchungen keinen Hinweis auf eine entzündliche ZNS-Erkrankung ergaben.

Die Altersspanne der AutopsiepatientInnen mit MS, NMO und PML reichte von 16 - 78 Jahre. Aus diesem Grund wurden in die Vergleichsgruppe für die Analysen 16 PatientInnen im Alter von 16-83 Jahren eingeschlossen. In die Vergleichsgruppe wurden die in Tabelle 5 aufgeführten PatientInnen Nr. 16 - 31 eingeschlossen.

Tabelle 2 Klinische Daten PatientInnen mit Multipler Sklerose

Nr.	Alter/ Geschlecht	Krankheitsdauer (Jahre)	Krankheitsverlauf	Analysierte Läsionen
1	59/m	26	SPMS	aktiv; chronisch inaktiv
2	45/w	unbekannt	PPMS	aktiv
3	28/m	2,5	Unbekannt	aktiv
4	62/m	unbekannt	PPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
5	74/w	unbekannt	SPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
6	63/m	unbekannt	PPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
7	66/m	unbekannt	SPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
8	63/m	18	SPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
9	38/m	unbekannt	SPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
10	66/m	34	SPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
11	69/m	unbekannt	Unbekannt	kombiniert-aktiv/inaktiv; chronisch inaktiv
12	61/w	18	Unbekannt	kombiniert-aktiv/inaktiv; chronisch inaktiv
13	51/w	31	PPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv; chronisch inaktiv
14	49/m	unbekannt	Unbekannt	kombiniert-aktiv/inaktiv; chronisch inaktiv
15	49/m	> 4	Unbekannt	kombiniert-aktiv/inaktiv
16	57/m	12	SPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
17	60/w	14	PPMS	kombiniert-aktiv/inaktiv
18	52/m	16	SPMS	chronisch-inaktiv
19	59/f	9	PPMS	chronisch-inaktiv
20	47/f	unbekannt	Unbekannt	chronisch-inaktiv
21	53/f	unbekannt	Unbekannt	chronisch-inaktiv
22	63/w	unbekannt	Unbekannt	chronisch-inaktiv
23	55/m	unbekannt	Unbekannt	chronisch-inaktiv
24	43/w	unbekannt	Unbekannt	chronisch-inaktiv
25	41/m	unbekannt	Unbekannt	chronisch-inaktiv
26	69/m	22	SPMS	chronisch-inaktiv

w= weiblich; m = männlich; PPMS = primär progrediente Multiple Sklerose; SPMS = sekundär progrediente Multiple Sklerose

Tabelle 3 Klinische Daten PatientInnen mit Neuromyelitis optica

Nr.	Alter/ Geschlecht	Krankheitsdauer	Krankheitsverlauf	AQP4-Antikörper im Serum	Symptome
1	69/w	5 Monate	schubförmig-progredient	unbekannt	Neuritis nervi optici, Tetraparese
2	44/w	1,5 Jahre	Schubförmig	unbekannt	Neuritis nervi optici, sensibles Querschnittssyndrom
3	49/w	4 Monate	Schubförmig	unbekannt	Neuritis nervi optici, Parese der unteren Extremitäten
4	77/w	24 Jahre	schubförmig-	positiv	erhebliche Visuseinschränkung, sensible Querschnittssymptomatik
5	16/w	unbekannt	schubförmig-progredient	unbekannt	Neuritis nervi optici bds., inkomplettes Querschnittssyndrom
6	72/m	9 Monate	schubförmig-	positiv	Querschnittssyndrom Th4-C8
7	43/w	unbekannt	Unbekannt	unbekannt	unbekannt

W = weiblich; m = männlich

Tabelle 4 Klinische Daten PatientInnen mit progressiver multifokaler Leukenzephalopathie

Nr.	Alter/ Geschlecht	Grunderkrankung	Therapie der GE
1	unbekannt	Unbekannt	unbekannt
2	32/m	AIDS, HIV-Enzephalopathie	Sulfonamid-Pyrimethamin-Therapie, Cotrimoxazol, Phenoxymethylpenicillin, lymphozytäre Autovakzination
3	unbekannt	Unbekannt	unbekannt
4	35/m	AIDS, HIV-Enzephalopathie	unbekannt
5	36/unbekannt	HIV	unbekannt
6	78/w	Polyneuropathie bei IgM-Gammopathie	Prednisolon
7	63/m	CLL, Z.n.	Chemotherapie
8	unbekannt	Unbekannt	unbekannt
9	unbekannt	Unbekannt	unbekannt
10	66/m	CLL, Prostata-Ca, Magen-Ca, Alkoholabusus	unbekannt
11	unbekannt	Unbekannt	unbekannt
12	28/m	AIDS	unbekannt
13	unbekannt	Unbekannt	unbekannt

W = weiblich; m = männlich; AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrome; HIV = Humanes Immundefizienz-Virus; CLL = chronisch lymphatische Leukämie; ICH = Immunhistochemie; PCR = Polymerase-Kettenreaktion; GE = Grunderkrankung

Tabelle 5 Klinische Daten Alterskohorte KontrollpatientInnen ohne Hinweis auf entzündliche ZNS-Erkrankungen (grau hinterlegt)

Nr.	Alter/ Geschlecht	Todesursache	Neuropathologischer Befund	Untersuchte Hirnregion
1	0/w	Kindstötung	keine ZNS-Pathologie	Gyrus cinguli
2	0/w	plötzlicher Kindstod	Neugeborenenengehirn, hypoxische Nervenzellschädigung	Gyrus cinguli
3	0/w	pneumonie, Sepsis	Neugeborenenengehirn, hypoxische Nervenzellschädigung	Gyrus cinguli
4	0/w	plötzlicher Kindstod	keine-ZNS Pathologie	Frontallappen
5	0/m	Gastroenteritis	keine-ZNS Pathologie	Großhirn/ unbekannt
6	1/m	ungeklärt/ plötzlicher Tod	keine-ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
7	1/m	Unfalltod	keine-ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
8	2/w	Bronchitis, Fieber	keine-ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
9	5/m	Ertrinken	keine-ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
10	5/w	Pneumonie	keine-ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
11	7/m	Unbekannt	keine-ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
12	8/m	Ertrinken	hypoxische Nervenzellschädigung	Frontallappen
13	11/m	Eventuell Krampfanfall/Lungenblähung mit Lungenödem	Hirnödem/Kleinhirnoberwurmatrie	Frontallappen
14	11/w	Nervenzellverlust Gliose wahrscheinlich als Folge von Epilepsie	Unklar	Frontallappen
15	13/m	Unbekannt	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
16	16/m	Unbekannt	hypoxische Nervenzellschädigung/ diverse Einblutungen	Gyrus cinguli

Nr.	Alter/ Geschlecht	Todesursache	Neuropathologischer Befund	Untersuchte Hirnregion
17	18/m	Pneumonie, Multiorgan-versagen	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
18	19/w	Herzversagen	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
19	19/m	Pneumonie, Lungen-versagen	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
20	26/m	Tötungsdelikt	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
21	38/w	Brustkrebs	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
22	38/w	generalisierter Krampfanfall	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
23	39/w	Lungenembolie	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
24	40/w	Unbekannt	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
25	46/m	Suizid	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
26	57/w	Sepsis mit Pseudomonas aeruginosa	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
27	58/m	Asystolie	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
28	60/m	Sepsis, Multiorganversagen	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
29	62/m	Suizid, Kopfschuss (gesunde Hirnareale untersucht)	Intraparenchymale Einblutung; Subarachnoidalblutung	Gyrus cinguli
30	65/m	Äußeres Verbluten durch Kopfplatzwunde	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
31	83/m	Mesotheliom	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
32	90/m	Multiorganversagen	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli
33	90/w	Herzinsuffizienz	keine ZNS Pathologie	Gyrus cinguli

w= weiblich; m = männlich; ZNS = zentrales Nervensystem

2.2 Immunhistochemische Färbungen

2.2.1 Grundlagen

Durch Antikörper lassen sich Antigenstrukturen spezifisch markieren bzw. anfärben. Für die Färbungen in dieser Arbeit wurde eine indirekte Immunmarkierung genutzt. Ein Primärantikörper bindet an die Zielstruktur. Hierbei wird ein Antikörper aus einer anderen Spezies als diejenige, aus der das histologische Präparat stammt, verwendet, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern. Dann wird ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper, der sich gegen die Wirtsspezies und den Isotyp des Primärantikörpers richtet, aufgebracht. Das gebundene Enzym ist in der Lage, ein Chromogen umzusetzen, wodurch es indirekt zur Anfärbung der Zielstruktur kommt (Mulisch 2015 S.418).

Zur Verstärkung des Signals wurde die Avidin-Biotin-Technik genutzt. Der Sekundärantikörper kann enzymgekoppelt oder biotinyliert sein. Das Hühnereiweiß Avidin besitzt vier Bindungsstellen und hat eine hohe Affinität zu Biotin. Die Zugabe von Avidin zu biotinylierten Antikörpern führt zur Komplexbildung. Avidin-gekoppelte Enzyme, wie z.B. die ExtrAvidin-Peroxidase, können zur Farbentwicklung genutzt werden. Anschließend wird eine Reaktion des Enzyms mit einem Chromogen induziert, wie z.B. 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), welches unter der Zugabe von 30% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert und einen braunen Farbniederschlag bildet. Auch kleine Antigenmengen können durch diese Technik sichtbar gemacht werden (Mulisch 2015 S. 425).

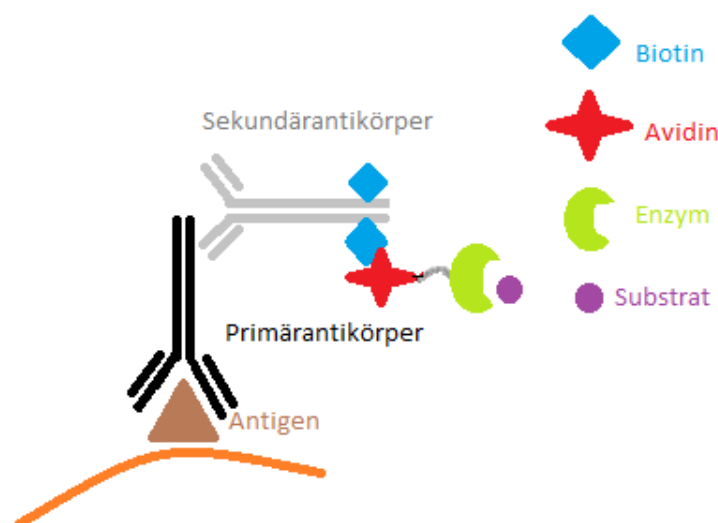


Abbildung 1 Schema der Avidin-Biotin-Complex-Technik (Mulisch 2015 modifiziert nach Abb. 19.8)

2.2.2 Verwendete Mikroglia- und Makrophagenmarker

KiM1P: Der Antikörperklon KiM1P ist gegen Cluster of Differentiation 68 (CD68) gerichtet. Er wird als Pan-Phagozytenmarker angesehen und färbt auch viele, insbesondere M1-aktivierte, Mikrogliazellen (Yang et al. 2016). Bei CD68 handelt es sich um ein intrazelluläres Glykoprotein auf der lysosomalen Membran, welches in aktiv phagozytierenden Zellen hochreguliert wird, aber auch teilweise von M2-aktivierten Mikroglia und Makrophagen exprimiert werden kann (Walker und Lue 2015). Hohe CD68-Expressionsniveaus sind mit Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen assoziiert, während niedrige Expressionsniveaus mit ruhenden, verzweigten Mikroglia assoziiert sind (Stankov et al. 2015).

TMEM119: TMEM119 ist ein Transmembranprotein und ist bei der Signalübertragung in Osteoblasten von Bedeutung (Hisa et al. 2011). Das Protein wird auch von Mikrogliazellen, aber nicht von peripheren Makrophagen, exprimiert. Es wird als Markerprotein zur Unterscheidung von Mikrogliazellen und peripheren Makrophagen diskutiert. Die Funktion von TMEM119 in Mikrogliazellen ist unbekannt. Das Protein wird unter dem Einfluss von entzündlichen Zytokinen und proinflammatorischen Lipopolysacchariden (LPS) herunterreguliert (Bennett et al. 2016; Wageningen et al. 2019).

P2Y12: P2Y12 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor für Adenosindiphosphat (ADP). Es ist in Mikrogliazellen, aber nicht in peripheren Makrophagen zu finden. Das Protein wird von homöostatischen Mikrogliazellen exprimiert. Die Funktion des Proteins ist nicht vollständig geklärt. Es gilt aber als wahrscheinlich, dass die Stimulierung durch ADP zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen führt. LPS und proinflammatorische Zytokine führen zu einer reduzierten Expression von P2Y12 auf Mikrogliazellen. Das Protein wird ebenfalls von Thrombozyten exprimiert, und seine Inhibition wird klinisch zur Thrombozytenaggregationshemmung (bspw. Clopidogrel) genutzt (Bogie et al. 2014; Moore et al. 2015).

CCR2: C-C Chemokinrezeptor Typ 2 ist ein Oberflächenprotein und gehört zu den Chemokinrezeptoren. CCR2 ist der Haupt-Chemokinrezeptor für den CC-Chemokin-Liganden 2 (CCL2), welcher auch als Monocyte-chemoattractant protein 1 (MCP1) bezeichnet wird (O'Connor et al. 2015). CCR2 ist für die Rekrutierung von Monozyten in das ZNS-Gewebe während einer immunvermittelten Entzündung von Bedeutung (Yamasaki et al. 2014).

2.2.3 Verwendete Materialien

Tabelle 6 Primärantikörper für die Immunhistochemie

Anti-gen	Marker für	Spezies	Verdün-nung	Vor-be-hand-lung	Entwick-lung	Hersteller	Artikel-nummer
CCR2	inflamma-torische Monozy-ten	Kanin-chen	1:4000	20 min 1% Triton	Dako EnVision	Abcam, Cambridge, UK	AB 32144
Kim1P/CD68	Pan-Mak-rophagen-marker	Maus	1:50	Citrat Steamer 30 min 20 min 1% Triton	DAB	zur Verfü-gung ge-stellt von Prof. Heinz-Joachim Radzun	
MBP	Myelin-basisches Protein (Myelin)	Ratte	1:200	20 min 1% Triton Citrat	Fast Blue	Abcam, Cambridge, UK	ab7349
P2Y12	Mikroglia	Kanin-chen	1:200	Steamer in Tris EDTA 30 min 20 min 1%Triton	Dako EnVision	Novus Bio-logicals, Littleton, USA	NBP2-33870
TMEM 119	Mikroglia	Kanin-chen	1:250	Citrat Steamer 30 min 20 min 1%Triton	Dako EnVision	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutsch-land	HPA051870

Tabelle 7 Sekundärantikörper/ Systeme für die Immunhistochemie

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	1:100	Jackson, Cambridge, Großbritannien	# 112-055-003
Anti-mouse IgG, biotinylated species-specific whole antibody (from sheep)	1:200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	# GERPN1001-2ml
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse		Dako Denmark A/S, Dänemark	K5007

Tabelle 8 Lösungen und Puffer für Immunhistochemie

Lösungen und Puffer	Bestandteile
10mM Citratpuffer	1L destilliertes Wasser+ 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat, auf pH6 eingestellt
TRIS buffered saline (TBS) Lösung	60g TRIS=Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan +87,6g NaCl/100ml+1M HCL Lösung auf 1:10 verdünnen mit Aqua dest.
TRIS EDTA	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA in Aqua dest.
Blockpuffer für Immunhistochemie	PBS Puffer mit 10% NGS
3-3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) Entwicklungslösung	1 ml DAB in 49 ml PBS + 20 µl 30% H ₂ O ₂
Fast Blue Lösung	25 mg Fast-Blue-Salz in 49 ml TRIS pH 8,2 + 1 ml Naphthol-AS-Mix (200mg Naphtol-Astreix Phosphatase+20 ml N,N Dimethylformamide) + 50 µl Levamisol mix (0,2408g Levamisole + 1 ml Aqua dest.)

Tabelle 9 Reagenzien und Enzyme

Reagenz	Hersteller
0.9% NaCl Lösung	B. Braun, Deutschland
Aquatex®	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin DAB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DePeX®	VWR international, Darmstadt, Deutschland
DMP-30 (2,4,6 Tris(dimethylaminomethyl)phenol)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Ethanol (rein)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
ExtrAvidin®-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fast Blue BB Salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Levamisole	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
N,N Dimethylformamid	Honeywell International Inc., Morristown, New Jersey, Vereinigte Staaten
Naphtol-Astreix Phosphatase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS)	BioWest S.A.S, Nuaillé, Frankreich
Phosphate buffered saline 10x (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton® X-100	MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, USA
Xylol	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Zitronensäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 10 Verwendete Programme und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Lichtmikroskop BX41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Microsoft Excel 16	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Objektive (4-fach bis 40-fache Vergrößerung)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
12,5 Megapixel CCD-Kamera DP71	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Okular mit und ohne Zählgitter (10-fache Vergrößerung)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

2.2.4 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Im folgenden Abschnitt werden die immunhistochemischen Färbungen für CCR2, KiM1P, TMEM119 und P2Y12 dargestellt. Im Abschnitt 2.2.4.2 wird die zur Läsionsbestimmung genutzte Doppelfärbung mit MBP beschrieben. Abweichende Behandlungsschritte oder Vorbehandlungen werden im Text beschrieben und sind zusätzlich in Tabelle 6 aufgeführt.

Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden in einer Dicke von 5 µm geschnitten, auf Objektgläsern fixiert und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet. Vor dem Beginn der eigentlichen Färbung wurden die Schnitte über Nacht in einen Wärmeschrank bei 58 °C gestellt. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zunächst in Xylol für 10min gestellt. Daraufhin wurden die Schnitte in ein Xylol-Isopropanol-Gemisch übertragen und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten rehydriert. Zum Schluss wurde die Rehydrierung in Aqua dest. mindestens 5 Minuten lang durchgeführt. Durch die Fixierung der Gewebe werden die Proteine (Antigene) miteinander quervernetzt und teilweise auch modifiziert, sodass sie für die Antikörper nicht mehr leicht zugänglich sind. Um die Epitope der Antigene für die Primärantikörper zugänglicher zu machen, erfolgte in einigen Fällen eine Hitze-Vorbehandlung mit Citrat oder TRIS-EDTA-Puffer.

Die Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene erfolgte für KiM1P, TMEM119 und die Färbung des Myelin-basischen Proteins (MBP) mit Hilfe von Citratpuffer (Tabelle 7) 10mM

bei einem pH=6,0 in einem *Steamer* (Dampfgarer) für 30 Minuten. Für die P2Y12-Färbung wurden die Schnitte mit Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Ethylendiamintetraessigsäure (TRIS-EDTA) (Tabelle 7) 30 Minuten lang im *Steamer* erhitzt. Für den CCR2-Antikörper erfolgte keine spezielle Vorbehandlung.

Nachdem die Präparate abgekühlt waren, wurden sie mit destilliertem Wasser gespült und in einen Puffer aus Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) gestellt. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte 20 Minuten lang in 3% H₂O₂/PBS-Lösung gestellt und im Anschluss mehrfach mit PBS gespült. Zur Verbesserung der Antikörperpenetration wurden die Schnitte mit 1% Triton-X-100-Lösung für 20 min behandelt.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Präparate für 30 Minuten in einer Lösung von 10% Normalem Ziegen Serum (*Normal Goat Serum*=NGS) in PBS bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit 10% NGS in PBS-Lösung. Ohne anschließendes Spülen wurden die entsprechenden Primärantikörper anti-CCR2 (1:4000), KiM1P (1:50), anti-P2Y12 (1:200) oder anti-TMEM119 (1:250) aufgebracht und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte entweder über Biotin-konjugierte Sekundärantikörper in Kombination mit ExtrAvidin-Peroxidase und DAB oder mit dem Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse.

Die klassische DAB-Peroxidase-Färbung wurde für den Antikörper KiM1P angewendet. Nach gründlichem Spülen mit PBS wurde der sekundäre biotinylierte Antikörper Anti-Maus-IgG in einer Konzentration von 1:200 in 10% NGS aufgetragen und für 60min bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an das Aufbringen des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte erneut mit PBS gespült. Daraufhin wurde Avidin-Peroxidase in einer Konzentration von 1:1000 in 10% NGS/PBS Lösung aufgebracht und für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit PBS.

Nach der Spülung wurden die Schnitte in eine Lösung aus 1 ml konzentriertem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) -Tetrahydrochlorid und 49 ml PBS eingestellt. 20 µL H₂O₂ 30% wurde als Reaktionsbeschleuniger hinzugegeben. Die an den Biotin-konjugierten

Sekundärantikörper mittels Avidin gebundene Peroxidase oxidiert das DAB, wodurch ein brauner Farbniederschlag sichtbar wird. Die Schnitte wurden ca. 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einstellen in entionisiertes Wasser gestoppt. Bei Kontrollpatienten erfolgte keine weitere Färbung, bei MS-, NMO- und PML-Patienten erfolgte eine zweite immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen das Myelin-basische Protein (MBP), um die Entmarkungsläsionen zu lokalisieren. Die unterschiedlichen anschließenden Schritte für die Einzelfärbungen und die Doppelfärbungen werden in den Unterpunkten 2.2.4.1 (Kontrollen) und 2.2.4.2 (PML, NMO, MS) erläutert.

Die Entwicklung mittels des EnVision-Kits (Dako) wurde für die Färbung der Antikörper CCR2, P2Y12 und TMEM119 angewandt. Sie beruht ebenfalls auf einer Peroxidase-basierenden Oxidation von DAB. Das EnVisionKit kann für Primärantikörper aus Kaninchen und Mäusen verwendet werden. Nach dem Aufbringen des Primärantikörpers und dem anschließenden Spülen wurden 100 µL der Komponente A (*HRP Rabbit and Mouse*) des EnVision-Kits aufgebracht. Die Inkubation mit der Lösung A erfolgte eine halbe Stunde lang. Anschließend wurde eine Lösung aus 1 ml Komponente B (Substrat-Puffer) und 20 µL Komponente C (DAB + Chromogen) hergestellt. 100 µL dieser Lösung wurden auf die Schnitte gegeben. Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop entwickelt und nach Bildung eines Farbniederschlags (ca. 10 min) und vor dem Auftreten einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch das Einstellen und Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Bei den MS-, PML- und NMO-Schnitten erfolgte daraufhin die zweite immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen MBP. Die unterschiedlichen anschließenden Schritte für die Einzelfärbungen und die Doppelfärbungen werden in den Unterpunkten 2.2.4.1 (Kontrollen) und 2.2.4.2 (PML, NMO, MS) erläutert.

2.2.4.1 Einzelfärbung (Kontrollen)

Die Schnitte wurden nach gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser mit Mayers Häma-launlösung für 30 Sekunden kerngegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gespült und zur Differenzierung in 1% HCl in Isopropanol gedippt. Darauf folgte ein 10-minütiges Spülen mit Leitungswasser, anschließend wurden die Schnitte in der Alkoholreihe aufsteigend von destilliertem Wasser bis zu Xylol für je 5 Minuten eingestellt. Die Schnitte wurden aus dem Xylol heraus mit Depex Mounting Medium

eingedeckelt. Die mit Fast Blue gefärbten Schnitte wurden aus dem wässrigen Medium mit Aquatex eingedeckelt.

2.2.4.2 Doppelfärbung MBP (Demyelinisierende Erkrankungen)

Zum Sichtbarmachen von Myelin wurde ein zweiter Primärantikörper gegen MBP (aus der Ratte) in der Konzentration 1:100 aufgebracht und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Als Spül- und Trägerlösung wurde TBS verwendet. Nach der Inkubation des Primärantikörpers über Nacht und der anschließenden Spülung mit TBS wurden 100 µL des Sekundärantikörpers Alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziege-anti-Ratte IgG (Verdünnung: 1:200 in TBS) aufgebracht. Der Sekundärantikörper wirkte für eine Stunde auf die Schnitte ein. Anschließend erfolgte ein Waschschrift der Schnitte mit TBS. Danach wurden die Schnitte in die Fast Blue-Lösung gestellt. Das Chromogen Fast Blue BB Salz wird von der alkalischen Phosphatase umgesetzt und bildet einen blauen Farbniederschlag. Die Reaktion wurde unter mikroskopischer Kontrolle und vor der Bildung eines unspezifischen Hintergrunds durch das Einstellen in destilliertes Wasser gestoppt. Nach gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Kernfärbung mit Mayers Hämalaunlösung für 30 Sekunden. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gespült und zur Differenzierung in 1% HCl in Isopropanol gedippt.

Die mit Fast Blue gefärbten Schnitte wurden aus dem wässrigen Medium mit Aquatex eingedeckelt.

2.3 Klassifikation der Läsionen

Sowohl bei der MS als auch bei der NMO gibt es chronische Krankheitsverläufe und verschiedene Aktivitätsgrade der Läsionen. Zu Beginn der Arbeit wurde die Aktivität der Läsionen von erfahrenen Neuropathologen beurteilt und Gruppen gebildet. Die PML verläuft klinisch oft rapide und fulminant, auf eine Differenzierung von Aktivitätsstadien wurde in der vorliegenden Arbeit daher verzichtet.

Die Einstufung und Aktivitätsbeurteilung der Läsionen erfolgt in dieser Arbeit mithilfe der immunhistochemischen Markierung von KiM1P-positiven Makrophagen/aktivierten Mikrogliazellen und der immunhistochemischen Reaktion gegen MBP. Mittels der MBP-Darstellung konnten die Läsionsgrenzen (= Grenze der Entmarkung) dargestellt werden. KiM1P wurde genutzt, um das Verteilungsmuster und die Morphologie der Mikroglia und

Makrophagen zu beurteilen. Außerdem waren dadurch aktiv phagozytierende Zellen mit MBP-positiven Myelinabbauprodukten identifizierbar.

2.3.1 MS-Läsionen

Die MS-Läsionen wurden in dieser Arbeit in drei Stadien eingeteilt: aktive Läsionen, kombiniert-aktive/inaktive Läsionen und inaktive Läsionen entsprechend der Klassifikation von Kuhlmann et al. 2017. Die Klassifikation der MS Stadien ist im Anhang in Tabelle 13 dargestellt.

2.3.1.1 Aktive Läsionen

Diese Läsionen wiesen im Zentrum zahlreiche KIM1P-positive Phagozyten mit schaumzelliger Morphologie auf. Die Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen in diesen Läsionen enthielten teilweise phagozytierte Myelinbestandteile wie MBP und Proteolipid-Protein (PLP) und wurden damit als aktiv demyelinisierend eingestuft. Aktive Läsionen zeigten im Gegensatz zu kombiniert-aktiv/inaktiven Läsionen Mikroglia/Makrophagen mit schaumzelliger Morphologie sowohl am Läsionsrand als auch im Läsionszentrum in einer hohen Dichte. Aktive Läsionen können noch weiter in frühaktive demyelinisierende Läsionen und spätaktive demyelinisierende Läsionen unterteilt werden (Lucchinetti et al. 2000; Kuhlmann et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit sind die Läsionen zumindest spätaktiv, charakterisiert durch Nachweis von phagozytiertem MBP oder PLP.

2.3.1.2 Kombiniert-aktive/inaktive Läsionen mit aktiver Demyelinisierung

Dieser Läsionstyp ist durch ein demyelinisiertes, hypozelluläres Läsionszentrum und einen Rand mit aktivierten Mikroglia und Makrophagen an der Läsionsgrenze gekennzeichnet. Die in diese Gruppe eingestuften Läsionen wiesen am Läsionsrand vereinzelte schaumzellige MBP-positive Makrophagen und Mikrogliazellen auf und wurden aufgrund dessen als aktiv demyelinisierend eingestuft. Im Gegensatz zu aktiven Läsionen sind im Zentrum dieser Läsionen nur wenige Makrophagen und Mikrogliazellen zu finden. Diese Läsionen werden auch als „*smoldering*“ (schwelende) Läsionen bezeichnet (Lucchinetti et al. 2000; Kuhlmann et al. 2017).

2.3.1.3 Chronisch-inaktive demyelinisierte Läsionen

Dieser Läsionstyp zeichnet sich durch ein hypozelluläres und demyelinisiertes Läsionszentrum aus und weist häufig stark hyalinisierte Gefäße auf. Des Weiteren ist eine dichte Fasergliose zu beobachten. Die Läsionen zeigen zum Teil remyelinisierte Areale (v.a. randständig). Die Mikroglia- und Makrophagendichte im Läsionszentrum ist auch im Vergleich zur NAWM reduziert (Stadelmann et al. 2011; Kuhlmann et al. 2017).

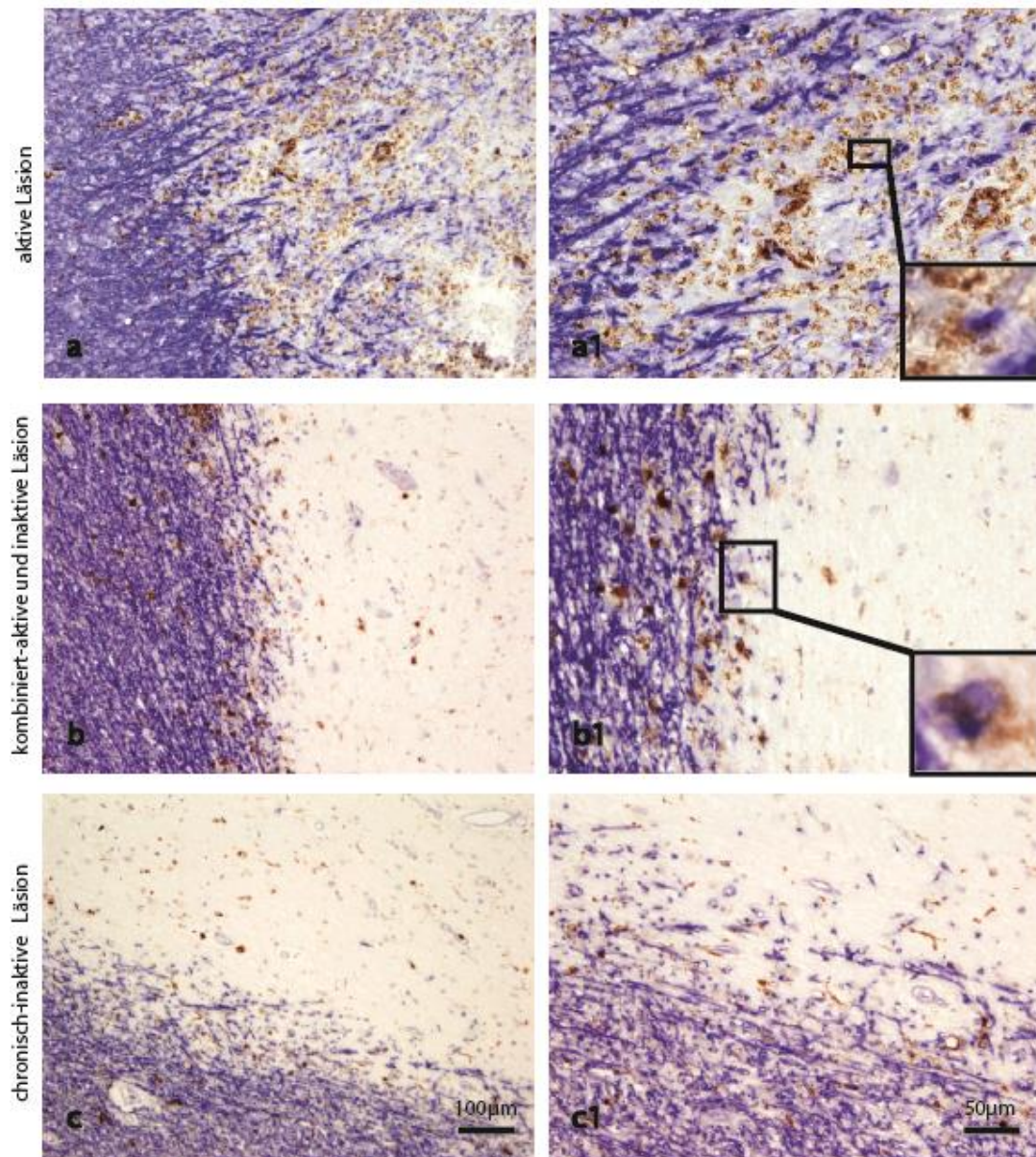


Abbildung 2 Läsionstypen bei der Multiplen Sklerose. Zeile a: KiM1P (Phagozyten; braun)- und MBP (Myelin-basisches Protein; blau)-Doppelfärbung einer aktiven Läsion mit zahlreichen schaumzelligen Phagozyten, die MBP-positive Abbauprodukte aufweisen. **Zeile b:** KiM1P/MBP Doppelfärbung einer kombiniert aktiv/inaktiven Läsion mit phagozytierendem Randsaum und einzelnen Phagozyten mit MBP-positiven Abbauprodukten. **Zeile c:** Chronisch-inaktive Läsion ohne aktivierte Phagozyten. Die rechte **Zeile (1)** ist eine Vergrößerung der linken Zeile; Maßstab links entspricht 100µm; Maßstab rechts entspricht 50µm

2.3.2 NMO-Läsionen

NMO-Läsionen lassen sich in frühe und ältere bzw. chronische Läsionen einteilen.

Das Hauptmerkmal der akuten NMO-Läsionen sind der Verlust von Astrozyten und AQP4-Immunreaktivität bei abgeblasstem, aber im Wesentlichen noch erhaltenem Myelin. In späteren Läsionsstadien zeigen sich ein ausgeprägter Verlust an Oligodendrozyten und eine Demyelinisierung. Das Immuzellinfiltrat in NMO-Läsionen besteht dominierend aus Makrophagen, eingestreuten Lymphozyten sowie auch polymorphkernigen Zellen einschließlich eosinophiler Granulozyten. Polymorphkernige Granulozyten und MRP14-MBP-doppelt-positive Makrophagen sind charakteristisch für frühe NMO-Läsionen. Zusätzlich kommt es zu einer perivaskulären Ablagerung von Immunglobulinen und aktiviertem Komplement an den Astrozytenendfüßen. Die AQP4-Immunreaktivität ist in frühen NMO-Läsionen stärker reduziert als die des sauren Gliafaserproteins (GFAP). GFAP ist ein Intermediärfilamentprotein, welches als Marker für Astrozyten genutzt wird. Darüber hinaus wurden verdickte und hyalinisierte Blutgefäße beschrieben. Es kommt in NMO-Läsionen zu einem sekundären Oligodendrozytenverlust. Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen sind in frühen NMO-Läsionen deutlich reduziert (Lucchinetti et al. 2002; Stadelmann et al. 2019).

In chronischen NMO-Läsionen ist ebenfalls ein Verlust von Astrozyten zu beobachten. In den Läsionen sind Makrophagen und Mikrogliazellen zu finden, im Gegensatz zu den frühen Läsionen exprimieren diese kein MRP14. Polymorphkernige Granulozyten sind in chronischen Läsionen ebenfalls nicht zu finden (Misu et al. 2007). Auch Axone und Neurone sind in chronischen NMO-Läsionen häufig reduziert (Parratt und Prineas 2010). Häufig sind in chronischen NMO-Läsionen Zeichen der Astrozyten-Repopulation zu sehen, in Form von uni- und bipolaren GFAP-positiven Zellen. Im Gegensatz dazu gibt es kaum Hinweise auf eine Repopulation und Remyelinisierung mit Oligodendrozyten. Es kann aber zu einer umfangreichen Schwann-Zell-Remyelinisierung von ZNS-Axonon kommen (Stadelmann et al. 2019). In frühen, aktiven Läsionen sind die Axone noch relativ gut erhalten, während es in späteren Stadien zum axonalen Verlust kommt (Lucchinetti et al. 2002).

Vier der in der vorliegenden Studie untersuchten NMO-PatientInnen wiesen Läsionen im Bereich des Gehirns auf. Die Rückenmarks-Läsionen wurden, wie oben bereits erwähnt, im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Aufgrund der geringen Gruppengröße und des

ähnlichen Läsionsstadiums wurden die PatientInnen alle in einer Gruppe zusammengefasst.

2.4 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus, BX41) unter Zuhilfenahme eines Zähllokulars, welches ein Zählgitter bestehend aus mehreren gleichgroßen Quadraten besitzt. Aufgrund der komplexen Mikroglia/Makrophagen-Morphologie erfolgte die Auszählung visuell bei einer 400-fachen Vergrößerung (Objektiv mit 40-facher und Okular mit 10-facher Vergrößerung). In dieser Vergrößerung entsprach 1 Zählkästchen, ausgemessen mit einem Objektmikrometer, $0,0625\text{mm}^2$. Die Daten wurden in Zellen pro mm^2 umgerechnet. Hierzu wurde die Formel $(\text{Zellzahl/gezählte Kästchen}) \cdot 16 = \text{Zellen pro } \text{mm}^2$ verwendet. Es wurden die mittels immunhistochemischer DAB-Färbung markierten Mikroglia- und Makrophagenzellen ausgewertet.

Es wurden für jede Kontrolle mindestens ein und wenn vom Material her möglich zwei unterschiedliche Bereiche in der weißen Substanz ausgewertet. In jedem Bereich wurden 20 Zählgitter analysiert. Aus den Werten wurde ein Mittelwert pro PatientIn gebildet und dieser zur statistischen Analyse genutzt.

Die Läsionsbereiche wurden anhand der immunhistochemischen Reaktion von MBP definiert. Es wurden die Bereiche Läsionsmitte (*lesion center* = LC), Läsionsrand (*lesion border* = LB), die die Läsion bzw. die Plaque umgebende weiße Substanz (*periplaque white matter* = PPWM) und die normal erscheinende weiße Substanz (*normal appearing white matter* = NAWM) getrennt betrachtet. Abbildung 3 zeigt die Einteilung der Bereiche am Beispiel einer MS-Läsion. Um Auszählfehler zu minimieren, wurden möglichst viele Zählgitter (bis zu 20 pro Bereich, also bis $1,25\text{ mm}^2$) ausgezählt. Bei kleineren Läsionen oder defektem Material konnten teilweise nur kleinere Gitterzahlen (Minimum 4, also $0,25\text{ mm}^2$) ausgewertet werden. Es erfolgte, wie oben beschrieben, die Darstellung der erhobenen Daten in Zellen pro mm^2 . Bei einigen Autopsien waren mehrere Läsionen verfügbar. Hier wurden die Läsionen einzeln ausgewertet und im Anschluss aus allen Präparaten der arithmetische Mittelwert für einen Patienten gebildet.

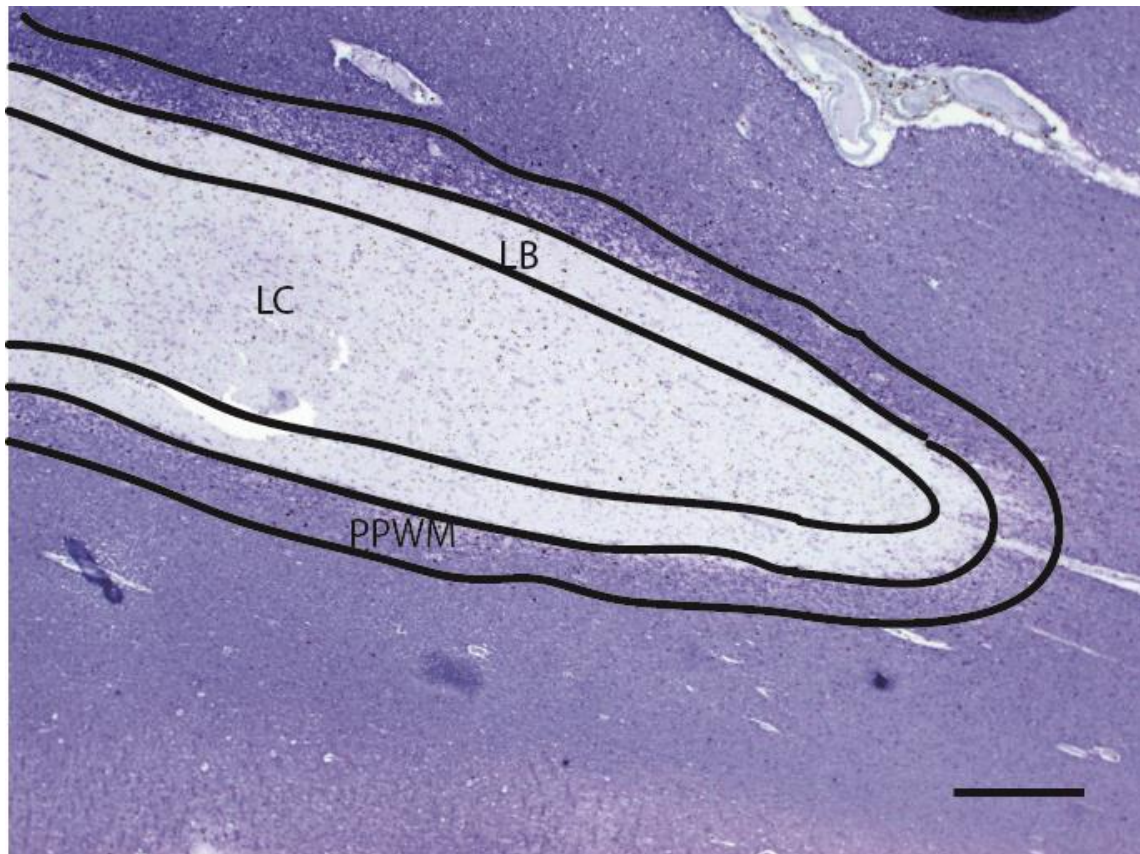


Abbildung 3 Bestimmung der Läsionsareale am Beispiel einer chronisch-inaktiven MS-Läsion. KiM1P (Phagozyten; braun)- und MBP (Myelin-basisches Protein; blau)-Doppelfärbung; Für die quantitative Auswertung der hier untersuchten Entmarkungsläsionen wurden jeweils verschiedene Läsionsareale definiert: Läsionsmitte (Lesion center = LC); Läsionsrand (Lesion border=LB); Periplaque weiße Substanz (Periplaque white matter=PPWM). Messbalken entspricht 500 µm.

In Abbildung 3 wurden schematisch die Läsionenbereiche dargestellt. Die Abbildung entspricht nicht den Maßstäben. Die Regionen wurden wie folgt definiert:

NAWM: Die NAWM wurde als Bereich mit erhaltener MBP-Färbung definiert, die mindestens einen Abstand von 1 cm zu einer Läsion hatte.

PPWM: Als PPWM wurden alle Bereiche definiert, die bei 400-facher Vergrößerung nicht weiter als 2 Zählgitterabstände von der Läsion entfernt auf dem MBP-positiven Rand lagen.

Läsion: Insbesondere die Läsionen von NMO- und PML-Patienten waren häufig zu klein, um LB und LC getrennt voneinander auszuwerten. Deshalb wurden kleine Läsionen einheitlich ausgewertet und bei den großen Läsionen der Mittelwert aus LB und LC gebildet.

LB: Als LB wurden alle Bereiche gewertet, die innerhalb der Läsion bei 400-facher Vergrößerung nicht weiter als 2 Zählgitter vom MBP-positiven Rand entfernt lagen.

LC: Als LC wurden die Bereiche innerhalb der Läsion gezählt, die bei 400-facher Vergrößerung mehr als 2 Zählgitter vom MBP-positiv-markierten Läsionsrand entfernt lagen.

2.5 Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung und statistische Analyse erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6®.

Die erhobenen Daten wurden zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Da viele Gruppen nicht normalverteilt waren, wurde für Gruppenvergleiche in der gesamten Arbeit mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Test für nicht parametrische Daten ausgewertet.

Alle Daten wurden in dieser Arbeit in Box-Plot-Diagrammen dargestellt. Die Diagramme enthalten Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert. Ein p-Wert $\leq 0,01$ wurde als hoch-signifikant und ein p-Wert $\leq 0,001$ als sehr hoch signifikant definiert.

Von einigen Autopsien war nicht genügend Material vorhanden, um alle Färbungen durchzuführen zu können. In einigen Fällen konnten aufgrund einer Ablösung der Gewebeschnitte oder einer zu starken Hintergrundfärbung einzelne Bereiche nicht ausgewertet werden. Unter den Graphen im Ergebnisteil sind die entsprechenden Gruppengrößen (n) angegeben.

2.6 Ethik

Der Antrag zu der vorliegenden Arbeit wurde am 14.2.2019 von der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen auf Unbedenklichkeit geprüft und beraten. Die Kommission hatte keine ethischen und rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung des Projekts (Antragsnummer: 8/2/19).

3 Ergebnisse

3.1 Altersabhängige Expression von Makrophagen- und Mikroglia markern

Es ist wenig zur Expression der untersuchten Mikroglia- und Makrophagen-Marker in Bezug auf den Altersverlauf bekannt. Im ersten Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit die weiße Substanz von PatientInnen ohne entzündliche ZNS-Veränderungen untersucht, um die Expression der Mikroglia- und Makrophagen-Marker in der weißen Substanz im Verlauf des Lebens zu beurteilen. Es wurden Immunhistochemische Einzelfärbungen mit DAB für KiM1P, P2Y12, TMEM119 und CCR2 ausgewertet.

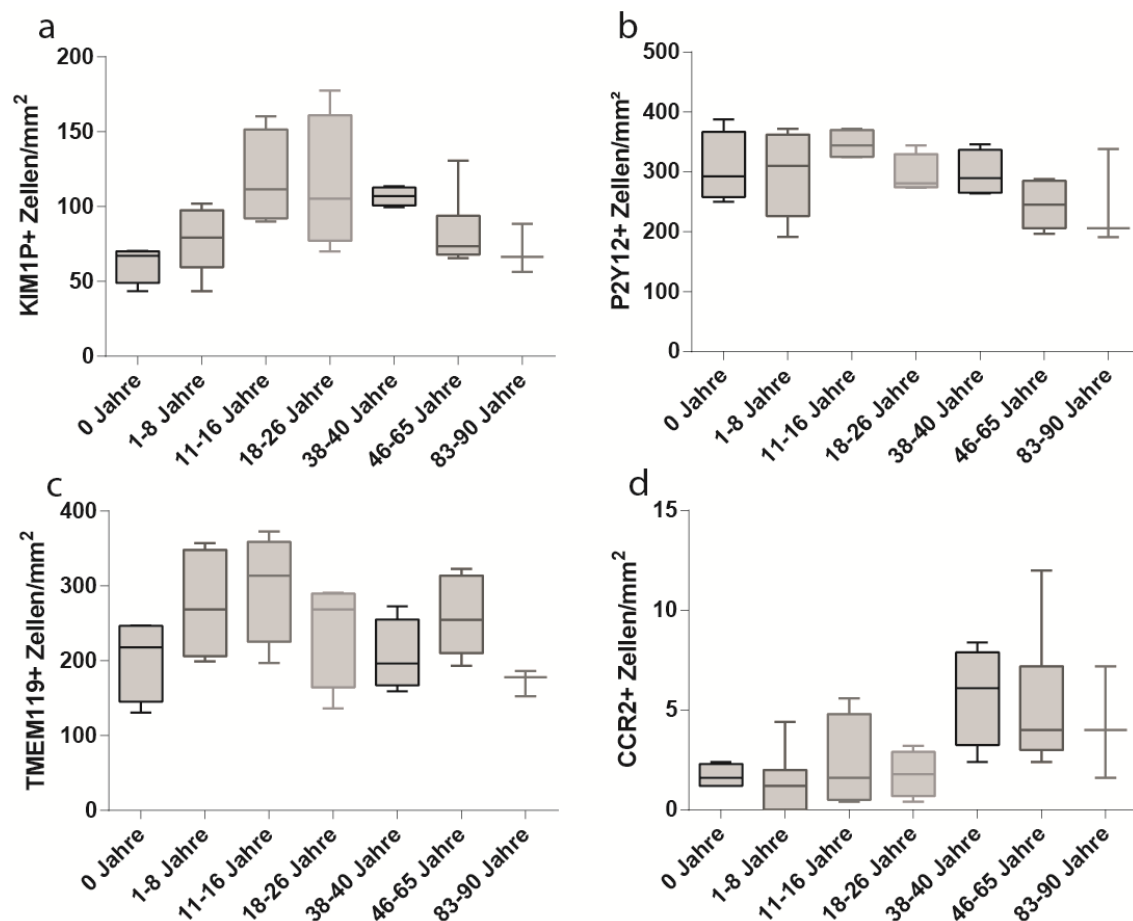


Abbildung 4 Expression von Mikroglia- und Makrophagen-Markern im Verlauf des Lebens in der weißen Substanz in ZNS-gesunden PatientInnen. Die Quantifizierung erfolgte anhand immunhistochemischer Einzelfärbungen (DAB). **(a)** Dichte KiM1P-positiver Mikroglia und Makrophagen; **(b)** P2Y12-positive Mikrogliazellen **(c)** TMEM119-positive Mikrogliazellen und **(d)** CCR2-positive periphere inflammatorische Makrophagen (Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede). Gruppengrößen: 0 Jahre n = 4, 1 - 8 Jahre n = 7, 11 - 16 Jahre n = 4, 18 - 26 Jahre n = 4, 38 - 40 Jahre n = 4, 46 - 65 Jahre n = 6, 83 - 90 Jahre n = 3

Die Quantifizierung der Markerproteine KiM1P (Mikroglia und periphere Makrophagen), P2Y12 (homöostatische Mikroglia), TMEM119 (Mikroglia) und CCR2 (periphere entzündliche Makrophagen) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen.

Für den Vergleich mit den Entmarkungserkrankungen wurden aus der Kohorte altersentsprechende Kontrollen ausgewählt. Die Auswahl dieser Vergleichsgruppe orientierte sich am Alter der PatientInnen aus den erkrankten Vergleichsgruppen (jüngste NMO-Patientin: 16; ältester PML-Patient 78). In die Vergleichsgruppe ohne Hirnerkrankungen wurden Fälle im Alter von 16 - 83 Jahren eingeschlossen.

In der Vergleichsgruppe lag die Dichte der KiM1P-positiven Mikrogliazellen und Makrophagen im Median bei 99,2 Zellen/mm², die 25. Perzentile bei 70,9 Zellen/mm² und die 75. Perzentile bei 113,1 Zellen/mm². Für die TMEM119-positiven Mikrogliazellen ergab die Analyse einen Median von 237,6 Zellen/mm², eine 25. Perzentile von 191,1 Zellen/mm² und eine 75. Perzentile von 289,8 Zellen/mm². Der Median für die P2Y12-positiven Mikrogliazellen lag bei 275,0 Zellen/mm², die 25. Perzentile lag bei 230,7 Zellen/mm² und die 75. Perzentile bei 304,2 Zellen/mm². Die Dichte der CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten war in der Kontrollgruppe mit einem Median von 3,2 Zellen/mm², einer 25. Perzentile von 2,1 Zellen/mm² und einer 75. Perzentile von 5,8 Zellen/mm², äußerst niedrig. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse fällt auf, dass KiM1P, welches häufig als Panphagozytenmarker beschrieben wird, in Kontrollen weniger Zellen anfärbt als selektive Mikrogliazellmarker (TMEM119 und P2Y12) und damit auf residenten, homöostatischen Mikrogliazellen offensichtlich geringer exprimiert wird. In den weiteren Abschnitten wird diese Vergleichsgruppe als Kontrollen bezeichnet. Die Daten sind in Abbildung 4 dargestellt.

3.2 Expression von Mikroglia- und Makrophagenmarkern innerhalb der entzündlich-entmarkenden Läsionen von Entmarkungserkrankungen

3.2.1 KiM1P-positive Zellen in entzündlich-entmarkenden Läsionen

Die Dichte der KiM1P-positiven Mikrogliazellen und Makrophagen innerhalb der Läsionen war bei der NMO (Median: 480,6 Zellen/mm²) und der PML (Median: 330,0 Zellen/mm²) im Vergleich zu Kontrollen (Median: 99,2 Zellen/mm²) signifikant erhöht (NMO $p \leq 0,01$; PML $p \leq 0,001$; Abbildung 6). Unter den MS-Läsionen wiesen nur die aktiven Fälle (Median: 555,2 Zellen/mm²) eine signifikant höhere Dichte als die Kontrollfälle auf ($p \leq 0,01$; Abbildung 6). Dies stimmt mit der im Methodenteil angeführten Läsionseinteilung der MS überein, wonach die Dichte der KiM1P-positiven Zellen in kombiniert-aktiven/inaktiven Läsionen (Median: 140,7 Zellen/mm²) und chronisch-inaktiven Läsionen im Läsionszentrum (Median: 92,2 Zellen/mm²) sinkt. In allen aktiv demyelinisierenden Läsionen wurde - unabhängig von der Ursache der Demyelinisierung - eine erhöhte Dichte KiM1P-positiver Zellen festgestellt.

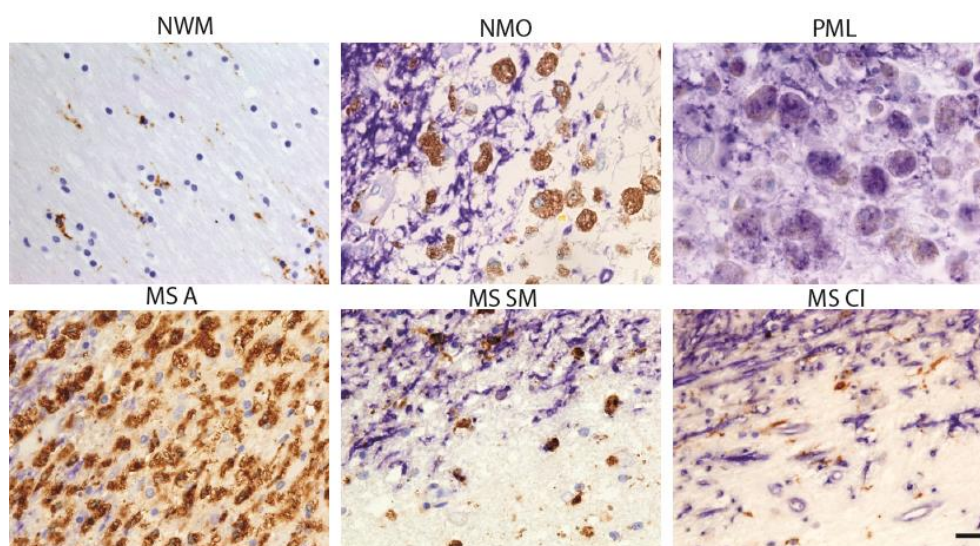


Abbildung 5 KiM1P-positive Zellen in entzündlich-entmarkenden Läsionen. KiM1P-Immunohistochemie (braun) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) in der normalen weißen Substanz (*Normal white matter* = NWM) von Kontrollen. Doppelimmunhistochemie von KiM1P (braun) und MBP (blau) mit Hämalaun-Kerngegenfärbung (blassblau) in PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und in aktiven (A), kombiniert aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM) und chronisch-inaktiven (CI) Läsionen von PatientInnen mit Multipler Sklerose (MS). Messbalken entspricht 20 μm .

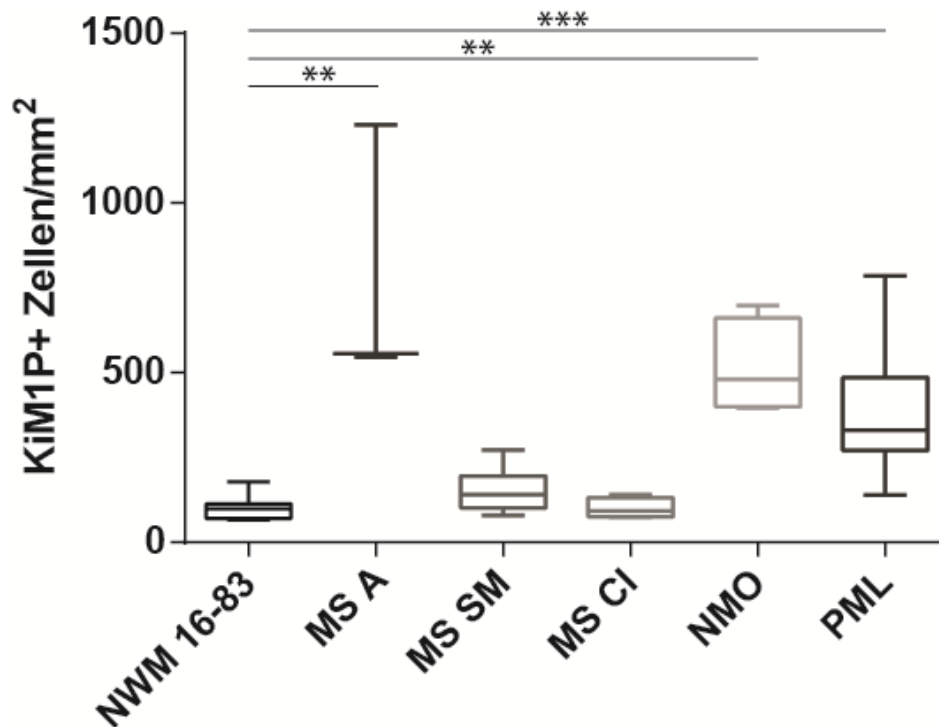


Abbildung 6 Dichte KiM1P-positiver Phagozyten in entzündlich-entmarkenden Läsionen. Quantifizierung von KiM1P-positiven Phagozyten in der weißen Substanz von Kontrollen ohne ZNS-Pathologie, Alter 16-83 Jahre (NWM = *normal white matter*, n = 16), in aktiven (A, n = 3), kombiniert-aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM, n = 8) und chronisch-inaktiven (CI, n = 4) Multiple Sklerose-Läsionen (MS), Neuromyelitis optica-Läsionen (NMO, n = 4) und Läsionen bei progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML n = 11); (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.2.2 P2Y12-positive Zellen in entzündlich-entmarkenden Läsionen

Die Quantifizierung der P2Y12-positiven Mikrogliazellen innerhalb der Läsionen zeigte im Vergleich zu Kontrollen (Median: 275,0 Zellen/mm²) eine signifikant niedrigere Dichte bei der PML (Median: 6,4 Zellen/mm²; p ≤ 0,001; Abbildung 8). Die NMO-Läsionen zeigten (Median: 99,9 Zellen/mm²) im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied. Kombiniert-aktive/inaktive (Median: 98,7; p ≤ 0,05) und chronisch-inaktive (Median: 107,6; p ≤ 0,05; Abbildung 8) MS-Läsionen wiesen ebenfalls eine signifikante Dichtereduktion im Vergleich zu Kontrollen auf. Bei den aktiven MS-Läsionen ließ sich eine Dichtereduktion nachweisen, die nicht statistisch signifikant war.

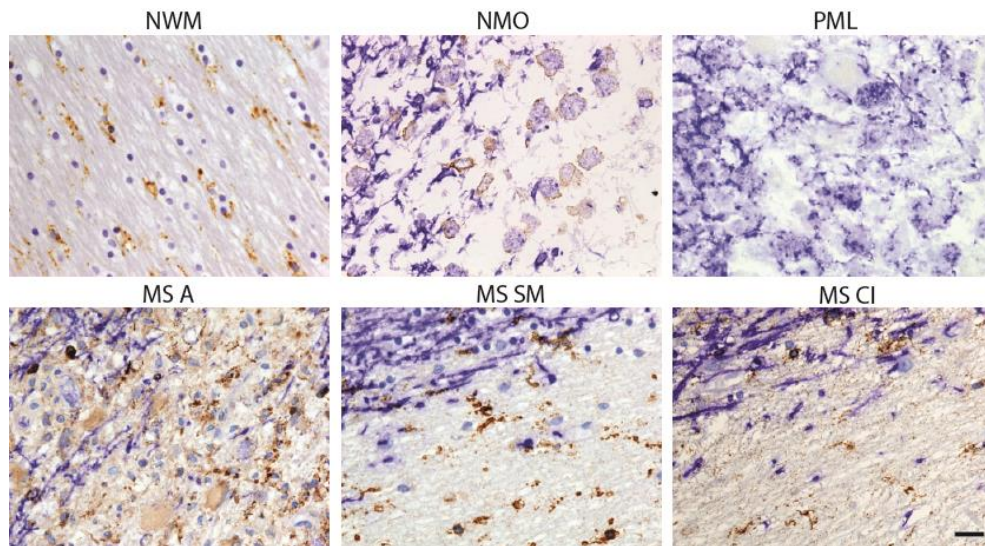


Abbildung 7 P2Y12-positive Mikroglia in entzündlich-entmarkenden Läsionen. P2Y12-Immunhistochemie (braun) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) in der weißen Substanz von Kontrollen (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von P2Y12 (braun) und basischem Myelinprotein (MBP) (blau) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und aktiver (A), kombiniert aktiv/inaktiver (*smoldering* = SM) und chronisch-inaktiver (CI) Multipler Sklerose (MS). Messbalken entspricht 20 μm .

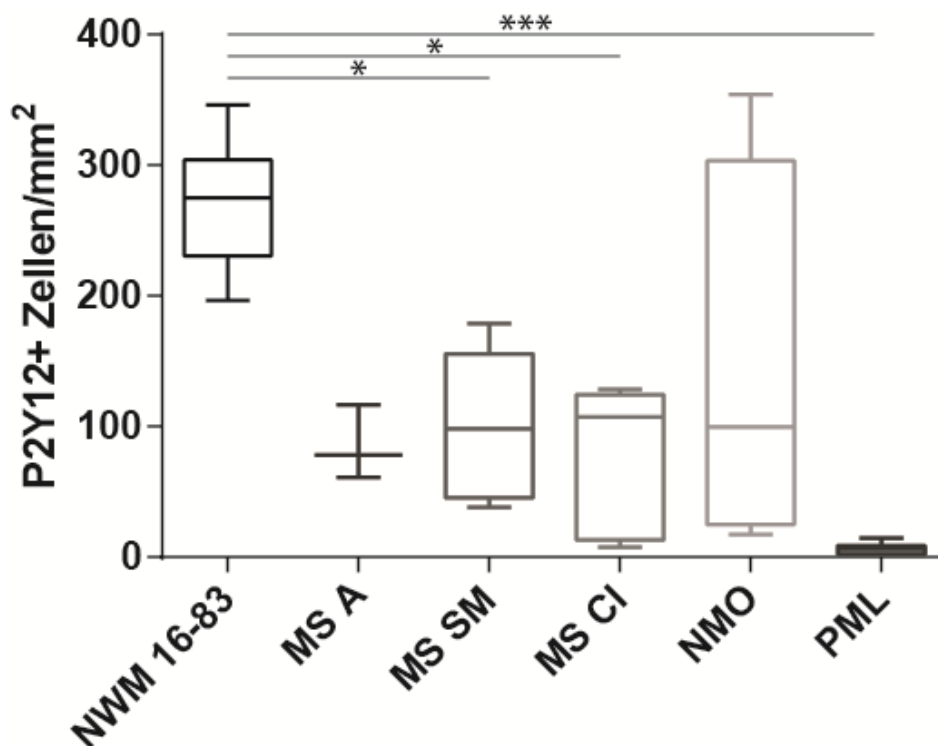


Abbildung 8 Dichte P2Y12-positiver Mikrogliazellen in Läsionen entzündlicher ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung von P2Y12-positiven Mikrogliazellen in der weißen Substanz von Kontrollen, Alter 16 - 83 (NWM = *normal white matter*, $n = 16$), von aktiven (A, $n = 3$), kombiniert-aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM, $n = 11$) und chronisch-inaktiven (CI, $n = 5$) Multiple Sklerose-Läsionen (MS), Neuromyelitis optica-Läsionen (NMO, $n = 4$) und Läsionen bei progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, $n = 9$); (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.2.3 TMEM119-positive Mikroglia in entzündlich-entmarkenden Läsionen

Die TMEM119-positiven Mikrogliazellen waren in Läsionen von NMO- und PML-PatientInnen in sehr geringer Dichte zu finden. Bei MS-PatientInnen zeigte sich von aktiv über kombiniert-aktiv/inaktive bis hin zu chronisch-inaktiven Läsionen eine Abnahme der TMEM119-positiven Zellen. In allen Stadien von MS-Läsionen zeigte sich eine Reduktion der Dichte TMEM119-positiver Zellen im Vergleich zu Kontrollen. Die Dichte der TMEM119-positiven Zellen nahm mit der Aktivität von aktiven (Median: 110,8 Zellen/mm²) über kombiniert-aktiv/inaktive Läsionen (Median: 51,6 Zellen/mm²) zu chronisch-inaktiven Läsionen (Median: 4,8 Zellen/mm²) ab. Für die letzten beiden Läsionstypen ergab die statistische Analyse eine signifikante Reduktion der Dichte der TMEM119-positiven Zellen im Vergleich zu Kontrollen (kombiniert-aktiv/inaktiv $p \leq 0,001$; chronisch-inaktiv $p \leq 0,001$; Abbildung 10). Auch die NMO- und PML-Läsionen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Dichte von TMEM119-positiven Zellen auf (NMO $p \leq 0,05$; PML $p \leq 0,01$; Abbildung 8). Der Median lag bei NMO- (14,5 Zellen/mm²) und PML-Läsionen (30,8 Zellen/mm²) deutlich unterhalb des Medians der Kontrollgruppe (Median: 237,6 Zellen/mm²).

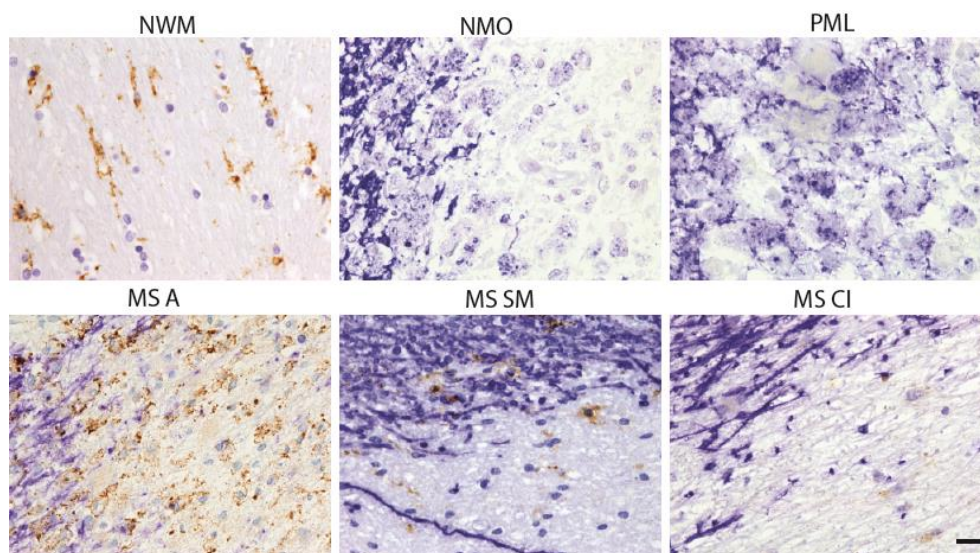


Abbildung 9 TMEM119-positive Mikroglia in entzündlich-entmarkenden Läsionen. TMEM119-Immunhistochemie (braun) mit Hämalan-Kernfärbung (blau) in der weißen Substanz einer Kontrollperson (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von TMEM119 (braun), basischem Myelin-Protein (MBP) (blau) mit Hämalan-Kernfärbung (blau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukoenzephalopathie (PML) und aktiver (A), kombiniert-aktiv/inaktiver (*smoldering* = SM) und chronisch-inaktiver (CI) Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 μm .

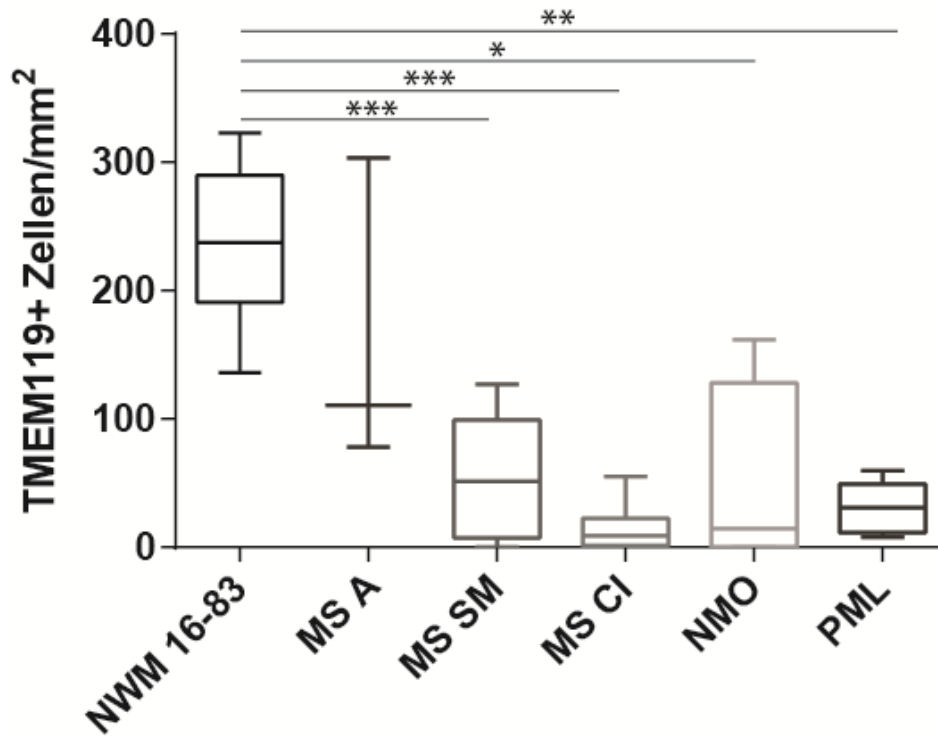


Abbildung 10 Dichte TMEM119-positiver Mikrogliazellen in Läsionen entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung von TMEM119-positiven Mikrogliazellen in der weißen Substanz von nicht neurologisch erkrankten Kontrollindividuen, Alter von 16-83 Jahren (NWM= *normal white matter*, n = 16), in aktiven (A, n = 3), kombiniert-aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM, n = 14) und chronisch-inaktiven (CI, n = 9) Multiple Sklerose-Läsionen (MS), Neuromyelitis optica-Läsionen (NMO, n = 4) und Läsionen bei progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, n = 9); (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.2.4 CCR2-positive inflammatorische Monozyten in entzündlich-entmarkenden Läsionen

CCR2-positive, aus der Peripherie rekrutierte inflammatorische Monozyten sind in der normalen weißen Substanz nur sehr selten zu finden. In allen Läsionstypen der MS und in NMO-Läsionen war ihre Dichte signifikant erhöht im Vergleich zur weißen Substanz von Kontrollen. Die Läsionen bei NMO (Median: 126,1 Zellen/mm²; p ≤ 0,01; Abbildung 12) sowie aktive (Median: 161,2 Zellen/mm²; p ≤ 0,01; Abbildung 12), kombiniert-aktiv/inaktive (Median: 63,9 Zellen/mm²; p ≤ 0,001; Abbildung 12) und chronisch-inaktive MS Läsionen (Median: 52,8 Zellen/mm²; p ≤ 0,05) wiesen eine erhöhte Dichte von CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten im Vergleich zu Kontrollen (Median: 3,2 Zellen/mm²) auf, während in den hier untersuchten PML-Läsionen (Median: 14,2) keine Erhöhung der CCR2-positiven Zellen festzustellen war.

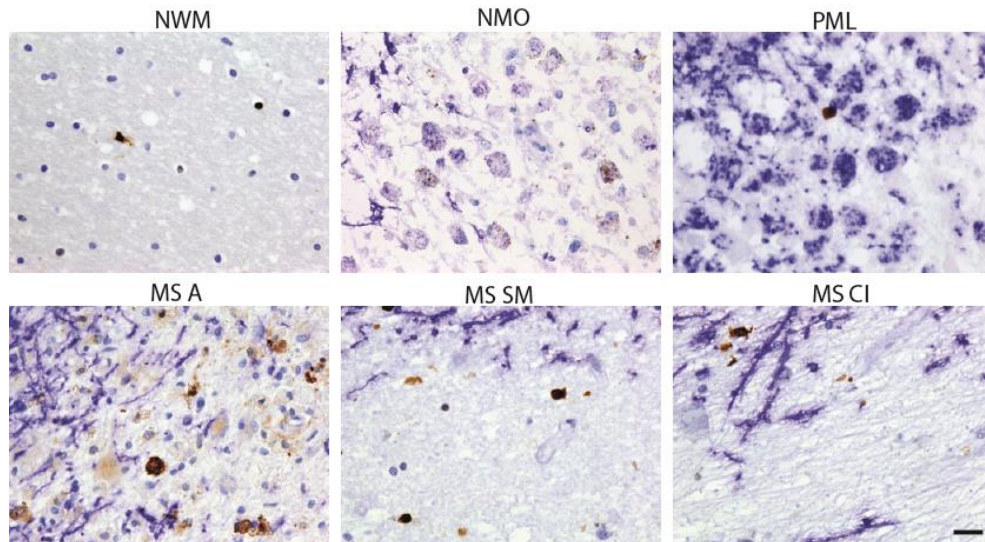


Abbildung 11 CCR2-positive inflammatorische Monozyten in entzündlich-entmarkenden Läsionen. CCR2-Immunhistochemie (braun) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) in der normalen weißen Substanz (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von CCR2 (braun) und basischem Myelinprotein (MBP) (blau) mit Hämalaunkernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und aktiver (A), kombiniert-aktiv/inaktiver (*smoldering* = SM) und chronisch-inaktiver (CI) Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 μm .

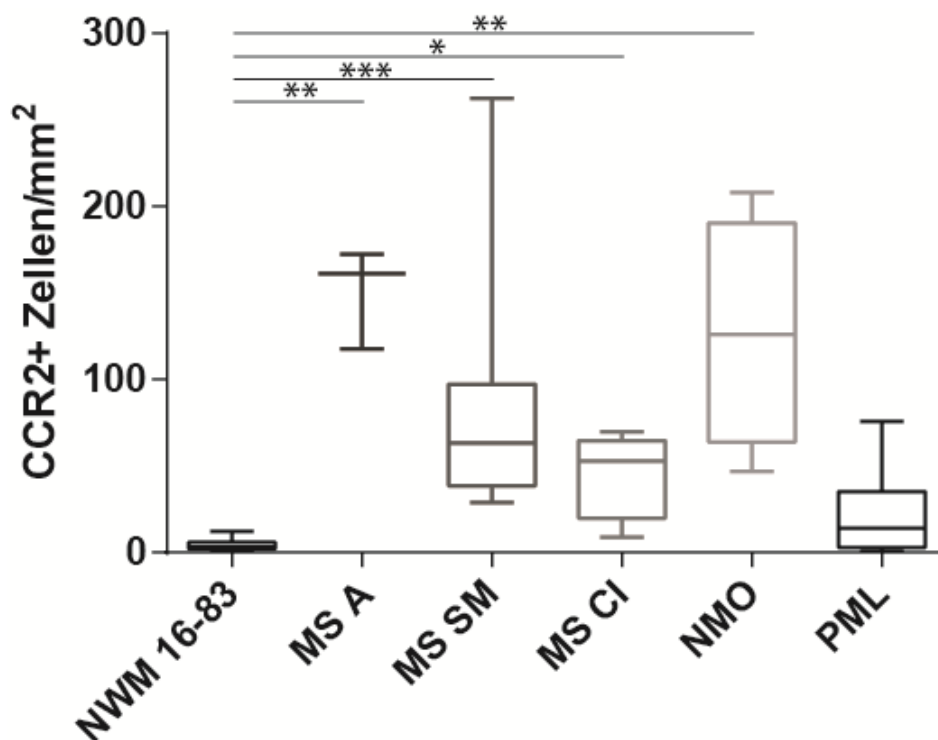


Abbildung 12 Dichte CCR2-positiver inflammatorischer Monozyten in Läsionen entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung von CCR2-positiver Zellen in der normalen weißen Substanz von Kontrollen, Alter 16 - 83 (NWM = *normal white matter*, $n = 16$), in aktiven (A, $n = 3$), kombiniert-aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM, $n = 14$) und chronisch-inaktiven (CI $n = 9$) Multiple Sklerose-Läsionen (MS), Neuromyelitis optica-Läsionen (NMO, $n = 4$) und Läsionen bei progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, $n = 10$); (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.3 Mikroglia und Makrophagen in der peri-Plaque weißen Substanz bei entzündlich entmarkender ZNS-Erkrankungen

3.3.1 KiM1P in der PPWM

In der peri-Plaque weißen Substanz (*periplaque white matter*, PPWM) von PML-Läsionen (Median: 326,2 Zellen/mm²; $p \leq 0,001$; Abbildung 14) sowie in aktiven (Median: 719,2 Zellen/mm²; $p \leq 0,001$; Abbildung 14) und kombiniert-aktiv/inaktiven (Median: 236,4 Zellen/mm²; $p \leq 0,01$; Abbildung 14) MS-Läsionen fanden sich signifikant höhere Dichten an KiM1P-positiven Zellen als in der weißen Substanz von Kontrollen (Median: 99,2 Zellen/mm²). Die PPWM bei NMO (Median: 191,6 Zellen/mm²) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Hierbei ist allerdings die geringe Fallzahl von vier zu berücksichtigen.

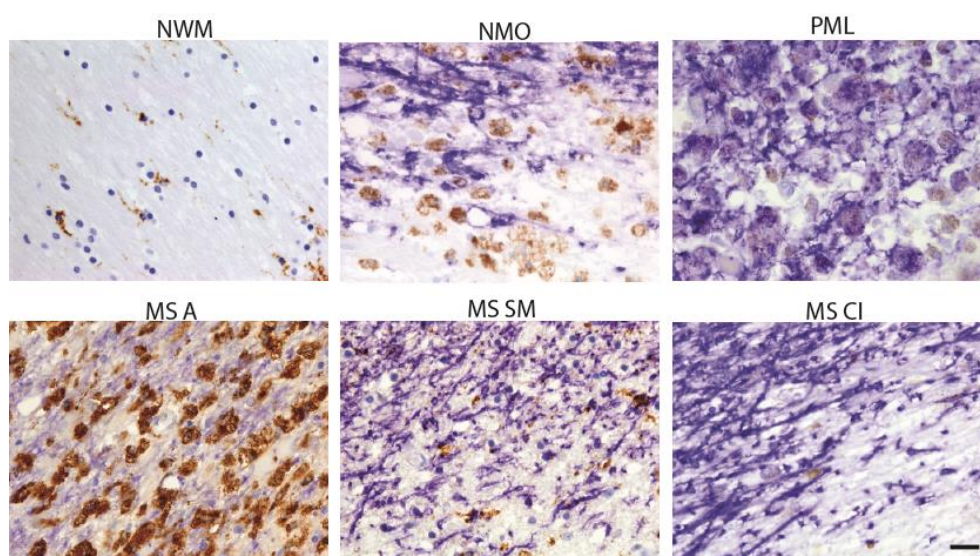


Abbildung 13 KiM1P-positive Zellen in der peri-Plaque weißen Substanz. KiM1P-Immunhistochemie (braun) mit Hämalan-Kernfärbung (blassblau) in der weißen Substanz einer Kontrollperson (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von KiM1P (braun) und basischem Myelinprotein (MBP) (blau) mit Hämalan-Kernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und aktiver (A), kombiniert-aktiv/inaktiver (*smoldering* = SM) und chronisch-inaktiver (CI) Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 μm .

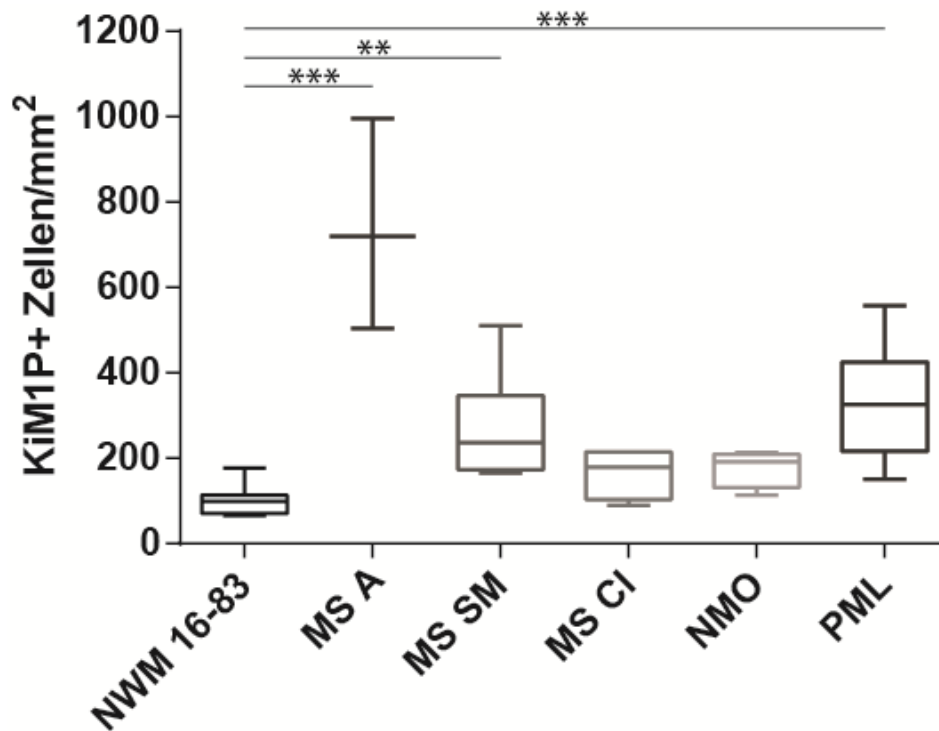


Abbildung 14 Dichte KiM1P-positiver Zellen in der peri-Plaquesubstanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung KiM1P-positiver Phagozyten in der normalen weißen Substanz von Kontrollen, Alter 16 - 83 (normale weiße Substanz = *normal white matter* = NWM, n = 16) und der PPWM von aktiven (A, n = 3), kombiniert-aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM, n = 8) und chronisch-inaktiven (CI, n = 4) Multiple Sklerose-Läsionen (MS), Neuromyelitis optica-Läsionen (NMO, n = 4) und Läsionen bei progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, n = 10); (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.3.2 P2Y12-positive Mikrogliazellen in der PPWM

Die PPWM von kombiniert-aktiv/inaktiven (Median: 139,2 Zellen/mm²; $p \leq 0,01$; Abbildung 16), chronisch-inaktiven (Median: 147,2 Zellen/mm²; $p \leq 0,01$; Abbildung 16) MS- und von PML-Läsionen (Median: 16,8; $p \leq 0,001$; Abbildung 16) zeigte eine signifikant reduzierte Dichte der P2Y12-positiven Mikrogliazellen im Vergleich zu Kontrollen (Median: 275,0 Zellen/mm²). Auch die PPWM aktiver Läsionen zeigte eine deutliche Dichtereduktion P2Y12-positiver Mikrogliazellen (Median: 171,2 Zellen/mm²), die jedoch statistisch nicht signifikant war, wobei die geringe Fallzahl von drei Fällen berücksichtigt werden muss. Die PPWM von NMO-Läsionen wies ebenfalls eine nicht signifikante Reduktion der homöostatischen P2Y12-positiven Mikroglia auf.

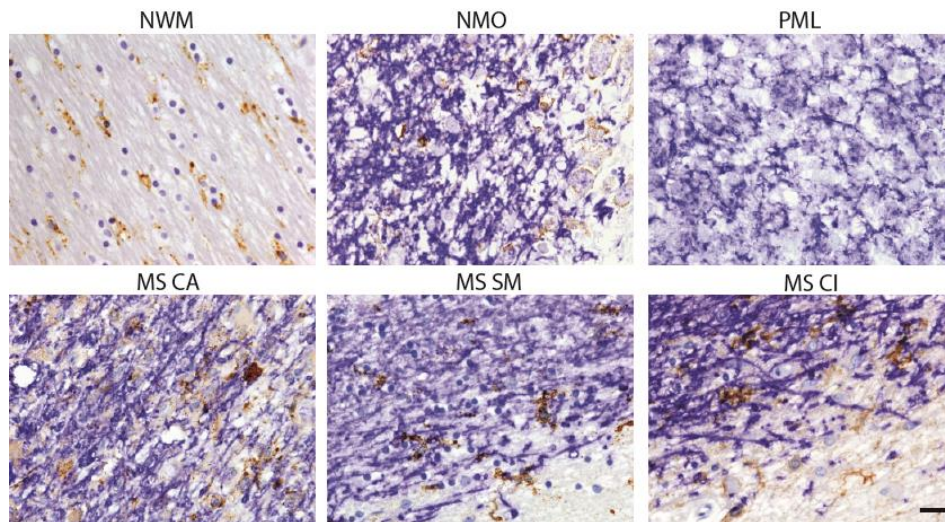


Abbildung 15 P2Y12-positive Zellen in der peri-Plaque weißen Substanz. P2Y12-Immunhistochemie (braun) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) in der weißen Substanz einer Kontrollperson (normal white matter = NWM). Doppelimmunhistochemie von P2Y12 (braun), basischem Myelin-Protein (MBP) (blau) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), Progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und aktiver (A), kombiniert-aktiv/inaktiver (smoldering = SM) und chronisch-inaktiver (CI) Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 μm .

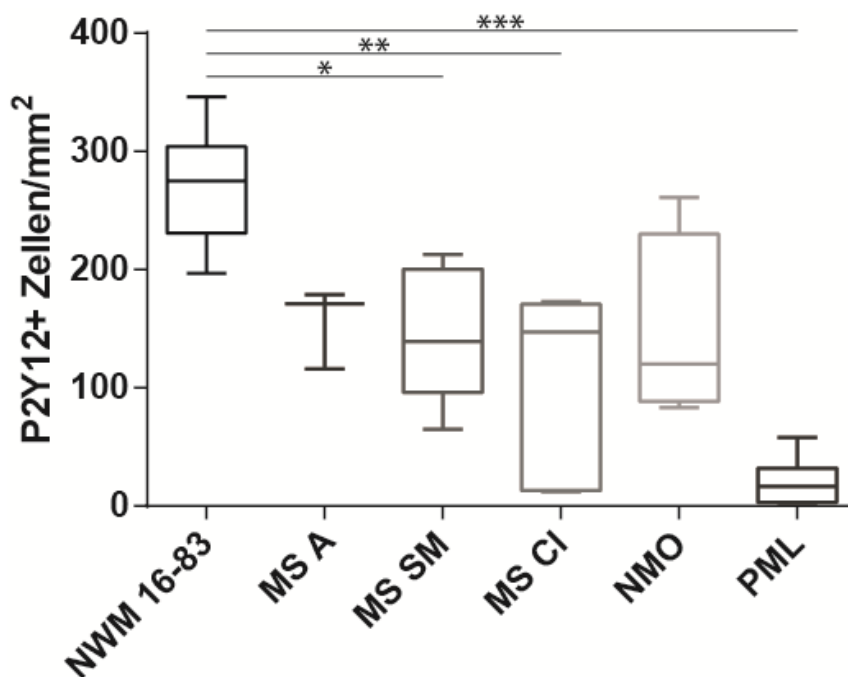


Abbildung 16 Dichte P2Y12-positiver Mikrogliazellen in der peri-Plaque weißen Substanz entzündlicher ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung P2Y12-positiver Mikrogliazellen in der weißen Substanz neurologisch gesunder Kontrollen (Alter 16 - 83 Jahre) (normale weiße Substanz = *normal white matter* = NWM, n = 16) und der PPWM von aktiven (A, n = 3), kombiniert-aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM, n = 11) und chronisch-inaktiven (CI, n = 5) Multiple Sklerose-Läsionen (MS), Neuromyelitis optica-Läsionen (NMO, n = 4) und Läsionen bei progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, n = 8); (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.3.3 TMEM119-positive Mikrogliazellen in der PPWM

Die Dichte der TMEM119-positiven Mikrogliazellen in der PPWM von PML- (Median: 35,1 Zellen/mm²) und NMO-Patient*Innen (Median: 27,8 Zellen/mm²) war im Vergleich zu Kontrollen (Median: 237,6 Zellen/mm²) statistisch signifikant und fast um den Faktor 8 (PML $p \leq 0,01$; NMO $p \leq 0,05$; Abbildung 18) reduziert. In der PPWM von MS-Läsionen zeigte sich ein komplexeres Bild. Während angrenzend an aktive Läsionen (Median: 452,8 Zellen/mm²) die Dichte der TMEM119-positiven Zellen erhöht war, zeigte die PPWM von chronisch-inaktiven Läsionen (Median: 58,7 Zellen/mm²) eine signifikante Reduktion der Zelldichte sowohl im Vergleich zu Kontrollen ($p \leq 0,05$; Abbildung 18) als auch im Vergleich zu den aktiven Läsionen ($p \leq 0,05$; Abbildung 18). In der Umgebung der kombiniert-aktiv/inaktiven Läsionen (Median: 161,3 Zellen/mm²) war die Infiltration der PPWM sehr unterschiedlich. Die Dichte der TMEM119-positiven Mikrogliazellen war in der PPWM von aktiven MS-Läsionen auch im Vergleich zur PPWM von NMO- ($p \leq 0,05$; Abbildung 18), PML-Läsionen ($p \leq 0,01$; Abbildung 18) und chronisch inaktiven MS-Läsionen ($p \leq 0,05$) signifikant erhöht.

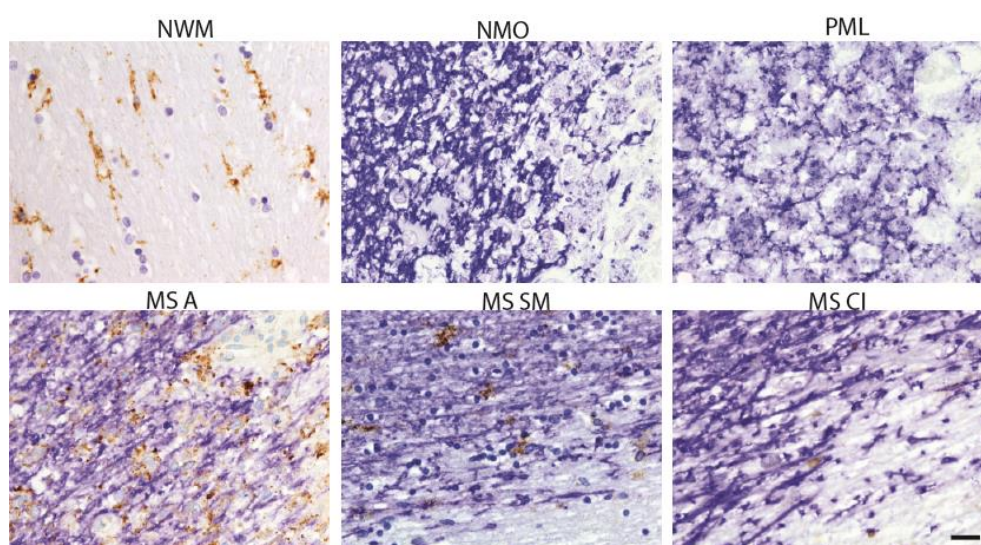


Abbildung 17 TMEM119-positive Zellen in der peri-Plaques weißen Substanz. TMEM119-Immunhistochemie (braun) mit Hämalun-Kernfärbung (blassblau) in der normalen weißen Substanz (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von TMEM119 (braun), basischem Myelin-Protein (MBP) (blau) mit Hämalun-Kernfärbung (blassblau) von Patient*Innen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und aktiver (A), kombiniert-aktiv/inaktiver (*smoldering* = SM) und chronisch-inaktiver (CI) Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 μm .

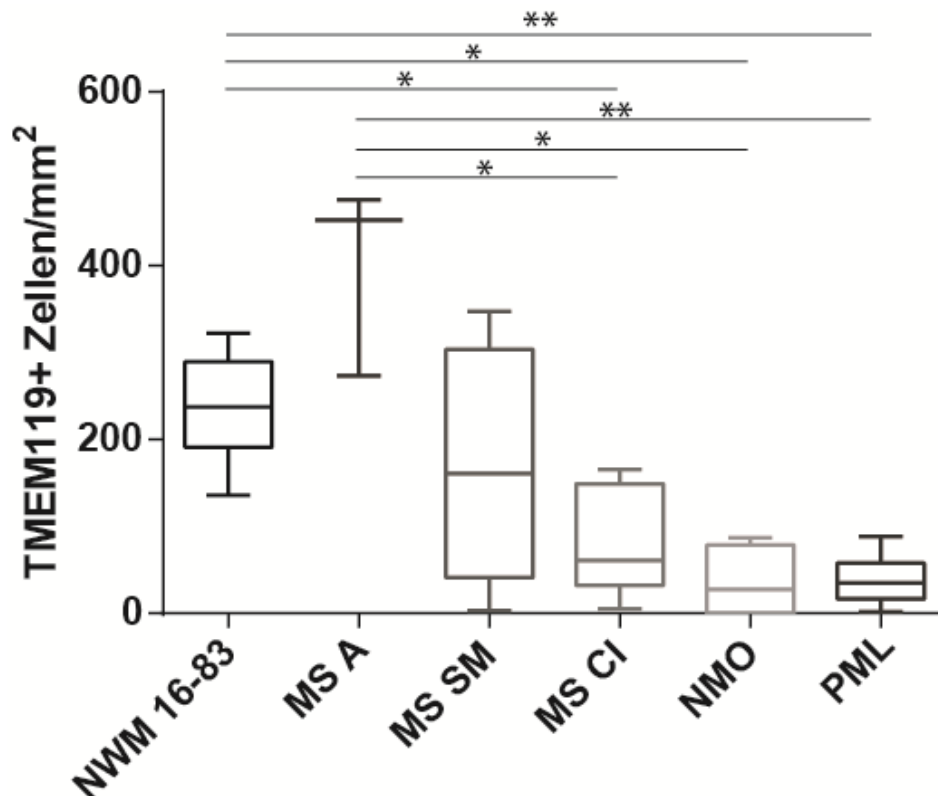


Abbildung 18 Dichte TMEM119-positiver Mikrogliazellen in der peri-Plaquesubstanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung TMEM119-positiver Mikrogliazellen in der weißen Substanz von nicht neurologisch erkrankten Kontrollen, Alter 16 - 83 Jahre, (normale weiße Substanz = *normal white matter* = NWM, n = 16) und der PPWM von aktiven (CA, n=3), kombiniert-aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM, n = 14) und chronisch-inaktiven (CI, n=9) Multiple Sklerose-Läsionen (MS), Neuromyelitis optica-Läsionen (NMO, n = 4) und Läsionen bei progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML n = 8); (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.3.4 CCR2 in der PPWM

Die Quantifizierung der CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten zeigte in der PPWM von aktiven (Median: 248,8 Zellen/mm²; p ≤ 0,01; Abbildung 20), kombiniert-aktiv/inaktiven (Median: 120,0 Zellen/mm²; p ≤ 0,001; Abbildung 20) und auch in chronisch-inaktiven (Median: 96,0 Zellen/mm²; p ≤ 0,05; Abbildung 20) MS-Läsionen eine signifikant höhere Dichte als in Kontrollen (Median: 3,2 Zellen/mm²). Im Unterschied dazu ergab die Analyse der PPWM von PML- (Median: 1,3 Zellen/mm²) und NMO-PatientInnen (Median: 55,3 Zellen/mm²) keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe, wobei bei der NMO die geringe Gruppengröße von vier Fällen berücksichtigt werden muss. Im Vergleich zu PML-Fällen war die Anzahl der CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten in der PPWM von aktiven (p ≤ 0,01; Abbildung 20), kombiniert-aktiv/inaktiven (p ≤

0,001; Abbildung 20) und chronisch-inaktiven ($p \leq 0,01$; Abbildung 20) MS-Fällen signifikant höher.

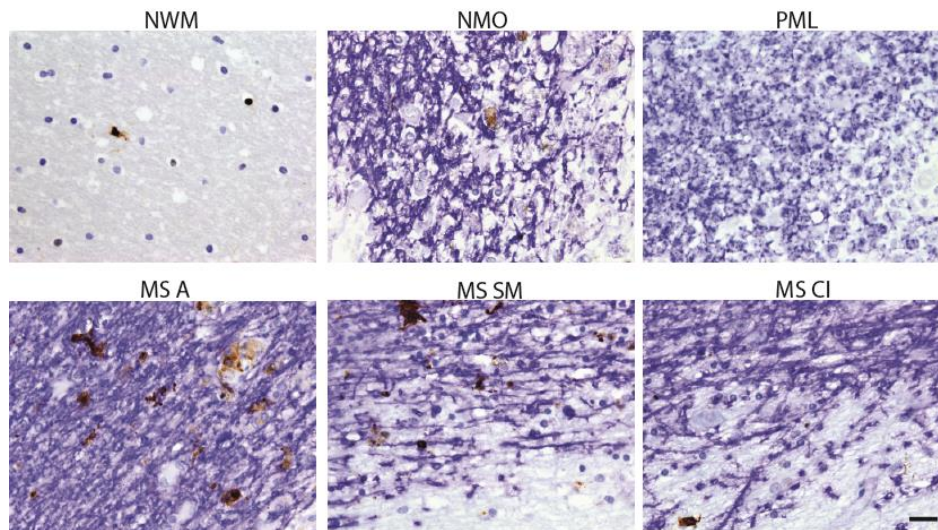


Abbildung 19 CCR2-positive inflammatorische Monozyten in der peri-Plaquesubstanz. CCR2-Immunhistochemie (braun) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) in der normalen weißen Substanz (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von CCR2 (braun), basischem Myelin-Protein (MBP) (blau) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und aktiver (A), kombiniert-aktiv/inaktiver (*smoldering* = SM) und chronisch-inaktiver (CI) Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 μm .

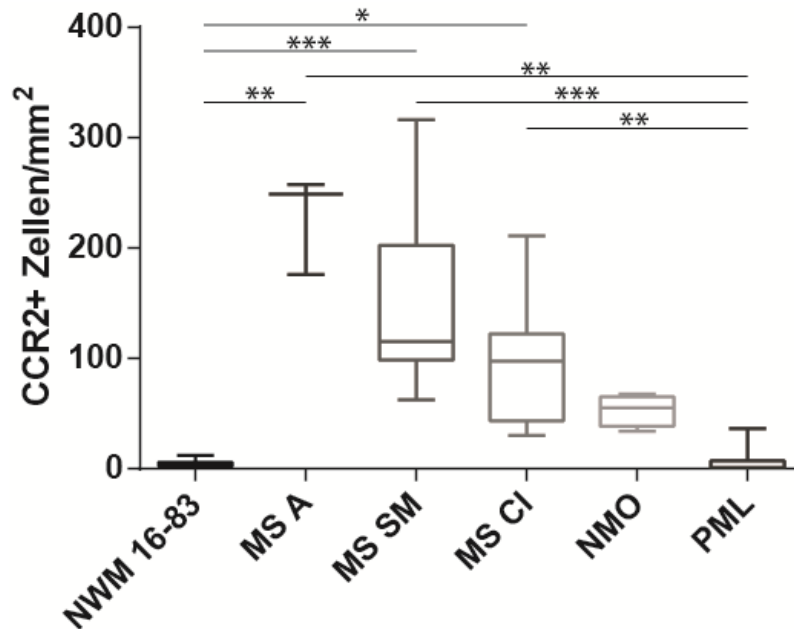


Abbildung 20 Dichte CCR2-positiver inflammatorischer Monozyten in der peri-Plaquesubstanz entzündlich-entmarkenden ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung CCR2-positiver Makrophagen in der weißen Substanz von nicht neurologisch erkrankten Kontrollen, Alter 16-83 Jahre, (normale weiße Substanz = *normal white matter* = NWM, $n = 16$) und der PPWM von aktiven (A, $n = 3$), kombiniert-aktiv/inaktiven (*smoldering* = SM, $n = 14$) und chronisch-inaktiven (CI, $n = 9$) Multiple Sklerose-Läsionen (MS), Neuromyelitis optica-Läsionen (NMO, $n = 4$) und Läsionen bei progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, $n = 8$); (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.4 Makrophagen- und Mikroglia-Phänotypen in der normal erscheinenden weißen Substanz

Mit mindestens einem Zentimeter Abstand von einer Läsion oder auf einem Schnitt ohne Läsion wurde die normal erscheinende weiße Substanz (*normal appearing white matter* = NAWM) von Patientinnen mit MS, NMO und PML untersucht. Hierbei wurden die nicht von Läsionen betroffenen Bereiche mithilfe der MBP-Immunhistochemie definiert.

3.4.1 KiM1P in der NAWM

Die Quantifizierung der KiM1P-positiven Mikrogliazellen und Makrophagen in der NAWM zeigte eine signifikante ($p \leq 0,001$; Abbildung 22) Erhöhung der Zelldichte bei MS-PatientInnen (Median: 178,8 Zellen/mm²) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median: 99,2 Zellen/mm²). Im Gegensatz dazu wies die NAWM von NMO- (Median: 116,4 Zellen/mm²) und PML-Fällen (Median: 113,4 Zellen/mm²) keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Die Dichte der KiM1P-positiven Zellen in der NAWM war bei MS-Fällen im Vergleich zur PML signifikant erhöht ($p \leq 0,05$; Abbildung 22).

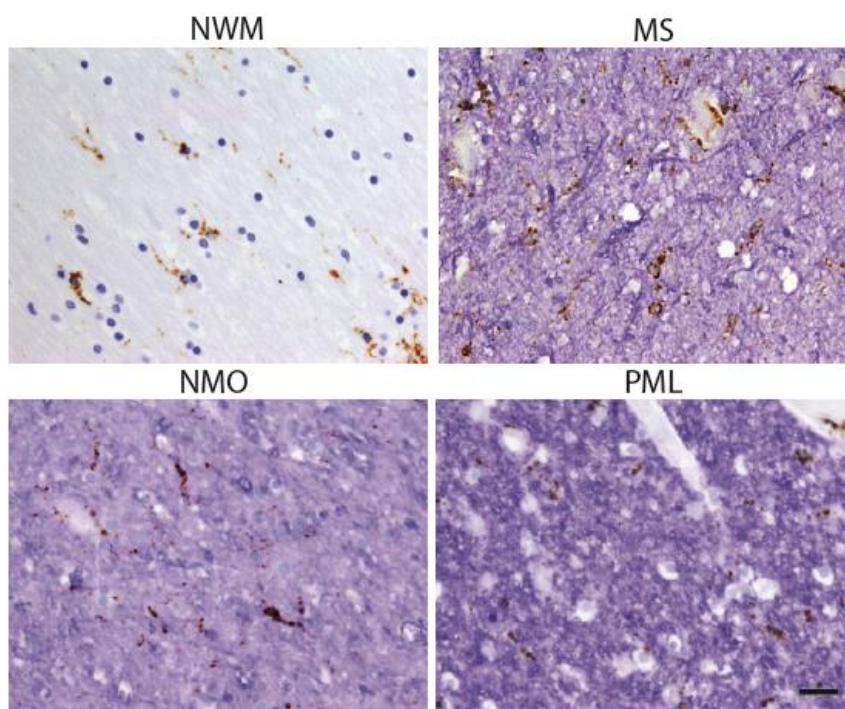


Abbildung 21 KiM1P-positive Mikroglia und Makrophagen in der normal erscheinenden weißen Substanz. KiM1P-Immunhistochemie (braun) mit Hämalaunkernfärbung (blau) in der normalen weißen Substanz (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von KiM1P (braun) und basischem Myelin-Protein (MBP) (blau) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 μm .

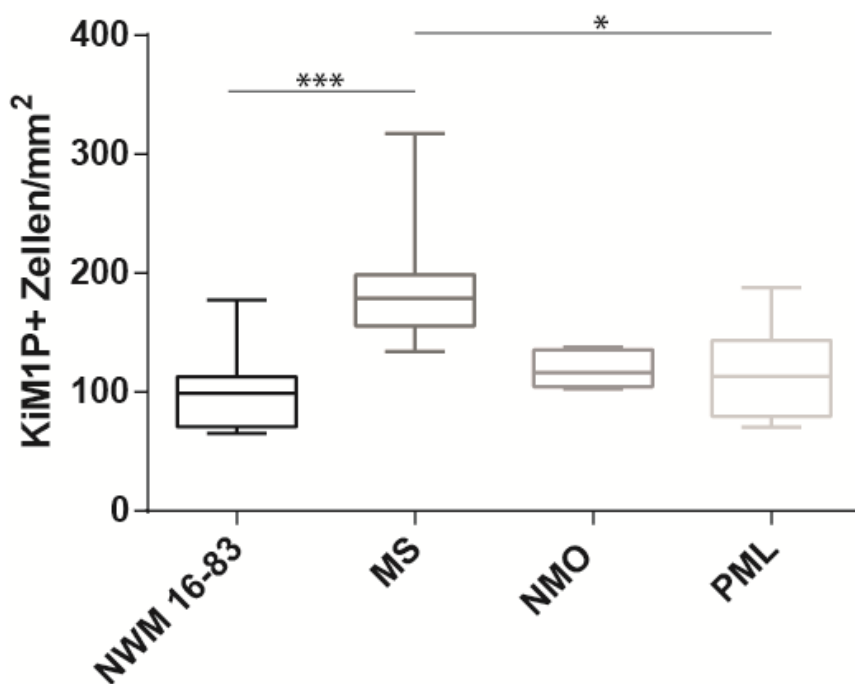


Abbildung 22 Dichte KiM1P-positiver Makrophagen/aktivierter Mikroglia in der normal erscheinenden weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung von KiM1P-positiven Zellen in der NAWM von PatientInnen mit Multipler Sklerose (MS, n = 16), Neuromyelitis optica (NMO, n = 6), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, n = 8) und Kontrollen (normale weiße Substanz = normal white matter = NWM, n = 16, Alter 16-83 Jahre); (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.4.2 P2Y12-positive homöostatische Mikrogliazellen in der NAWM

Die Quantifizierung der P2Y12-positiven homöostatischen Mikrogliazellen in der NAWM zeigte bei allen drei demyelinisierenden Erkrankungen eine deutliche Reduktion zu nicht neurologisch erkrankten Kontrollen. Die Dichte war bei MS- (Median: 168,2 Zellen/mm²), NMO -(Median: 148,0 Zellen/mm²) und PML-Fällen (Median: 142,2 Zellen/mm²) um mehr als 100 Zellen/mm² im Vergleich zur Kontrolle (Median: 275,0 Zellen/mm²) reduziert. Die statistische Analyse ergab für alle 3 demyelinisierenden Erkrankungen eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (MS p ≤ 0,001; NMO p ≤ 0,001; PML p ≤ 0,001; Abbildung 24).

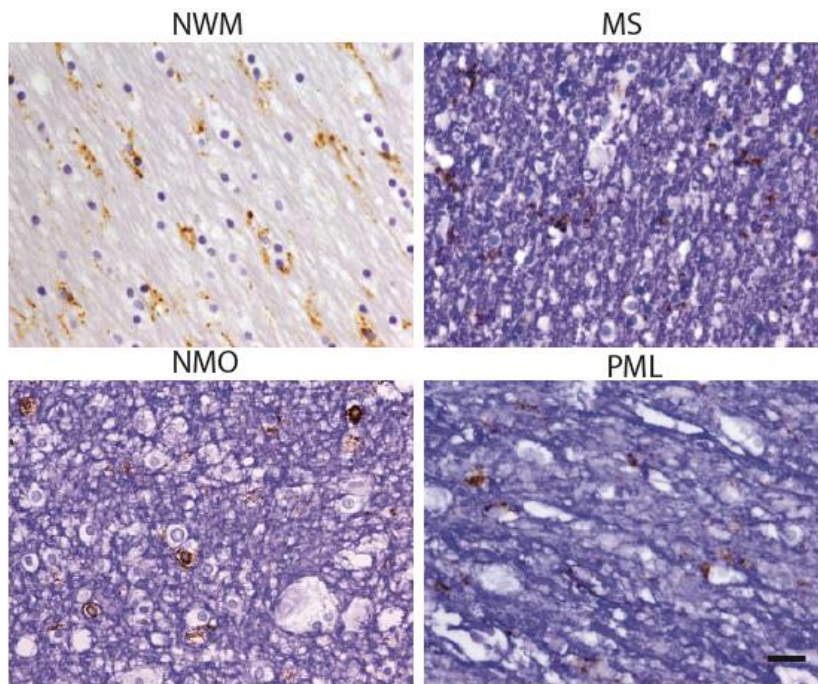


Abbildung 23 P2Y12-positive Mikroglia und Makrophagen in der normal erscheinenden weißen Substanz. P2Y12-Immunhistochemie (braun) mit Hämalaunkernfärbung (blau) in der normalen weißen Substanz (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von P2Y12 (braun) und basischem Myelin-Protein (MBP) (blau) mit Hämalaunkernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und Multipler Sklerose (MS). Messbalken entspricht 20 μm .

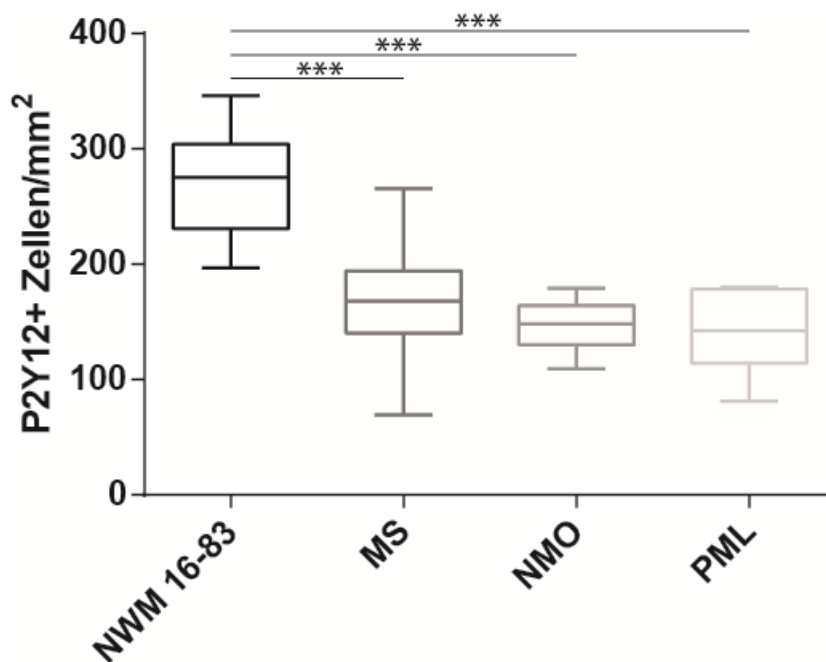


Abbildung 24 Dichte P2Y12-positiver homöostatischer Mikrogliazellen in der normal erscheinenden weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung von P2Y12 in der NAWM von PatientInnen mit Multipler Sklerose (MS, $n = 20$), Neuromyelitis optica (NMO, $n = 7$), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, $n = 10$) und in nicht neurologisch-erkrankten Kontrollpersonen (normale weiße Substanz = *normal white matter* = NWM, $n = 16$; Alter 16 - 83 Jahre); (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.4.3 TMEM119-positive Mikrogliazellen in der NAWM

Die Quantifizierung der TMEM119-positiven Mikrogliazellen in der NAWM von MS-Fällen (Median: 196,4 Zellen/mm²) zeigte im Median zwar eine leichte Reduktion der Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median: 237,6 Zellen/mm²), aber keinen statistisch signifikanten Unterschied. Im Gegensatz dazu war die Dichte der TMEM119-positiven Zellen in der NAWM von PML-PatientInnen (Median: 118,4 Zellen/mm²) nur halb so hoch und bei NMO-PatientInnen (Median: 54,8 Zellen/mm²) ca. 4,5 mal niedriger als die Dichte der TMEM119-positiven Mikrogliazellen in Kontrollfällen. Die statistische Analyse ergab eine signifikante Reduktion der TMEM119-positiven Zellen in PML- und NMO-Fällen im Vergleich zu Kontrollen (PML $p \leq 0,001$; NMO $p \leq 0,001$; Abbildung 26) und auch im Vergleich von MS- zu PML und NMO-Fällen (PML $p \leq 0,05$; NMO $p \leq 0,05$; Abbildung 26).

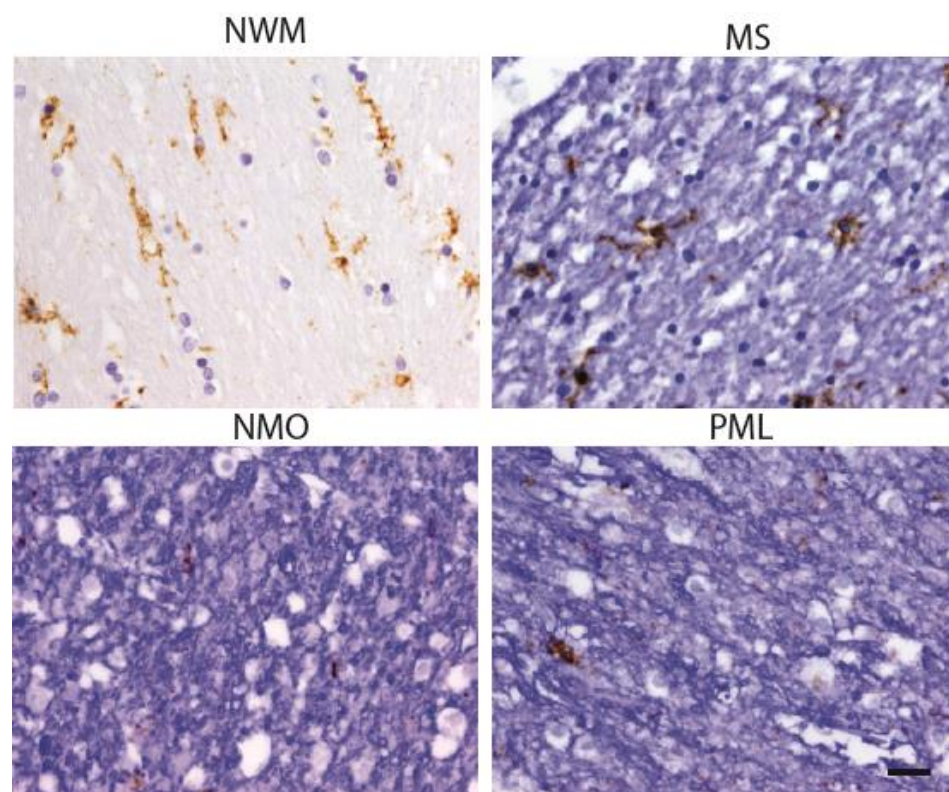


Abbildung 25 TMEM119-positive Mikroglia in der normal erscheinenden weißen Substanz. TMEM119-Immunhistochemie (braun) mit Hämalan-Kernfärbung (blau) in der normalen weißen Substanz (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von TMEM119 (braun) und basischem Myelin-Protein (MBP) (blau) mit Hämalan-Kernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 μm .

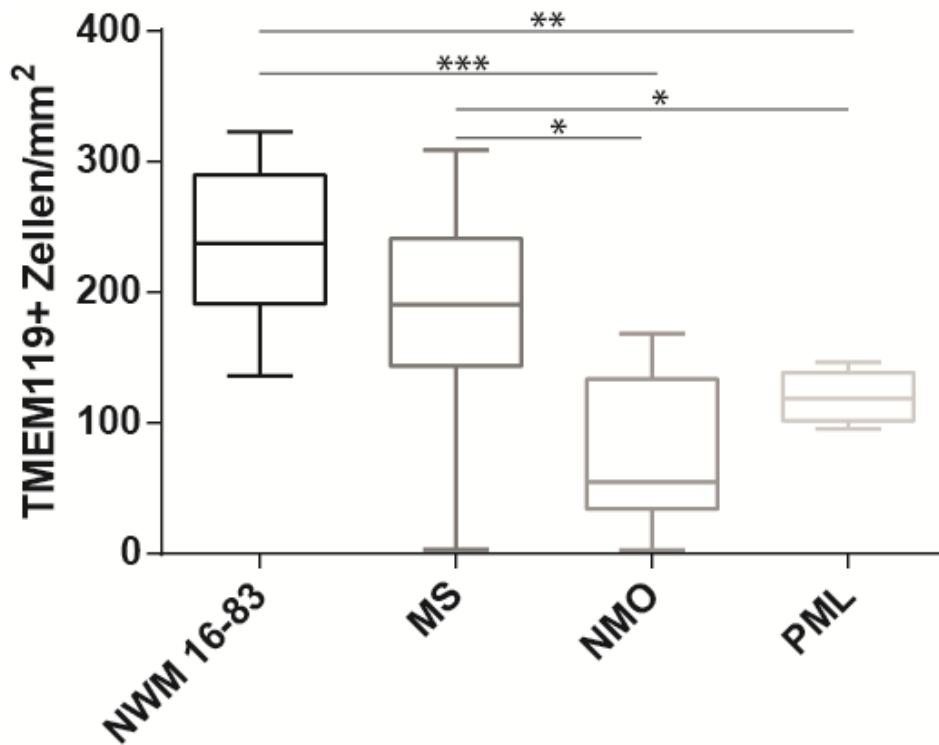


Abbildung 26 Dichte TMEM119-positiver Mikrogliazellen in der normal erscheinenden weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung von TMEM119 positiven Zellen in PatientInnen mit Multipler Sklerose (MS, n = 26), Neuromyelitis optica (NMO, n = 6) und progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, n = 9) und Kontrollfällen (normale weiße Substanz = *normal white matter* = NWM, n = 16; Alter 16 - 83 Jahre); (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

3.4.4 CCR2-positive inflammatorische Monozyten in der NAWM

Die Quantifizierung der CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten in der NAWM zeigte eine deutliche Erhöhung der Zelldichte in allen Gruppen von MS-PatientInnen unabhängig von der Aktivität ihrer Läsionen. Die NAWM von MS-PatientInnen (Median: 61,6 Zellen/mm²) wies im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median: 3,2 Zellen/mm²) eine signifikant erhöhte Zelldichte auf ($p \leq 0,001$; Abbildung 28). Die NAWM von NMO- (Median: 10,4 Zellen/mm²) und PML-PatientInnen (Median: 0,8 Zellen/mm²) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe, allerdings ergab die statistische Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen der NAWM von PML- und MS-Fällen ($p \leq 0,001$; Abbildung 28).

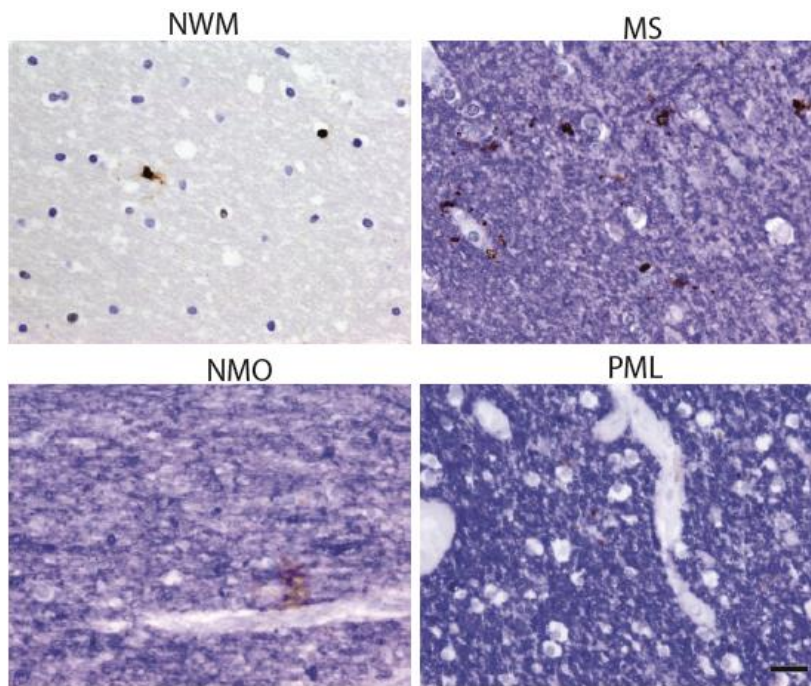


Abbildung 27 CCR2-positive inflammatorische Monozyten in der normal erscheinenden weißen Substanz. CCR2-Immunhistochemie (braun) mit Hämalaun-Kernfärbung (blau) in der normalen weißen Substanz (*normal white matter* = NWM). Doppelimmunhistochemie von CCR2 (braun) und basischem Myelin-Protein (MBP) (blau) mit Hämalaun-Kernfärbung (blassblau) von PatientInnen mit Neuromyelitis optica (NMO), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) und Multipler Sklerose (MS). Der Messbalken entspricht 20 µm.

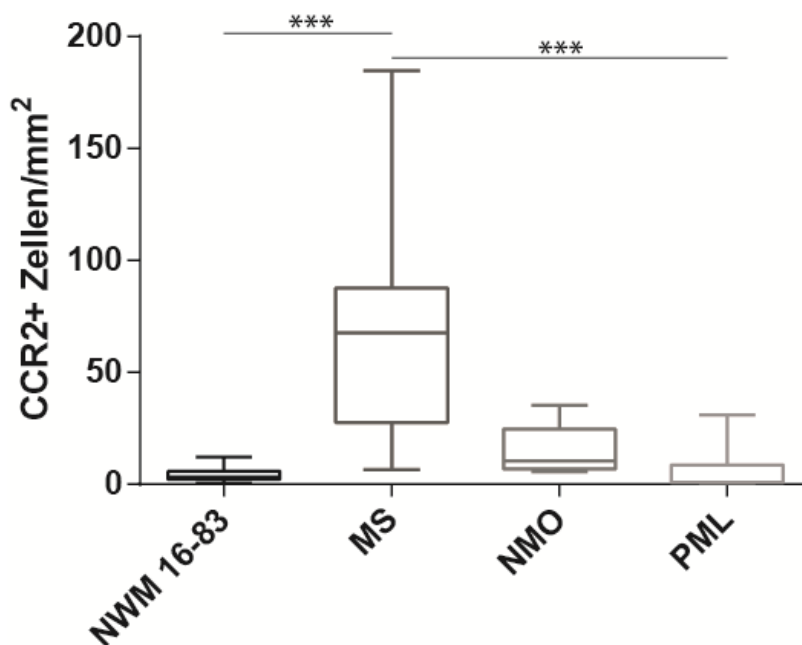


Abbildung 28 Dichte CCR2-positiver inflammatorischer Monozyten in der normal erscheinenden weißen Substanz entzündlich-entmarkender ZNS-Erkrankungen. Quantifizierung von CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten in der NAWM von PatientInnen mit Multipler Sklerose (MS, n = 26), Neuromyelitis optica (NMO, n = 5), progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML, n = 9) und in nicht neurologisch erkrankten Kontrollen (normale weiße Substanz = *normal white matter* = NWM, n = 16); (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; Kruskal-Wallis-Test, Korrektur für wiederholtes Testen mittels Dunn's Post-Test).

4 Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Markerproteine KiM1P (Mikroglia und periphere Makrophagen), P2Y12 (homöostatische Mikroglia), TMEM119 (Mikroglia) und CCR2 (periphere entzündliche Makrophagen) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen ohne Hinweis auf entzündliche ZNS-Erkrankungen.

4.1 Expression von Mikroglia- und Makrophagenmarkern in MS, NMO, PML und Kontrollen

4.1.1 Läsionen und peri-Plaque weiße Substanz

4.1.1.1 KiM1P-positive Makrophagen und aktivierte Mikroglia in Läsionen und der PPWM

Innerhalb der demyelinisierenden Läsionen von PatientInnen mit NMO, PML und aktiver MS zeigte sich eine deutliche Akkumulation von KiM1P/CD68-positiven schaumzelligen Makrophagen und Mikrogliazellen. KiM1P wird als Marker für M1-aktivierte Mikroglia und Makrophagen angesehen (Yang et al. 2016). Allen aktiven Läsionen ist gemeinsam, dass Mikrogliazellen und Makrophagen einen aktivierten, schaumzelligen Phänotyp aufweisen und Phagozytose betreiben. Bei allen drei Erkrankungen ließen sich KiM1P/MBP doppelt-positive Phagozyten nachweisen, was auf die stattfindende Phagozytose von Myelin schließen lässt.

Bei der Quantifizierung der unterschiedlichen MS-Läsionen nach Aktivitätsstadien ist zu erkennen, dass aktive Läsionen deutlich höhere Dichten von KiM1P-positiven Zellen aufweisen. Die erhobenen Daten stimmen mit vorangegangenen immunhistochemischen Analysen überein, die eine hohe Dichte von KiM1P-positiven Zellen in aktiven und eine geringe Dichte in kombiniert-aktiv/inaktiven und chronisch-inaktiven Läsionen beschreiben (Kuhlmann et al. 2002; Kuhlmann et al. 2017; Zrzavy et al. 2017). Bei vielen PML-Patienten ist eine schwache immunhistochemische Anfärbung für KiM1P innerhalb der Läsionen auffällig. JC-Virus-Desoxyribonukleinsäure (DNA) konnte bei der PML in Oligodendrozyten, Astrozyten, Lymphozyten, Nierenepithelzellen, Tonsillenstromazellen und Plasmazellen nachgewiesen werden (Tan und Koralnik 2010). Inwieweit das Virus in Mikrogliazellen und Makrophagen aufgenommen wird und einen Einfluss auf die Proteinexpression haben

könnte, ist unklar. Es ist jedoch bekannt, dass Viren die Proteinexpression ihrer Wirtszellen beeinflussen können. Mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Neurone, die mit dem JC-Virus infiziert sind, MHC I nicht hochregulieren und somit der Erkennung durch CD8-positive T-Zellen entgehen können (Wüthrich et al. 2015). Im Unterschied zur NMO waren in der PPWM von PML- und MS-PatientInnen mit aktiven und kombiniert-aktiv/inaktiven MS-Fällen mehr KiM1P-positive Zellen zu finden. Es wurde bereits beschrieben, dass die PPWM von MS-PatientInnen eine diffuse und teilweise umfangreiche Aktivierung der Mikroglia aufweist (Howell et al. 2010; Kuhlmann et al. 2017; Gallego-Delgado et al. 2020). Die Analyse der PPWM der NMO-Fälle zeigte eine geringe Expression von KiM1P-positiven Zellen. Hierbei ist zu beachten, dass das Hauptziel der Immunreaktion bei dieser Erkrankung die AQP4-Kanäle sind. Diese werden im ZNS von Astrozyten und Ependymzellen exprimiert (Verkman et al. 2013). Die Lokalisation der Entmarkungsläsionen und somit die Läsionsgrenze zur weißen Substanz wurde in dieser Arbeit über die Immunreaktion gegen ein Myelinprotein (MBP) definiert, das bei der NMO nicht das primäre Angriffsziel der Immunreaktion ist (Jarius et al. 2014). Durch immunhistochemische Analysen von NMO-Biopsiegewebe und Geweben aus Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Demyelinisierung in der NMO sekundär auf den Astrozytenverlust folgt (Wrzos et al. 2014). Bei den NMO-Läsionen wäre das Hinzuziehen einer AQP4-Färbung sinnvoll, um zu evaluieren, ob der über MBP definierte Läsionsrand mit dem astrozytären Läsionsrand übereinstimmt oder ob vermehrte Phagozytoseaktivität am astrozytären Läsionsrand zu finden sein könnte.

Bei der Auswertung der KiM1P-positiven Mikroglia und Makrophagen in der PPWM fiel auf, dass die Zellen in Bezug auf die Läsionen unterschiedliche Verteilungsmuster bildeten. Während bei NMO-PatientInnen die PPWM wenig infiltriert war, schien die PPWM vor allem bei MS-PatientInnen mit aktiven und kombiniert-aktiv/inaktiven Läsionen stark von entzündlich aktivierten Zellen infiltriert (Kutzelnigg et al. 2005). Bei den PML-Läsionen ließ sich kein einheitliches Muster erkennen, teilweise infiltrierten KiM1P-positive-Zellen die PPWM stark und teilweise schwach.

4.1.1.2 P2Y12-positive homöostatische Mikroglia in Läsionen und der PPWM

Die homöostatischen P2Y12-positiven Mikrogliazellen waren in den Läsionen aller Erkrankungen in geringeren Dichten als in der normalen weißen Substanz von nicht neurologisch erkrankten Kontrollen zu finden.

P2Y12 wird oft als Markerprotein homöostatischer Mikrogliazellen beschrieben, seine Expression war in der hier vorliegenden Analyse in den Läsionen aller drei demyelinisierenden Erkrankungen reduziert. Die Reduktion war allerdings nur im Fall der MS und PML statistisch signifikant.

Alle Läsionstypen der MS zeigten eine signifikante Reduktion der P2Y12-Immunreaktivität im Vergleich zu den Kontrollen. Im Verlauf von aktiven zu chronisch-inaktiven MS-Läsionen zeigten sich keine starken Dichteunterschiede. Die erhobenen Daten stimmen teilweise mit anderen immunhistochemischen Analysen überein. Vorgegangene Studien beschrieben ebenfalls eine signifikant reduzierte Dichte der P2Y12-positiven Zellen sowohl in aktiven als auch chronisch-inaktiven MS-Läsionen. Dort lag die Dichte von P2Y12-positiven Zellen in aktiven Läsionen deutlich niedriger als in chronisch-inaktiven Läsionen (Zrzavy et al. 2017). Zwar zeigte sich auch in der vorliegenden Analyse der niedrigste Median bei aktiven Fällen, doch der beschriebene deutliche Unterschied ließ sich nicht reproduzieren. Hierbei könnte allerdings die deutlich geringere Gruppengröße von nur drei aktiven MS-Fällen eine Rolle spielen.

Im Vergleich zu Kontrollfällen zeigten auch NMO-Läsionen eine niedrigere Expression von P2Y12-positiven Zellen, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Eine massive Reduktion von P2Y12-positiven Zellen war in den Läsionen von Patienten mit PML festzustellen.

Direkt neben den Läsionen innerhalb der PPWM zeigte sich ein ähnliches Bild: In PML-, kombiniert-aktiv/inaktiven und chronisch inaktiven MS-Fällen waren die homöostatischen Mikrogliazellen signifikant reduziert, für die NMO war es deutlich schwieriger, eine eindeutige Aussage zu treffen. Auch aktive MS- und NMO-Fälle zeigten weniger P2Y12-positive Zellen in der PPWM im Vergleich zu Kontrollen, die Differenz war aber nicht statistisch signifikant.

In Läsionen aller drei entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen und auch in der umgebenden PPWM zeigte sich jeweils die Tendenz einer reduzierten Dichte P2Y12-positiver

homöostatischer Mikrogliazellen. Darüber hinaus waren in NMO-Läsionen teilweise P2Y12-positive Phagozyten, die MBP Abbauprodukte aufwiesen, sichtbar als Hinweis auf eine phagozytische Aktivität von Mikrogliazellen bei der Erkrankung.

Bei allen drei untersuchten Erkrankungen kam es innerhalb der Läsionen zu einer Entzündungsreaktion. Gewebeuntergang und proinflammatorische Zytokine fördern eine M1-Aktivierung von Mikrogliazellen (Yang et al. 2018). Die vereinfachte M1/M2 Betrachtung der Phänotypen von Mikrogliazellen beschreibt jedoch die komplexe Physiologie von Mikrogliazellen nicht angemessen. Mikrogliazellen scheinen im Verlauf vieler Krankheiten ihre homöostatische molekulare Signatur und Funktion zu verlieren. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose, dem Morbus Alzheimer und auch bei der Multiplen Sklerose wurden mit Hilfe von Einzelzell-Transkriptionsanalysen spezifische mikrogliale Signaturen/Aktivierungsmuster identifiziert (Kragh et al. 2012; Masuda et al. 2019). Die Untersuchung von mikroglialen Signaturen könnte dabei helfen, die degenerativen Vorgänge bei ZNS-Erkrankungen genauer zu verstehen (Butovsky und Weiner 2018).

Histologische Analysen zeigten, dass das Markerprotein P2Y12 von Mikrogliazellen im Kortex von Patienten mit M. Alzheimer herunter reguliert wird. Die Regulation korreliert mit dem Ausmaß der Neurodegeneration bei dieser Erkrankung. Im Gegensatz dazu wird P2Y12 bei PatientInnen mit systemischer Immunaktivierung, z.B. im Rahmen einer Sepsis, nicht vermindert exprimiert (Zrzavy et al. 2019). Die Autoren dieser Studie stellten die These auf, dass Neurodegeneration als Auslöser für die Herunterregulierung der P2RY12-Expression auf ZNS-Mikroglia von größerer Bedeutung sein könnte als Entzündungsreaktionen (Zrzavy et al. 2019).

Dass proinflammatorische Zytokine einen Einfluss auf die P2Y12-Expression haben, belegte Analysen von messenger-Ribonukleinsäure-Spiegeln (mRNA) in postmortal kultivierten menschlichen Mikrogliazellen von MS-PatientInnen. Die Behandlung der Zellen mit proinflammatorisch wirkendem IFN γ und LPS senkte die P2Y12-Expression, während antiinflammatorisch wirkendes IL4 sie steigerte (Mildner et al. 2017; Wageningen et al. 2019).

Die vorliegende Analyse ergab sich innerhalb der entzündlichen Läsionen und in der PPWM eine Reduktion der P2Y12-positiven Zellen bei kombiniert-aktiv/inaktiven und chronisch-inaktiven MS- sowie bei PML-Läsionen. Die aktiven MS- und NMO-Läsionen

zeigten im Median ebenfalls eine reduzierte Dichte, welche jedoch nicht statistisch signifikant war. Hierbei ist die geringe Gruppengröße (aktive MS = drei; NMO = vier) zu beachten. Die Zusammenschau der durchgeführten Studie legt nahe, dass das ausgeprägte entzündliche Läsionsmilieu in NMO- (Uzawa et al. 2014), PML- (Wollebo et al. 2016) und MS-Läsionen (Kuhlmann et al. 2017) zu einer Herunterregulation von P2Y12 und somit zu einer Reduktion der P2Y12-positiven Mikrogliazellen führt.

4.1.1.3 TMEM119-positive Mikroglia in den Läsionen und der PPWM

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass die Dichte TMEM119-positiver Mikrogliazellen in aktiven MS-Läsionen nicht signifikant reduziert war. Im Gegensatz dazu waren jedoch die Zelldichten von TMEM119-positiven Mikrogliazellen in kombiniert-aktiven/inaktiven Läsionen und chronisch-inaktiven Läsionen signifikant vermindert. Bei der vorliegenden Analyse war auffällig, dass insbesondere die aktiven MS Läsionen, aber auch teilweise die kombiniert-aktiv/inaktiven Läsionen, MBP- und TMEM119-positive Phagozyten enthielten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer vorangegangenen Studie, die demonstrierte, dass in frühen MS-Läsionen bis zu 45% der Zellen TMEM119 exprimieren und TMEM119-positiv Phagozyten teilweise an der Myelinphagozytose beteiligt sind. Des Weiteren zeigte die vorangegangene Analyse ebenfalls eine starke Dichtereduktion der TMEM119-positiven Mikrogliazellen in inaktiven MS-Läsionen. Dies spricht dafür, dass sowohl Mikrogliazellen als auch periphere Makrophagen bei der Multiplen Sklerose an der Phagozytose beteiligt sind (Zrzavy et al. 2017).

Das Protein TMEM119 wird nur von Mikrogliazellen, nicht aber von Makrophagen exprimiert (Sato et al. 2016b). Die quantitative Analyse der NMO- und PML-Fälle ergab eine signifikante Reduktion TMEM119-positiver Zellen innerhalb der Läsionen im Vergleich zu Kontrollen und zu aktiven MS-Fällen. Die Analyse der PPWM zeigte ebenfalls eine signifikant verminderte Dichte TMEM119-positiver Zellen unmittelbar angrenzend an PML-, NMO- und chronisch-inaktive MS-Läsionen. Im Gegensatz dazu stieg in der PPWM von aktiven MS-Läsionen der Median im Vergleich zu Kontrollen sogar leicht an. Die kombiniert-aktiven/inaktiven MS-Läsionen wiesen in der PPWM eine große Streuung an Dichten TMEM119-positiver Zellen auf, und die Expression war im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant reduziert.

Vorangegangene RNA-Sequenzierungsanalysen an postmortal isolierten Mikrogliazellen der NAWM von MS-PatientInnen zeigten im Vergleich zu Kontrollen keine verminderte Expression von TMEM119 (Poel et al. 2019). Weitere Studien an humanen Mikrogliazellen ergaben, dass das TMEM119-mRNA-Expressionsniveau durch die Exposition gegenüber M1- oder M2-induzierenden Zytokinen gesteigert wurden (Satoh et al. 2016a).

In Studien an Mausmikrogliazellen waren die TMEM119-mRNA-Spiegel nach der in vitro Behandlung mit proinflammatorischem LPS reduziert. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Expression von TMEM119 durch entzündliche Zytokine reguliert wird (Bennett et al. 2016). Des Weiteren zeigten Analysen an postmortalen humanen Mikrogliazellen von MS-PatientInnen, dass die mRNA-Konzentrationen von TMEM119 durch die antiinflammatorische IL4-Behandlung abnahm und die proinflammatorische Behandlung mit IFN γ und LPS die mRNA-Expression von TMEM119 in der Tendenz senkte (Wagenin-gen et al. 2019).

Die starke Regulation in der Läsionsumgebung von chronisch-inaktiven MS-, NMO- und PML-Fällen legt nahe, dass die Expression von TMEM119 komplexen Regulationsmechanismen unterliegt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die Läsionen als auch die PPWM der PML- und NMO-Fälle eine stark verminderte Dichte von TMEM119-positiven Zellen aufweisen. Das entzündliche Milieu innerhalb der demyelinisierenden Läsionen scheint zu einer verminderten Expression von TMEM119 zu führen.

4.1.1.4 CCR2-positive inflammatorische Monozyten in den Läsionen und der PPWM

Bei der quantitativen Analyse der CCR2-positiven, von peripher rekrutierten inflammatorischen Monozyten in der PPWM und innerhalb der entmarkten Läsionen war auffällig, dass diese in Kontrollen und PML-Fällen nur in sehr geringer Anzahl zu finden waren.

In allen MS-Läsionsstadien und innerhalb der NMO-Läsionen waren signifikant mehr CCR2-positive, aus der Peripherie rekrutierte inflammatorische Monozyten als in Kontrollfällen und den Läsionen von PML-PatientInnen nachweisbar. Auch die PPWM von MS-Fällen in allen Stadien wies im Vergleich zu Kontrollen erhöhte Zelldichten auf, im Gegensatz dazu zeigte die PPWM von NMO-Fällen keine erhöhte Zelldichte. Immunhistochemische Analysen in kortikalen MS-Läsionen ergaben, dass der CCR2-Antikörper Zellen färbte, die ebenfalls für KiM1P- und Iba1-positiv waren und keine Mikroglia-marker (TMEM119,

P2Y₁₂) oder T-Zell-Marker (CD3) exprimierten (Lagumersindez-Denis et al. 2017). CCR2 ist ein Rezeptor, der von Makrophagen und in geringem Maße auch von T-Zellen exprimiert wird und für die Migration von Immunzellen durch die BHS wichtig ist (Mahad et al. 2006). Sein Ligand CCL2 ist häufig auf Astrozyten zu finden, beide sind in erhöhter Anzahl in MS-Läsionen und ihren Läsionsrändern zu finden (Prins et al. 2014).

Gadolinium-anreichernde ZNS-Läsionen in der MRT weisen auf eine Störung der Blut-Hirn-Schranke im Bereich der Läsion hin, die häufig mit einer Rekrutierung von Entzündungszellen aus der Peripherie assoziiert ist. MS-PatientInnen können in der T1-Wichtung des MRTs nach Kontrastmittelgabe sowohl aktive Gadolinium-anreichernde Läsionen als auch inaktive Läsionen aufweisen (Filippi et al. 2016).

Die vorliegende Analyse demonstrierte, dass in NMO-Läsionen ebenfalls CCR2-positive periphere Makrophagen vorkommen, allerdings waren diese Zellen nicht in der PPWM der Läsionen zu finden. NMO-PatientInnen wiesen teilweise Gadolinium-aufnehmende Läsionen auf. Die Ausprägung war variabel, und die Aufnahme war unterschiedlich ausgeprägt (Kim et al. 2015).

Die untersuchten PML-Fälle zeigten weder innerhalb der Läsionen noch in der PPWM erhöhte Dichten von CCR2-positiven Zellen. Diese Beobachtung ist im Einklang mit MRT-Befunden der klassischen PML, bei der normalerweise keine Gadolinium-Anreicherung gesehen wird, während ein Teil der mit Natalizumab behandelten PML-PatientInnen eine Gadolinium-Anreicherung in den Läsionen aufweist (Tan und Korálnik 2010).

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, inwieweit die BHS bei den jeweiligen Erkrankungen permeabilisiert wird und ob die Infiltration CCR2-positiver Makrophagen mit einer gleichzeitigen oder vorangegangenen Öffnung der BHS zusammenhängt.

4.1.2 Normal erscheinende weiße Substanz

4.1.2.1 KiM1P-positive aktivierte Mikroglia und Makrophagen in der NAWM

Die Analyse von KiM1P-positiven M1-aktivierten Mikroglia und Makrophagen ergab in der NAWM von MS-Fällen eine im Vergleich zu PML-Fällen und Kontrollen signifikant erhöhte Zelldichte. NMO-Fälle wiesen keine erhöhte KiM1P-Expression in der normal erscheinenden weißen Substanz auf. Vorangegangene MRT-Studien zeigten, dass bei NMO-PatientInnen kein diffuser Schaden der weißen Substanz zu finden ist (Aboul-Enein et al. 2010).

Eine vermehrte Aktivierung der Mikrogliazellen und Makrophagen in der NAWM trat in der hier durchgeführten Analyse nur bei MS-Autopsien auf. In früheren Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass eine diffuse Entzündung in der NAWM von MS-PatientInnen schwach mit der Demyelinisierung in der weißen Substanz korreliert (Kutzelnigg et al. 2005). Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass die NAWM von MS-PatientInnen zahlreiche Veränderungen aufweist. Hierzu zählen unter anderem T-Lymphozyten-Infiltrate, Mikroglia-Aktivierung, ein axonaler Schaden und eine reaktive Astroglie. Darüberhinaus weisen MS-PatientInnen in der NAWM ein proinflammatorisches Aktivierungsmuster der Mikrogliazellen aufweisen. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass der Krankheitsprozess bei der MS nicht nur auf fokale demyelinisierende Läsionen beschränkt ist, sondern das gesamte Gehirn betrifft (Allen et al. 2001; Zeis et al. 2008; van Horssen et al. 2012; Stadelmann et al. 2019).

4.1.2.2 P2Y12-positive Mikrogliazellen in der NAWM

In der NAWM von NMO-, PML- und MS-PatientInnen ergab die durchgeführte Analyse eine signifikante Reduktion der P2Y12-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses stimmt mit vorherigen immunhistochemischen Studien überein, die eine reduzierte Dichte von P2Y12-positiven homöostatischen Mikrogliazellen in der normal erscheinenden weißen Substanz von MS-PatientInnen nachwiesen (Zrzavy et al. 2017).

Der Grund für die Reduktion der P2Y12-Expression bei den einzelnen Erkrankungen kann mit den erhobenen Daten nicht erklärt werden. Erklärungsansätze könnten retrograde axonale Schäden oder proinflammatorische Zytokine sein (Zeis et al. 2008). Der Rezeptor P2Y12 wird unter inflammatorischen Einflüssen herunterreguliert (Wageningen et al. 2019). Genauere Analysen der histopathologischen Veränderungen in der NAWM von PML- und NMO-Fällen wären hier hilfreich. Insbesondere wäre es hilfreich, eine eventuelle Infiltration mit T- und B-Zellen sowie die axonalen, neuronalen und astrozytären Pathologien mit den erhobenen Daten zu korrelieren.

Obwohl ein diffuser Schaden der weißen Substanz in der NAWM von NMO-Patienten nicht offensichtlich zu sein scheint (Aboul-Enein et al. 2010), beschreiben einige MRT-Studien eine spezifische parenchymale Hirnschädigung meist im visuellen und sensomotorischen System von Patienten mit Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen. Es wird vermutet, dass sie auf eine sekundäre Degeneration zurückzuführen sind, die durch eine Opticus-

Neuritis und eine longitudinale extensive transverse Myelitis (LETM) verursacht wird. Schäden außerhalb der beiden Systeme scheinen weniger schwerwiegend zu sein (Pache et al. 2016). Die sekundäre Degeneration und eventuellen Zellschäden, die von den Läsionen ausgehen, könnten mögliche Erklärungsansätze für die verminderte Expression von P2Y12 bei der NMO sein.

4.1.2.3 TMEM119-positive Mikrogliazellen in der NAWM

Die Dichte der TMEM119-positiven Zellen war bei MS-PatientInnen zeigte in der NAWM tendenziell, aber nicht statistisch signifikant reduziert. Dieses Ergebnis stimmt mit vorangegangenen immunhistochemischen Untersuchungen überein, die ebenfalls keinen signifikanten Dichteunterschied von TMEM119-positiven Zellen zwischen Kontrollen und der NAWM von MS-PatientInnen zeigten (Zrzavy et al. 2017).

Überraschenderweise war bei PML- und NMO-PatientInnen eine deutliche Reduktion der TMEM119-Zelldichten in der NAWM im Vergleich zu Kontrollen und auch zu MS-Fällen sichtbar.

Wie bereits erwähnt, wird TMEM119-mRNA durch eine IL4-, IFN γ - und LPS-Behandlung herunterreguliert (Wageningen et al. 2019). IFN γ ist Teil der antiviralen Reaktion (Samuel 2001) und könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die Reduktion der Dichte von TMEM119-positiven Zellen bei der PML sein.

4.1.2.4 CCR2-positive inflammatorische Monozyten in der NAWM

Während CCR2-positive inflammatorische Monozyten in der weißen Substanz von Kontrollfällen, PML- und NMO-PatientInnen sehr selten vorkamen, fiel schon beim qualitativen Mikroskopieren auf, dass sie in der NAWM von MS PatientInnen deutlich zahlreicher auftraten. Dies war in der durchgeführten Analyse ein Alleinstellungsmerkmal der NAWM von MS-PatientInnen. Die CCR2-positiven Zellen waren bei keiner anderen demyelinisierenden Erkrankung so ausgeprägt zu finden. Die Zelldichten zeigten sich in der NAWM sowohl im Vergleich zu Kontrollen als auch im Vergleich zur PML signifikant erhöht.

CCR2 ist der Hauptrezeptor für CC-Chemokine ligand 2 (CCL2), einen potenten Monozyten- und T-Zell-Liganden (Mahad et al. 2006). Vorangegangene immunhistochemische Analysen an Hippocampi von MS- und KontrollpatientInnen zeigten, dass CCL2 vor allem von Astrozyten von exprimiert wird. Es konnte eine vermehrte Expression von CCL2 in Läsionen der weißen Substanz im Hippocampus von MS-PatientInnen nachgewiesen werden.

Die vorangegangene Analyse beschrieb darüber hinaus, dass im Bereich des Hippocampus signifikant mehr CCR2-positive Makrophagen sowohl in aktiven Läsionen als auch am Läsionsrand der weißen Substanz zu finden sind als in den Hippocampi von Kontrollpatienten und MS-Hippocampi ohne Läsionen. Ein Unterschied der CCR2 Expression zwischen der weißen Substanz von Kontrollen und der NAWM von MS-PatientInnen wurde in dieser auf den Hippocampus konzentrierten Studie nicht festgestellt. Auch die CCL2-Expression zeigte sich in dieser Analyse bei MS-PatientInnen nicht erhöht (Prins et al. 2014).

In Tierversuchen mit Marmosets (Krallenaffen) fand man, dass CCR2-positive inflammatorische Monozyten für die Induktion von kortikalen Läsionen bei der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) verantwortlich sind. Die Depletierung CCR2-positiver Zellen mit Hilfe eines humanisierten CCR2-Antikörpers zeigte, dass die Affen nach EAE-Induktion weniger kortikale Läsionen aufwiesen. Die Autoren vermuteten, dass CCR2-positive inflammatorische Monozyten für die kortikale Demyelinisierung entscheidend sind (Lagumersindez-Denis et al. 2017). Die massive Infiltration der NAWM von PatientInnen mit MS durch CCR2-positive Zellen könnte für die Krankheitsentstehung der Multiplen Sklerose von Bedeutung sein.

Eine erhöhte inflammatorische Aktivität in der NAWM, die zur Rekrutierung von Monozyten aus dem peripheren Blut führen kann (Zeis et al. 2008), ist ein möglicher Erklärungsansatz für die dort sichtbare hohe Dichte CCR2-positiver inflammatorischer Monozyten.

4.1.3 Ähnelt das Aktivierungsmuster von Mikroglia- und Makrophagen bei der MS eher einer Virus- oder einer Autoimmunerkrankung?

Die Frage, die wir uns zu Beginn der Analyse gestellt haben, ob das Aktivierungsmuster der Mikroglia und Makrophagen bei der Multiplen Sklerose eher einer Viruserkrankung oder einer Autoimmunerkrankung ähnelt, kann nicht eindeutig beantwortet werden.

Allen hier untersuchten demyelinisierenden Erkrankung war gemeinsam, dass innerhalb aktiv entmarkender Läsionen M1-aktivierte, KiM1P-positive Zellen akkumulierten, wohingegen die durch inflammatorische Zytokine herunterregulierten Mikrogliamarker P2Y12 und TMEM119 in der Tendenz eher vermindert exprimiert wurden.

MS und NMO haben das Vorliegen von CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten innerhalb der Läsionen gemeinsam. Die Infiltration der PPWM mit CCR2-inflammatorischen Monozyten ist nur bei der MS zu beobachten. Im Gegensatz dazu waren innerhalb der Läsionen und in der PPWM von PML-Autopsien fast keine CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten zu finden. Bei allen Erkrankungen wurde in der NAWM der homöostatische Mikroglia-Marker P2Y12 vermindert exprimiert.

Alleinstellungsmerkmale der MS gegenüber den anderen Erkrankungen sind:

1. Die weniger ausgeprägte Regulation von TMEM119 in der PPWM und der NAWM. Hierbei sind allerdings der unterschiedliche Krankheitsverlauf und die unterschiedliche Geschwindigkeit bei der Läsionsentstehung zu berücksichtigen. Die NAWM von MS-PatientInnen zeigte im Gegensatz zu NMO- und PML-PatientInnen keine signifikante Reduktion von TMEM119. In aktiven MS-Fällen zeigte sich innerhalb der Läsionen und der PPWM eine hohe Dichte an TMEM119-positiven Mikrogliazellen, die in keiner der anderen Erkrankungen nachzuweisen war.

2. Das höhere Aktivierungsniveau der Mikroglia und Makrophagen in der NAWM und die massive Infiltration von CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten in die NAWM.

Die vorliegenden Daten legen nahe, dass in der NAWM der MS deutlich stärkere Entzündungsprozesse vorhanden sind als bei den anderen demyelinisierenden Erkrankungen. Die Daten stützen die These, dass es sich bei der MS um eine Erkrankung des gesamten Gehirns und nicht nur der demyelinisierten Areale handelt (Zeis et al. 2008; van Horssen et al. 2012; Stadelmann et al. 2019).

4.2 Limitationen, Ausblick und offene Fragen

Mikrogliazellen und Makrophagen haben komplexe Funktionen innerhalb des Gehirns. Auch ihre Morphologie ist sehr heterogen, was die Auswertung der Immunhistochemischen Präparate zum Teil erschwerte. Ihre Aktivierungszustände sind nicht eindeutig in Richtung M1- oder M2-Aktivierung zu bewerten, sondern es bestehen fließende Übergänge zwischen diesen Zuständen (Vogel et al. 2013; Zhou et al. 2017). Die durchgeführte Analyse hat einen deskriptiven Charakter, und die Fragen, warum bestimmte Proteine nicht oder weniger exprimiert werden, können mit Hilfe dieser Daten nicht vollständig beantwortet

werden. Des Weiteren muss bei der Interpretation der Ergebnisse darauf geachtet werden, dass wir vereinfacht von dem Ansatz ausgegangen sind, nur eine Autoimmun- (NMO) und eine Viruserkrankung (PML) zu analysieren. Ferner nehmen wir an, dass der klinischen Diagnose der MS um eine und nicht mehrere Erkrankungen zugrunde liegt. Ob es sich bei den hier verwendeten Autopsien um für diese Gruppe von Erkrankungen typische Fälle handelt, kann mit den erhobenen Daten nicht geklärt werden.

In der vorliegenden Studie zeigten alle demyelinisierenden Erkrankungen KiM1P- und MBP-positive Phagozyten. Das Protein KiM1P ist ein häufig in immunhistochemischen Analysen von MS verwendeter Marker für aktivierte Mikroglia und Makrophagen (Stankov et al. 2015). Neuere Studien zeigen, dass die Expression von KiM1P eher mit einem proinflammatorischen M1-Aktivierungstyp und der Phagozytose assoziiert ist (Hendrickx et al. 2017; Yang et al. 2018). Die Quantifizierung in der weißen Substanz von Kontrollen zeigte eine über 100 Zellen pro mm^2 betragende Differenz zwischen der Dichte KiM1P-positiver Zellen und den TMEM119/P2Y12-positiven Mikrogliazellen. Anhand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass KiM1P die nicht aktivierten Mikrogliazellen nicht anfärbt. In dieser Arbeit wäre deshalb das zusätzliche Hinzuziehen eines Panmakrophagen/Mikroglia-markers, wie beispielsweise von Iba1 (Zrzavy et al. 2017) als Basiswert sinnvoll gewesen. Mithilfe eines Panphagozytenmarkers könnte besser beurteilt werden, wie viele Mikroglia und Makrophagen von den durch pro- und antiinflammatorische Aktivität beeinflussten Markerproteinen nicht gefärbt und somit nicht quantifiziert wurden.

P2Y12 und TMEM119 gelten als sensitive Mikroglia-marker. Beide werden jedoch durch Zytokine reguliert (Wageningen et al. 2019). Hierdurch ergab sich eine weitere Limitation der Studie. In PML-Läsionen beispielsweise waren einerseits sehr wenige P2Y12- und TMEM119-positive Mikrogliazellen, andererseits auch fast keine CCR2 positiven Makrophagen zu finden. Mit Hilfe der hier durchgeführten Analyse kann keine Aussage darüber getroffen werden, welcher Herkunft die KiM1P-positiven Zellen bei der PML sind.

Hier wäre eine Ergänzung der Analyse durch das Hinzuziehen eines weniger durch inflammatorische oder antiinflammatorische Einflüsse beeinflussbaren Mikroglia-markers wie beispielsweise des Fraktalkinrezeptors CX3CR1 (Greter et al. 2015) sinnvoll. Auch das Hinzuziehen eines weiteren Markerproteins für periphere Makrophagen wäre sinnvoll, um bspw. die geringe Expression von CCR2 in den PML-Fällen zu überprüfen. Als

Markerprotein für periphere Makrophagen würde sich zum Beispiel der Marker CXCR4 (Werner et al. 2020) eignen. Um die Herkunft der Phagozyten eindeutiger zu charakterisieren, wäre es sinnvoll, Analysen mit Fluoreszenz-Doppelmarkierungen mit CCR2-/TMEM119- und CCR2-/P2Y12-Antikörpern durchzuführen. Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern werden in Paraffin eingebettetem Material allerdings häufig durch eine hohe Hintergrundfärbung erschwert.

Die durchgeführte Studie wirft weitere Fragen auf: Sowohl bei MS als auch PML und NMO zeigte sich eine verminderte Expression der homöostatischen Mikroglia-Marker TMEM119 und P2Y12 in der NAWM. Die Reduktion von TMEM119 war bei NMO und PML deutlich ausgeprägter. Den Ergebnissen könnten die verschiedenen Erkrankungsverläufe zu Grunde liegen. Trotzdem stellt sich die Frage, welche Entzündungsprozesse im Detail ablaufen. MS-PatientInnen zeigen in der NAWM eine vermehrte Immuneinfiltration und einen diffusen Entzündungsprozess (Frischer et al. 2009). Genauere Analysen zur Entzündungsaktivität in der NAWM von PML- und NMO-Fällen wären für die Interpretation der erhobenen Daten von Nutzen.

Aufgrund des Zusammenhangs von PML und Immunsuppression ist die entzündliche Infiltration von PML-Läsionen häufig gering und besteht zum größten Teil aus CD8-T-Lymphozyten und wenigen B-Zellen (Metz et al. 2012; Stadelmann et al. 2019). Bei NMO-Läsionen sind einige T-Zellen, Plasmazellen und, abhängig vom Läsionsstadium, auch neutrophile und eosinophile Granulozyten zu finden (Brück et al. 2012; Stadelmann et al. 2019).

Die Läsionsbeurteilung und der Vergleich der Läsionen von MS, NMO und PML in Autopsien sind aufgrund der unterschiedlichen, teilweise auch unbekanntem Krankheitsdauern und Verläufe schwierig. Bei den untersuchten Läsionen ist das Alter der Läsion unklar, und die klinischen Daten der PatientInnen sind lückenhaft. Während die MS einen chronisch-inflammatorischen Charakter (Frischer et al. 2015), die NMO einen deutlich schwereren, aber auch chronischen Verlauf nimmt (Jarius et al. 2014), weist die PML häufig einen raschen Verlauf auf (Tan und Koralnik 2010). Bei der MS ist die fokale Entzündungsreaktion in der weißen Substanz bei klassischen aktiven Läsionen am ausgeprägtesten, gefolgt von Läsionen mit langsamer Ausdehnung am Läsionsrand (kombiniert-aktiv/inaktive Läsionen) und inaktiven Plaques (Kutzelnigg et al. 2005). Die klinisch sehr unterschiedlichen Verläufe der Erkrankungen MS, PML und NMO machen somit die Läsionsvergleiche

schwierig. Zu Beginn dieser Studie wurden alle Läsionen hinsichtlich ihrer entmarkenden Aktivität eingeteilt. Hierzu wurde mithilfe der MBP-Doppelfärbung beurteilt, ob in den Läsionen aktiv Myelin phagozytiert wird oder nicht. MS-Läsionen werden anhand der Phagozytoseaktivität und des Erscheinungsbilds der Phagozyten in Stadien unterteilt. Bei der Beurteilung der Daten ist auch zu berücksichtigen, dass nur vier NMO-Läsionen zur Verfügung standen. Aufgrund der geringen Läsionszahl wurden bei der NMO Läsionen mit aktiver Phagozytose und inaktivere entmarkende Läsionen in einer Gruppe zusammengefasst. Bei den PML-Fällen wiesen alle Fälle eine hohe Entmarkungsaktivität auf.

Für Nicht-Läsionsbereiche bei der PML und NMO sind in der Literatur nur wenige Daten verfügbar. Auch wäre es interessant zu klären, ob die Rekrutierung von CCR2-positiven inflammatorischen Monozyten mit einer Aktivierung und Infiltration von T-Zellen zusammenhängt. Ein weiterer Erklärungsansatz für die beobachtete Reduktion der homöostatischen Mikroglia marker wäre, dass es zu einer von den Läsionen ausgehenden retrograden axonalen Schädigung kommt (Zeis et al. 2008). Der Verlust von Neuronen, Axonen und Oligodendrozyten könnte ebenfalls zu einer vermehrten Aktivierung der Mikrogliazellen führen (Boven et al. 2006). Um diese Fragen zu klären sollte in einer weiteren eingehende Analyse der NAWM von MS-, NMO- und PML-Patienten die axonale Schädigung und Dichte sowie die Infiltration durch T- und B-Lymphozyten untersucht und mit den von mir erhobenen Daten zur Mikrogliaaktivierung korreliert werden.

5 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine demyelinisierende Erkrankung mit unbekanntem Pathomechanismus. Mikroglia und Makrophagen akkumulieren in MS-Läsionen und werden als Auslöser für die Demyelinisierungskaskade diskutiert. Auch bei anderen Erkrankungen sind demyelinisierende Läsionen zu finden wie bei der Autoimmunerkrankung Neuromyelitis optica (NMO) und der durch das JC-Virus verursachten progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML).

In der vorliegenden Arbeit wurden aus dem Gehirn gewonnene Paraffinschnitte von 30 Autopsie-Fällen mit MS, 7 Autopsie-Fällen mit NMO und 12 Autopsie-Fällen mit PML sowie 16 Kontrollfällen mit rasch zum Tode führenden Erkrankungen ohne Hinweis auf entzündliche ZNS-Erkrankungen mit den Antikörpern KiM1P, P2Y12, TMEM119 und CCR2 immunhistochemisch gefärbt. Die Färbungen wurden quantitativ ausgewertet und die relativen Häufigkeiten der angefärbten Zellen mit nicht-parametrischen statistischen Verfahren verglichen.

Im Vergleich zur normalen weißen Substanz von Kontrollen, NMO und PML wiesen MS-Fälle eine erhöhte Zahl CCR2-positiver inflammatorischer Monozyten sowohl in der periplaque weißen Substanz (PPWM) als auch in der normal erscheinenden weißen Substanz (NAWM) auf. Des Weiteren infiltrierten CCR2-positiv inflammatorische Monozyten die Läsionen von NMO- und MS-, nicht aber von PML-Fällen. In den Läsionen von MS-, NMO- und PML-Fällen akkumulierten KiM1P-positiv aktivierte Mikrogliazellen und Makrophagen. In der NAWM von MS-Fällen waren mehr KiM1P-positiv aktivierte Mikrogliazellen und Makrophagen zu finden als bei den Kontrollen und den anderen demyelinisierenden Erkrankungen. Im Gegensatz zu MS-Fällen und Kontrollen wiesen PML- und NMO-Fälle reduzierte Zahlen von TMEM119-positiven Mikrogliazellen in der PPWM und NAWM auf. Die TMEM119-exprimierenden homöostatischen Mikrogliazellen waren in den Läsionen von PML, NMO und in den inaktiven Stadien der MS in verminderter Zahl zu finden. Es kam bei allen drei demyelinisierenden Erkrankungen zu einem Verlust homöostatischer P2Y12-positiver Mikrogliazellen sowohl in den Läsionen als auch außerhalb der Läsionen (NAWM, PPWM).

Phagozyten bei der MS stammen sowohl aus dem Mikroglia-pool als auch aus dem peripheren Blut. Im Gegensatz zur NMO und PML fanden wir in der NAWM von MS-PatientInnen mehr inflammatorische Monozyten und aktivierte Mikrogliazellen als in der weißen Substanz von Kontroll-Fällen. Diese Befunde sprechen dafür, dass in der NAWM und in der PPWM von MS Patient*Innen in erheblichem Maße entzündliche Veränderungen ablaufen.

6 Anhang

Tabelle 11 McDonald Kriterien 2017 nach Thompson et al. 2018

	Klinische Präsentation	Läsion im MRT	Zusätzliche Parameter, die für eine MS-Diagnose gegeben sein müssen
Schubförmige MS („relapsing-remitting“, RRMS)			
1	≥ 2 klinisch nachgewiesene Schübe	≥2	Keine
2	≥2 klinisch nachgewiesene Schübe	1	Keine
3	≥2 klinisch nachgewiesene Schübe	1	Räumliche Dissemination: entweder ein klinisch nachgewiesener Schub einer zweiten, räumlich getrennten klinisch nachgewiesenen Läsion oder Nachweis der räumlichen Dissemination im MRT
4	1 klinisch nachgewiesener Schub	≥ 2	Zeitliche Dissemination: entweder ein weiterer klinisch nachgewiesener Schub oder Nachweis der zeitlichen Dissemination im MRT oder oligoklonale Banden im Liquor, die im Serum nicht vorhanden sind
5	1 klinisch nachgewiesener Schub	1	Räumliche und zeitliche Dissemination
Primär progrediente MS (PPMS)			
6	≥ 1 Jahr klinische Behinderungszunahme ohne Schübe		Zutreffen von mindestens zwei der folgenden drei Punkte: - mindestens eine T2-Läsion periventrikulär, kortikal/juxtakortikal oder infratentoriell - mindestens 2 T2 Läsionen im spinalen MRT - Nachweis von oligoklonalen IgG-Banden im Liquor

Die Tabelle zeigt die Kriterien, die für eine MS-Diagnose erfüllt sein müssen.

Tabelle 12 Therapie der Multiplen Sklerose nach Gold et. al 2014

Indi- ka- tion	CIS		RRMS			SPMS	
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-) aktive Ver- laufform		1.Wahl Alemtu- zumab Fingolimod Natali-zu- mab	2.Wahl Mito-xant- ron (Cyclo- phospha- mid)	3.Wahl Experi- mentelle Verfah- ren	Mit auf-ge- setztem Schub	Ohne auf- gesetzten Schub
	Moderate/ Milde Verlaufform	Glati- rameracetat IFN-β1a i.m. IFN-β1a s.c. IFN-β1b s.c.	Dimethylfumarat Glatirameracetat IFN-β1a i.m. FN-β1a s.c. IFN-β1b s.c. PEG-IFN-β1a s.c. Teriflunomid (Azathioprin)1 (IVIg) 2			IFN-β1a s.c. IFN-β1b s.c. Mitoxantron (Cyclophos- phamid)*	Mito-xant- ron (Cyclo- phos-pha- mid)*
Schubtherapie	1. Wahl		Methylprednisolon-Pulstherapie				
	2. Wahl		Plasmaseparation				

: Zugelassen wenn IFN-β nicht möglich

2: Einsatz in postpartalen Einzelfällen zugelassen, insbesondere bei fehlenden Alternativen

* Zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunerkrankungen, bei fulminanten Verläufen möglichst nur in Zentren

Die Tabelle 12 zeigt das Stufenschema der MS-Therapie und die Möglichkeiten der Therapieeskalation aufgeteilt in Schubtherapie und Verlaufsmodifizierende Therapie.

Tabelle 13 Histologische Charakterisierung von aktiven, kombiniert aktiven/inaktiven und inaktiven MS Läsionen modifiziert nach Kuhlmann et al. 2017

	Makrophagen/ Mikroglia in der Läsion	Makrophagen/ Mikroglia nur am Läsionsrand	LFB+ oder MBP+ oder PLP+ Abbauprodukte in Makrophagen/ Mikroglia	CNP+ oder MAG+ oder MOG+ Abbauprodukte in Makrophagen/ Mikroglia
Aktiv	+	-	±	±
<i>Aktiv und früh demyelinisierend</i>	+	-	+	+
<i>Aktiv und spät demyelinisierend</i>	+	-	+	-
<i>Aktiv und post-demyelinisierend</i>	+	-	-	-
Kombiniert aktiv/ inaktiv	-	+	±	±
<i>Kombiniert aktiv/ inaktiv und demyelinisierend</i>	-	+	+	±
<i>Kombiniert aktiv/inaktiv und post-demyelinisierend</i>	-	+	-	-
Inaktiv	-	-	-	-

Die Tabelle zeigt die unterschiedlichen Läsionstypen und die jeweiligen Unterformen

7 Literaturverzeichnis

- Aboul-Enein F, Krššák M, Höftberger R, Prayer D, Kristoferitsch W (2010): Diffuse White Matter Damage Is Absent in Neuromyelitis Optica. *Am J Neuroradiol* 31, 76–79
- Allen IV, McQuaid S, Mirakhur M, Nevin G (2001): Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 22, 141–144
- Åström K-E, Mancall EL, Richardson EP (1958): Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain* 81, 93–111
- Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL (2018): Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 97, 742–768
- Banwell B, Ghezzi A, Bar-Or A, Mikaeloff Y, Tardieu M (2007): Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. *Lancet Neurol* 6, 887–902
- Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, et al. (2016): New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E1738–E1746
- Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R (2004): Expansion and Functional Relevance of High-Avidity Myelin-Specific CD4⁺ T Cells in Multiple Sclerosis. *J Immunol* 172, 3893–3904
- Bitsch A, da Costa C, Bunkowski S, Weber F, Rieckmann P, Brück W (1998): Identification of macrophage populations expressing tumor necrosis factor-alpha mRNA in acute multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 95, 373–377
- Bogie JFJ, Stinissen P, Hendriks JJA (2014): Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 128, 191–213
- Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD (2006): Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain* 129, 517–526
- Brod SA (2020): Review of approved NMO therapies based on mechanism of action, efficacy and long-term effects. *Mult Scler Relat Disord* 46, 102538
- Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmarch HA, Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology* 38, 788–796
- Brück W, Popescu B, Lucchinetti CF, Markovic-Plese S, Gold R, Thal DR, Metz I (2012): Neuromyelitis optica lesions may inform multiple sclerosis heterogeneity debate. *Annals of Neurology* 72, 385–394
- Butovsky O, Weiner HL (2018): Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19, 622

- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, et al. (2014): Identification of a Unique TGF- β Dependent Molecular and Functional Signature in Microglia. *Nat Neurosci* 17, 131–143
- Colonna M, Butovsky O (2017): Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35, 441–468
- Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Brück W, Priller J, Nau R, Prinz M (2006): Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129, 2394–2403
- Ebers GC, Sadovnick AD (1994): Association studies in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 53, 117–122
- Emmer A, Staege MS, Kornhuber ME (2014): The Retrovirus/Superantigen Hypothesis of Multiple Sclerosis. *Cell Mol Neurobiol* 34, 1087–1096
- Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, Stefano ND, Evangelou N, Kappos L, Rovira A, Sastre-Garriga J, Tintorè M, Frederiksen JL, et al. (2016): MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol* 15, 292–303
- 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
- Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, Mandrekar J, Bramow S, Metz I, Brück W, et al. (2015): Clinical and Pathological Insights into the Dynamic Nature of the White Matter Multiple Sclerosis Plaque. *Ann Neurol* 78, 710
- Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, et al. (2012): Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485, 517–521
- Gallego-Delgado P, James R, Browne E, Meng J, Umashankar S, Tan L, Picon C, Mazarakis ND, Faisal AA, Howell OW, Reynolds R (2020): Neuroinflammation in the normal-appearing white matter (NAWM) of the multiple sclerosis brain causes abnormalities at the nodes of Ranvier. *PLoS Biology* 18, e3001008
- Getts DR, Chastain EML, Terry RL, Miller SD (2013): Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunol Rev* 255, 197–209
- Gold R, Hanschke S, Hemmer B, Wiendl H (2012): DGN/ KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS, Deutsche Gesellschaft für Neurologie: <https://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose> (Zugriff 4.4.2019)
- Gold R, Hanschke S, Hemmer B, Wiendl H (2014): DGN/ KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS, Deutsche Gesellschaft für Neurologie: https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2012/pdf/030-0501_S2e_Multiple_Sklerose_Diagnostik_Therapie_2014-08_verlaengert.pdf (Zugriff 25.3.2020)
- Graber DJ, Levy M, Kerr D, Wade WF (2008): Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4. *J Neuroinflammation* 5, 22

- Greter M, Lelios I, Croxford AL (2015): Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol* 6, 249
- Haage V, Semtner M, Vidal RO, Hernandez DP, Pong WW, Chen Z, Hambardzumyan D, Magrini V, Ly A, Walker J, et al. (2019): Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in health and glioma. *Acta Neuropathol Commun* 7, 20
- Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Höftberger R, Bagnato F, Grabner G, Trattinig S, Pfeifering S, Brück W, Lassmann H (2016): The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain* 139, 807–815
- Hendrickx DAE, van Scheppingen J, van der Poel M, Bossers K, Schuurman KG, van Eden CG, Hol EM, Hamann J, Huitinga I (2017): Gene Expression Profiling of Multiple Sclerosis Pathology Identifies Early Patterns of Demyelination Surrounding Chronic Active Lesions. *Front Immunol* 8, 1810
- Hisa I, Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Kitazawa R, Kitazawa S, Komori T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H (2011): Parathyroid Hormone-responsive Smad3-related Factor, Tmem119, Promotes Osteoblast Differentiation and Interacts with the Bone Morphogenetic Protein-Runx2 Pathway. *J Biol Chem*. 286, 9787
- van Horssen J, Singh S, van der Pol S, Kipp M, Lim JL, Peferoen L, Gerritsen W, Kooi E-J, Witte ME, Geurts JJ, et al. (2012): Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J Neuroinflammation* 9, 156
- Howell OW, Rundle JL, Garg A, Komada M, Brophy PJ, Reynolds R (2010): Activated microglia mediate axo-glial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 1017
- Jäckle K, Zeis T, Schaeren-Wiemers N, Junker A, van der Meer F, Kramann N, Stadelmann C, Brück W (2020): Molecular signature of slowly expanding lesions in progressive multiple sclerosis. *Brain* 143, 2073–2088
- Jarius S, Wildemann B, Paul F (2014): Neuromyelitis optica: clinical features, immunopathogenesis and treatment. *J Clin Exp Immunol* 176, 149
- Jasiak-Zatonska M, Kalinowska-Lyszczarz A, Michalak S, Kozubski W (2016): The Immunology of Neuromyelitis Optica—Current Knowledge, Clinical Implications, Controversies and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 17, 273
- Junker A, Wozniak J, Voigt D, Scheidt U, Antel J, Wegner C, Brück W, Stadelmann C (2020): Extensive subpial cortical demyelination is specific to multiple sclerosis. *Brain Pathol* 30, 641–652
- Kim HJ, Paul F, Lana-Peixoto MA, Tenembaum S, Asgari N, Palace J, Klawiter EC, Sato DK, de Seze J, Wuerfel J, et al. (2015): MRI characteristics of neuromyelitis optica spectrum disorder. *Neurology* 84, 1165–1173
- Kettenmann H, Hanisch U, Noda M, Verkhratsky A (2011): Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91, 461–553
- Koralnik IJ (2006): Progressive multifocal leukoencephalopathy revisited: Has the disease outgrown its name? *Ann Neurol* 60, 162–173

- Kragh CL, Ubhi K, Wyss-Corey T, Masliah E (2012): Autophagy in Dementias. *Brain Pathol* 22, 99
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202–2212
- Kuhlmann T, 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
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2705–2712
- Lagumersindez-Denis N, Wrzos C, Mack M, Winkler A, van der Meer F, Reinert MC, Hollasch H, Flach A, Brühl H, Cullen E, et al. (2017): Differential contribution of immune effector mechanisms to cortical demyelination in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 134, 15–34
- Lanza Cariccio V, Bramanti P, Mazzon E (2018): Biomarkers identification for PML monitoring, during Natalizumab (Tysabri®) treatment in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 20, 93–99
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007): The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. *Brain Pathol* 17, 210–218
- Legroux L, Arbour N (2015): Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol* 10, 528–546
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR (2005): IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202, 473–477
- Love S (2006): Demyelinating diseases. *J Clin Pathol* 59, 1151–1159
- Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907–911
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707–717
- Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, Trebst C, Weinshenker B, Wingerchuk D, Parisi JE, Lassmann H (2002): A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125, 1450
- Mahad D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisäkk P, Tucky B, Kidd G, Kingsbury GA, Chang A, Fox RJ, et al. (2006): Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* 129, 212–223
- Martyn CN, Gale CR (1997): The epidemiology of multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 95, 3–7

- Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Böttcher C, Amann L, Sagar, Scheiwe C, Nessler S, Kunz P, van Loo G, et al. (2019): Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388–392
- Metz I, Radue E-W, Oterino A, Kümpfel T, Wiendl H, Schippling S, Kuhle J, Sahraian MA, Gray F, Jakl V, et al. (2012): Pathology of immune reconstitution inflammatory syndrome in multiple sclerosis with natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathologica* 123, 235
- Meyding-Lamadé U, Craemer E, Jacobi C, Krone B, Pfausler B, Prange H, Schuchardt E, Meylan P, Schmutzhard E (2018): Virale Meningoenzephalitis, S1-Leitlinie, 2018; in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (Zugriff am 05.04.2019)
- Micu I, Plemel JR, Caprariello AV, Nave K-A, Stys PK (2018): Axo-myelinic neurotransmission: a novel mode of cell signalling in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 19, 49–58
- 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
- Misu T, Fujihara K, Kakita A, Konno H, Nakamura M, Watanabe S, Takahashi T, Nakashima I, Takahashi H, Itoyama Y (2007): Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1224–1234
- Moll NM, Rietsch AM, Ransohoff AJ, Cossoy MB, Huang D, Eichler FS, Trapp BD et al (2008): Cortical demyelination in PML and MS: Similarities and differences. *Neurology* 70, 336–43
- Moore CS, Ase AR, Kinsara A, Rao VTS, Michell-Robinson M, Leong SY, Butovsky O, Ludwin SK, Séguéla P, Bar-Or A, Antel JP (2015): P2Y12 expression and function in alternatively activated human microglia. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2, e80
- Mulisch M: Immunlokalisation. In: Welsch U (Hrsg.): *Romeis - Mikroskopische Technik*. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg 2015, 417–443
- Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N (2012): Current Concepts in Multiple Sclerosis: Autoimmunity Versus Oligodendroglipathy. *Clinic Rev Allerg Immunol* 42, 26–34
- Nexø BA, Christensen T, Frederiksen J, Møller-Larsen A, Oturai AB, Villesen P, Hansen B, Nissen KK, Laska MJ, Petersen TS, et al. (2011): The Etiology of Multiple Sclerosis: Genetic Evidence for the Involvement of the Human Endogenous Retrovirus HERV-Fc1. *PLoS One* 6, e16652
- O'Connor T, Borsig L, Heikenwalder M (2015): CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 15, 105–118
- Pache F, Zimmermann H, Finke C, Lacheta A, Papazoglou S, Kuchling J, Wuerfel J, Hamm B, Ruprecht K, Paul F, et al. (2016): Brain parenchymal damage in neuromyelitis optica spectrum disorder – A multimodal MRI study. *Eur Radiol* 26, 4413–4422

- Pandit L (2015): Neuromyelitis optica spectrum disorders: An update. *Ann Indian Acad Neurol* 18, S11–S15
- Parratt JD, Prineas JW (2010): Neuromyelitis optica: a demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes. *Mult Scler* 16, 1156–1172
- 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
- Pavlovic D, Patera AC, Nyberg F, Gerber M, Liu M (2015): Progressive multifocal leukoencephalopathy: current treatment options and future perspectives. *Ther Adv Neurol Disord* 8, 255–273
- Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA (2006): Neuromyelitis Optica Brain Lesions Localized at Sites of High Aquaporin 4 Expression. *Arch Neurol* 63, 964–968
- Poel M van der, Ulas T, Mizze MR, Hsiao C-C, Miedema SSM, Adelia, Schuurman KG, Helder B, Tas SW, Schultze JL, et al. (2019): Transcriptional profiling of human microglia reveals grey–white matter heterogeneity and multiple sclerosis-associated changes. *Nat Commun* 10, 1139
- Prins M, Dutta R, Baselmans B, Brevé JJP, Bol JGJM, Deckard SA, van der Valk P, Amor S, Trapp BD, de Vries HE, et al. (2014): Discrepancy in CCL2 and CCR2 expression in white versus grey matter hippocampal lesions of Multiple Sclerosis patients. *Acta Neuropathol Commun* 2, 543
- Ransohoff RM, Cardona AE (2010): The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253–262
- Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, Mandler RN, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF (2007): Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1194–1205
- Sahraian MA, Radue E-W, Eshaghi A, Besliu S, Minagar A (2012): Progressive multifocal leukoencephalopathy: a review of the neuroimaging features and differential diagnosis. *Eur J Neurol* 19, 1060–1069
- Samuel CE (2001): Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778–809
- Satoh J, Kino Y, Yanaizu M, Tosaki Y, Sakai K, Ishida T, Saito Y (2016a): Expression of gp91phox and p22phox, catalytic subunits of NADPH oxidase, on microglia in Nasu-Hakola disease brains. *Intractable Rare Dis Res* 5, 275–279
- Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y (2016b): TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology* 36, 39–49
- Schwenkenbecher P, Wurster U, Konen FF, Gingele S, Sühs K-W, Wattjes MP, Stangel M, Skripuletz T (2019): Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 10

- Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC, et al. (1997): Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 3, 1394–1397
- Sospedra M, Martin R (2016): Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 36, 115–127
- Sotelo J, Corona T (2011): Varicella Zoster Virus and Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *Mult Scler Int* 2011, 214763
- Stadelmann C, Wegner C, Brück W (2011): Inflammation, demyelination, and degeneration — Recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1812, 275–282
- 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
- Stankov A, Belakaposka-Srpanova V, Bitoljanu N, Cakar L, Cakar Z, Rosoklija G (2015): Visualisation of Microglia with the use of Immunohistochemical Double Staining Method for CD-68 and Iba-1 of Cerebral Tissue Samples in Cases of Brain Contusions. *PRILOZI* 36, 141–145
- Steinbach K, Vincenti I, Egervari K, Kreutzfeldt M, Meer F van der, Page N, Klimek B, Rositto-Borlat I, Liberto GD, Muschaweckh A, et al. (2019): Brain-resident memory T cells generated early in life predispose to autoimmune disease in mice. *Science Translational Medicine* 11, eaav5519
- Tan CS, Korálnik IJ (2010): Beyond progressive multifocal leukoencephalopathy: expanded pathogenesis of JC virus infection in the central nervous system. *Lancet Neurol* 9, 425–437
- 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* 9 17, 162–173
- Trebst C, Berthele A, Jarius S, Kümpfel T, Schippling S, Wildemann B, Wilke C, Neuromyelitis optica Studiengruppe (NEMOS) (2011): Diagnostik und Therapie der Neuromyelitis optica. *Nervenarzt* 82, 768–777
- Trebst C, Jarius S, Berthele A, Paul F, Schippling S, Wildemann B, Borisow N, Kleiter I, Aktas O, Kümpfel T, Group (NEMOS) NOS (2014): Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: Recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). *J Neurol* 261, 1
- Uzawa A, Masahiro M, Kuwabara S (2014): Cytokines and Chemokines in Neuromyelitis Optica: Pathogenetic and Therapeutic Implications. *Brain Pathology* 24, 67–73
- Verkman AS, Phuan P-W, Asavapanumas N, Tradtrantip L (2013): Biology of AQP4 and anti-AQP4 antibody: therapeutic implications. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 23, 684

- Vogel DY, Vereyken EJ, Glim JE, Heijnen PD, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J, Dijkstra CD (2013): Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation* 10, 35
- Wageningen TA van, Vlaar E, Kooij G, Jongenelen CAM, Geurts JGG, Dam A-M van (2019): Regulation of microglial TMEM119 and P2RY12 immunoreactivity in multiple sclerosis white and grey matter lesions is dependent on their inflammatory environment. *Acta Neuropathol Commun* 7, 206
- Walker DG, Lue L-F (2015): Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther* 7, 56
- Wang Jiaying, Wang Jiajia, Wang Jincheng, Yang B, Weng Q, He Q (2019): Targeting Microglia and Macrophages: A Potential Treatment Strategy for Multiple Sclerosis. *Front Pharmacol* 10, 286
- Wekerle H (2008): Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis* 67, iii56–iii60
- Werner Y, Mass E, Kumar PA, Ulas T, Händler K, Horne A, Klee K, Lupp A, Schütz D, Saaber F, et al. (2020): Cxcr4 distinguishes HSC-derived monocytes from microglia and reveals monocyte immune responses to experimental stroke. *Nat Neurosci* 23, 351–362
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG (2006): Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66, 1485–1489
- Winkler A, Wrzos C, Haberl M, Weil M-T, Gao M, Möbius W, Odoardi F, Thal DR, Chang M, Opdenakker G, et al. (2021): Blood-brain barrier resealing in neuromyelitis optica occurs independently of astrocyte regeneration. *J Clin Invest* 131, e141694
- Wollebo HS, Cotto B, Adiga R, Langford D, White MK (2016): Expression of signaling molecules in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr HIV Res* 14, 47
- Wrzos C, Winkler A, Metz I, Kayser DM, Thal DR, Wegner C, Brück W, Nessler S, Bennett JL, Stadelmann C (2014): Early loss of oligodendrocytes in human and experimental neuromyelitis optica lesions. *Acta Neuropathol* 127, 523
- Wu Y, Zhong L, Geng J (2019): Neuromyelitis optica spectrum disorder: Pathogenesis, treatment, and experimental models. *Mult Scler Relat Disord* 27, 412–418
- Wüthrich C, Batson S, Korálnik IJ (2015): Lack of Major Histocompatibility Complex Class I Upregulation and Restrictive Infection by JC Virus Hampers Detection of Neurons by T-Lymphocytes in the Central Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol* 74, 791–803
- Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Coteleur AC, et al. (2014): Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 211, 1533

- Yang J, Zhao Y, Zhang L, Fan H, Qi C, Zhang K, Liu X, Fei L, Chen S, Wang M, et al. (2018): RIPK3/MLKL-Mediated Neuronal Necroptosis Modulates the M1/M2 Polarization of Microglia/Macrophages in the Ischemic Cortex. *Cereb Cortex* 28, 2622–2635
- Yang SS, Lin L, Liu Y, Wang J, Chu J, Zhang T, Ning L-N, Shi Y, Fang Y-Y, Zeng P, et al. (2016): High Morphologic Plasticity of Microglia/Macrophages Following Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Int J Mol Sci* 17, 407-409
- Zalc B (2018): One hundred and fifty years ago Charcot reported multiple sclerosis as a new neurological disease. *Brain* 141, 3482–3488
- Zeis T, Graumann U, Reynolds R, Schaeren-Wiemers N (2008): Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain* 131, 288–303
- Zhou T, Huang Z, Sun X, Zhu X, Zhou L, Li M, Cheng B, Liu X, He C (2017): Microglia Polarization with M1/M2 Phenotype Changes in rd1 Mouse Model of Retinal Degeneration. *Front Neuroanat* 11, 77
- Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H (2017): Loss of ‘homeostatic’ microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain* 140, 1900
- Zrzavy T, Höftberger R, Berger T, Rauschka H, Butovsky O, Weiner H, Lassmann H (2019): Pro-inflammatory activation of microglia in the brain of patients with sepsis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 45, 278

Lebenslauf

Am 11.06.1994 wurde ich, Cora Alexandra Nau-Gietz, in Kassel geboren. Nach dem Besuch der Eibenwaldschule in Bovenden-Eddigehausen und des Otto-Hahn-Gymnasiums in Göttingen legte ich dort im Jahr 2012 meine Abiturprüfung ab. Anschließend absolvierte ich eine 2-jährige Ausbildung zur Rettungsassistentin bei der Berufsfeuerwehr Göttingen. Im Sommersemester 2015 begann ich mein Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Zum Wintersemester 2015/16 wechselte ich an die Georg-August-Universität Göttingen. Im Februar 2019 begann ich im Rahmen eines Freisemesters mit meiner Promotion am Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler. Unterstützt wurde die Arbeit durch das medMS-Doktorandenprojekt der Gemeinnützigen Hertie- Stiftung, Frankfurt/Main, und durch das Promotionskolleg der Universitätsmedizin Göttingen. Im November 2021 beendete ich erfolgreich das Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen.