

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

Zeitverlauf und Therapie axonaler Schädigung bei NMO

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Viviane Rebekka Svehaug, geb. Heide

aus

Tübingen

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler
Ko-Referent/in:
Drittreferent/in:
Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Zeitverlauf und Therapie axonaler Schädigung bei NMO" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Neuromyelitis optica.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Pathogenese.....	2
1.1.3 Histopathologie und Stadieneinteilung.....	3
1.1.4 Klinik und Verlaufsformen.....	4
1.1.5 Diagnostik.....	6
1.1.6 Therapie	7
1.2 Multiple Sklerose	9
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	9
1.2.2 Pathogenese und Pathophysiologie.....	10
1.2.3 Klinik und Verlaufsformen.....	11
1.2.4 Histopathologie und Stadien der Entmarkungsaktivität	12
1.2.5 Diagnostik.....	14
1.2.6 Therapie	14
1.3 Axonale Schädigung.....	15
1.3.1 Axonale Schädigung bei der MS	15
1.3.2 Axonale Schädigung bei der NMO	22
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Das fokale NMO-Tiermodell.....	26
2.1.1 Tierexperimente.....	26
2.1.2 Histologische Aufarbeitung der Präparate	28
2.2 Humanes Gewebe	34
2.2.1 Verwendetes Gewebe	34
2.2.2 Histologische Aufarbeitung des humanen Gewebes.....	37
2.3 Auswertung.....	40
2.3.1 Mikroskopische Auswertung.....	41
2.3.2 Statistische Darstellung der Ergebnisse	43

3	Ergebnisse	45
3.1	Axonpathologie im fokalen NMO-Modell.....	45
3.1.1	Das fokale NMO-Modell.....	45
3.1.2	Zeitverlauf der axonalen Schädigung im fokalen NMO-Modell.....	47
3.1.3	Pharmakologische Behandlung der axonalen Schädigung im fokalen NMO-Modell.....	49
3.2	Axonpathologie in humanen NMO- und MS-Fällen	64
3.2.1	Stadieneinteilung.....	64
3.2.2	Histopathologie der Demyelinisierungsstadien	65
3.2.3	Die akute Axonpathologie bei NMO und MS.....	78
4	Diskussion	86
4.1	Axonpathologie im fokalen NMO-Modell.....	87
4.1.1	Die Bedeutung des fokalen NMO-Modells	87
4.1.2	Zeitverlauf axonaler Schädigung.....	87
4.1.3	Pharmakologische Beeinflussung axonaler Schädigung.....	89
4.2	Axonpathologie in humanen NMO- und MS-Fällen	99
4.2.1	Frühe Axonschädigung bei NMO (I)	100
4.2.2	Verlauf der Axonschädigung in humaner NMO und MS (II)	101
4.2.3	Vergleich der Axonschädigung in humaner NMO und MS (III).....	102
4.2.4	Zusammenfassung: Axonpathologie in humaner NMO und MS	104
5	Zusammenfassung	106
6	Anhang	107
7	Literaturverzeichnis	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histopathologische Eigenschaften der astrozytendepletierten Läsionen im fokalen NMO-Modell 24 h nach Injektion von NMO-IgG mit humanem Serum.....	46
Abbildung 2: Zeitverlauf der Axonpathologie in Läsionen des fokalen NMO-Modells.....	48
Abbildung 3: NMDA-Rezeptorantagonisten reduzieren signifikant die parenchymale axonale Schädigung.....	50
Abbildung 4: Systemisch applizierte NMDA-Rezeptorantagonisten reduzieren signifikant die parenchymale axonale Schädigung.....	51
Abbildung 5: AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten reduzieren signifikant die parenchymale axonale Schädigung.....	52
Abbildung 6: P2X7-Rezeptorantagonisten reduzieren signifikant die parenchymale axonale Schädigung, Apyrase jedoch nicht.....	54
Abbildung 7: Systemische Applikation von P2X7-Rezeptorantagonisten reduziert signifikant die parenchymale axonale Schädigung im fokalen NMO-Modell.....	55
Abbildung 8: IL-1-RA und Caspase-Inhibierung reduzieren nicht signifikant die parenchymale axonale Schädigung.....	56
Abbildung 9: Fokal applizierte Glutamat-Rezeptorantagonisten zeigen keine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der grauen Substanz im fokalen NMO-Modell.....	58
Abbildung 10: Fokal applizierte P2X7-Rezeptorantagonisten zeigen keine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der grauen Substanz.....	60
Abbildung 11: Fokal applizierte Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten zeigen keine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der weißen Substanz.....	61
Abbildung 12: Systemisch applizierte Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten zeigen eine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der grauen Substanz.....	63
Abbildung 13: Systemisch applizierte Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten zeigen keine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der weißen Substanz.....	64
Abbildung 14: Histopathologie aktiver Läsionen von NMO-Biopsien.....	67
Abbildung 15: Histopathologie aktiver Läsionen von NMO-Autopsien.....	69
Abbildung 16: Histopathologie inaktiver schaumzelliger Läsionen von NMO-Autopsien.....	71
Abbildung 17: Histopathologie inaktiver nicht schaumzelliger Läsionen von NMO-Autopsien.....	72
Abbildung 18: Histopathologie aktiver Läsionen von MS-Biopsien.....	74
Abbildung 19: Histopathologie aktiver Läsionen von MS-Autopsien.....	75
Abbildung 20: Histopathologie chronisch-aktiver Läsionen von MS-Autopsien.....	76
Abbildung 21: Histopathologie inaktiver Läsionen von MS-Autopsien.....	77
Abbildung 22: Zeitverlauf der akuten Axonpathologie bei NMO.....	79
Abbildung 23: Zeitverlauf der akuten Axonpathologie bei MS.....	81
Abbildung 24: Akute Axonpathologie im aktiven Stadium von NMO- und MS-Biopsien (Vergleich).....	83
Abbildung 25: Akute Axonpathologie im aktiven Stadium von NMO- und MS-Autopsien (Vergleich).....	84

Abbildung 26: Akute Axonpathologie im chronisch-inaktiven Stadium von NMO- und MS- Autopsien (Vergleich).....	85
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Epidemiologische Daten der humanen Fälle.....	35
Tabelle 2: Primärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen.....	39
Tabelle 3: Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen	40

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	Aminomethylphosphonsäure
AP	alkalische Phosphatase
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
AQP4	Aquaporin 4
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BBG	<i>brilliant blue G</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CNP	zyklische Nukleotidphosphodiesterase
CNQX	<i>6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid
D-AP5	<i>D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid</i>
EAAT2	<i>excitatory amino acid transporter 2</i>
EAE	experimentell autoimmune Enzephalomyelitis
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST	Glutamat/Aspartat-Transporter
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IL-1-RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
KIS	klinisch isoliertes Syndrom
LETM	longitudinale extensive transverse Myelitis
LFB/PAS-Färbung	Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff-Färbung
MBP	basisches Myelinprotein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MK-801	Dizocilpin
MRP14	<i>myeloid-related protein 14</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NBQX	1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo[f]quinoxalin-7-sulfonamid-Dinatriumsalz
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMO	Neuromyelitis optica

NMOSD	<i>neuromyelitis optica spectrum disorders</i>
NogoA	<i>neurite outgrowth inhibitor protein A</i>
oATP	Periodat-oxidiertes Adenosintriphosphat
ON	Optikusneuritis
OPC	Oligodendrozytenvorläuferzelle
OS-MS	optikospinale Form der Multiplen Sklerose
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLP	<i>myelin-associated proteolipid protein</i>
PP-MS	primär chronisch-progrediente Multiple Sklerose
P2X7-Rezeptor	<i>P2X purinoceptor 7</i>
rAb	rekombinanter monoklonaler Antikörper
RR	<i>relapsing-remitting</i>
SP-MS	sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Neuromyelitis optica

Die Neuromyelitis optica (NMO), auch bekannt als Devic-Syndrom, ist eine entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), welche durch schwere Beteiligung der Sehnerven und des zervikalen Rückenmarks charakterisiert ist (Roemer et al. 2007). Erstmals wurde das Krankheitsbild 1894 von Eugene Devic zusammengefasst und als NMO bezeichnet (Wingerchuk et al. 1999). Nach langer Annahme, die NMO sei eine akute, schwere Variante der Multiplen Sklerose (MS), wurde sie nach der Entdeckung der NMO-Immunglobulin G(IgG)-Antikörper(Ab), welche gegen den Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4) gerichtet sind, als eigenständiges Krankheitsbild angesehen. Damit galt die NMO als bewiesene demyelinisierende Autoimmunerkrankung des ZNS (Popescu und Lucchinetti 2012). Heute wird die NMO als eigenständige, schubförmig-rezidivierende demyelinisierende Erkrankung mit klinischen, bildgebenden und laborchemischen Merkmalen angesehen, welche die NMO von der MS unterscheiden (Wingerchuk et al. 2007a). In dieser Arbeit soll auf den Zeitverlauf und die Therapie axonaler Schädigung eingegangen werden.

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

1.1.1.1 Epidemiologie

Die NMO ist mit einer Inzidenz von $4/10^4$ in der nicht-weißen und weißen Bevölkerung eine seltene Erkrankung. In der westlichen Welt beträgt ihr Anteil an Fällen von Entmarkungserkrankungen des ZNS unter 1 % (Shibasaki et al. 1981). In asiatischen Ländern dagegen liegt der Anteil der sogenannten optiko-spinalen Form der Multiplen Sklerose (OS-MS), die vermutlich dem westlichen Krankheitsbild der NMO entspricht, an allen Entmarkungserkrankungen bei 15-40 % (Misu et al. 2002, Kira 2003). Dieser hohe Prozentsatz ist jedoch auch auf die in asiatischen Ländern niedrige Inzidenz der MS zurückzuführen (Nakashima et al. 1999).

Die NMO verläuft entweder in Schüben oder, seltener, monophasisch. Die monophasische NMO zeigt keine Geschlechtsspezifität, wohingegen die schubförmige Verlaufsform bei weiblichen Patienten drei- bis neunfach häufiger auftritt als bei männlichen (Wingerchuk et al. 1999).

Das durchschnittliche Alter bei Erstmanifestation liegt bei 39 Jahren (Wingerchuk et al. 1999; Wingerchuk et al. 2007b), wobei sich jedoch das weite Spektrum des Manifestationsalters von der Kindheit (Jeffery und Buncic 1996) bis ins höhere Erwachsenenalter (Filley et al. 1984) erstreckt.

1.1.1.2 Ätiologie

Vergleiche der Genotypen von an typischer „westlicher“ MS erkrankten Japanern und an „asiatischer“ OS-MS erkrankten Japanern legen die Vermutung nahe, dass für MS und NMO eine unterschiedliche immunogenetische Disposition besteht (Kira et al. 1996; Ito et al. 1998).

Da die Häufigkeit familiärer NMO größer ist als erwartet, wird von einer genetischen Komponente der Erkrankung ausgegangen. Mit NMO assoziiert sind das *human leukocyte antigen* (HLA) und mitochondriale Gene.

1.1.2 Pathogenese

Im Gegensatz zur MS wurde bei NMO als Zielstruktur der humoralen Immunantwort das AQP4 identifiziert (Lennon et al. 2004; Lennon et al. 2005; Papadopoulos und Verkman 2013). Serumantikörper gegen diesen Wasserkanal, der in hoher Dichte an den Endfortsätzen der Astrozyten lokalisiert ist, finden sich bei 70 % aller NMO-Patienten (Lennon et al. 2005). Selbige Antikörper binden nach Penetration der Bluthirnschranke an das AQP4-Antigen und initiieren eine komplementinduzierte Lyse der Astrozyten (Wingerchuk et al. 2007a). Dies führt zu einer Depletion von glial-fibrillary-acidic-protein-positiven (GFAP-positiven) Astrozyten, wie sie insbesondere in vollständig ausgebildeten Läsionen zu finden ist (Roemer et al. 2007; Brück et al. 2012; Misu et al. 2013). Auch Komplement-unabhängige Mechanismen wie durch natürliche Killerzellen medierte Zellyse und Internalisierung von AQP4 und *excitatory amino acid transporter 2* (EAAT2) auf noch vitalen Astrozyten tragen zur Schädigung und Dysfunktion der Astrozyten bei (Hinson et al. 2008; Ratelade et al. 2012).

Die Astrozytenfunktionen, die durch Schädigung und Depletion ausfallen, sind vielfältig. Neben einer passiven Stützfunktion sind die Astrozyten mit ihren Fortsätzen auch an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke und der Regulation des Blutflusses beteiligt (Popescu und Lucchinetti 2012; Zonta et al. 2003). Sie versorgen die Neurone mit Metaboliten und sind wichtige Regulatoren des Energiehaushalts des ZNS (Fuente-Martin et al. 2013). Zudem sind sie von großer

Bedeutung für die Kontrolle der extrazellulären Kaliumhomöostase und für die Wiederaufnahme von Neurotransmittern wie z. B. Glutamat (Newman 1986; Olié et al. 2004). Astrozyten können verschiedene Neurotransmitter, die sog. Gliotransmitter, freisetzen, deren Bedeutung noch Forschungsgegenstand ist (Bezzi et al. 2004). Es wird angenommen, dass sie an der Regulation der synaptischen Aktivität beteiligt sind (Schell et al. 1995). Astrozyten tragen zudem zur Myelinisierung bei (Gard et al. 1995). Die pathogenetische Bedeutung der Astrozytopathie wird aktuell kontrovers diskutiert (Misu et al. 2013).

Es konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden, inwiefern Schädigung und Verlust der Astrozyten zur Demyelinisierung und Axonschädigung in den NMO-Läsionen führen. Von Marignier et al. durchgeführte Experimente weisen auf Glutamat-Exzitotoxizität als möglichen Mechanismus hin. Diese Exzitotoxizität entsteht als Folge der Glutamatakkumulation durch den Defekt der astrozytischen Glutamattransporter, welche für die Aufnahme von Glutamat in die Astrozyten von Bedeutung sind (Marignier et al. 2010).

1.1.3 Histopathologie und Stadieneinteilung

Das prägende Merkmal früher NMO-Läsionen ist der Verlust der AQP4-Immunoreaktivität (Misu et al. 2007). Gleichmaßen wird ein Verlust an GFAP-Immunoreaktivität beobachtet sowie eine prominente perivaskuläre IgG- und Immunglobulin M(IgM)- und Komplementablagerung in für die NMO charakteristischen ring- oder rosettenartigen Mustern. Die betroffenen Blutgefäße sind dabei v. a. in späteren Stadien fibrosiert und hyalinisiert (Lucchinetti et al. 2002; Misu et al. 2006; Roemer et al. 2007). NMO-Läsionen zeigen den auffälligen Verlust an AQP4, der den Verlust der GFAP-Immunoreaktivität häufig übertrifft, unabhängig vom Ausmaß der Gewebeschädigung, von der Demyelinisierungsaktivität und dem Ort der Läsion. Lediglich ältere NMO-Läsionen können partiell eine Astrozytenrepopulation aufweisen. Dies steht im Gegensatz zu MS-Läsionen, die keinen AQP4-Verlust sondern einen Myelin-Verlust aufweisen, und stellt ein mögliches Unterscheidungskriterium zwischen den beiden Erkrankungen dar (Roemer et al. 2007). Die histopathologischen Charakteristika der NMO sind je nach Stadium der Erkrankung sehr unterschiedlich. In akuten Läsionen dominieren als entzündliche Infiltrate polymorphnukleäre Zellen, Makrophagen und T-Zellen. Zu späteren Zeitpunkten liegen überwiegend Makrophagen und T-Zellen vor. Weitere histologische Kennzeichen sind neben ausgehnter sekundärer Demyelinisierung als Folge der Astrozytendestruktion und Oligodendrozytenapoptose auch Kavitationen, Nekrosen und akute Axonpathologie in Form von

charakteristischen Schwellungen der Axone, den sog. Sphäroiden, in grauer und weißer Substanz von Rückenmark und Sehnerven (Lucchinetti et al. 2002; Popescu und Lucchinetti 2012). Im medullären Tegmentum und im Rückenmark wurden auch weniger destruktive NMO-Läsionen gefunden. In diesen Läsionen wurden weder Demyelinisierung noch Nekrose, sondern stattdessen ödematöse und entzündliche Veränderungen, ein Verlust an AQP4 sowie perivaskuläre Immunkomplexablagerungen beschrieben. Dies legt das Vorkommen eines potentiell reversiblen NMO-Läsionstyps nahe (Roemer et al. 2007).

Verschiedene pathologische Charakteristika haben traditionell dazu geführt, NMO als destruktiver anzusehen als MS: Erstens lässt der Verlust an Astrozyten und Oligodendrozyten die Läsionen trotz übermäßiger Makrophageninfiltration als hypozellulär erscheinen. Des Weiteren ist insbesondere in chronischen Läsionen eine abnehmende Dichte an Axonen vorhanden. Auch erscheinen die NMO-Läsionen z. T. zystisch, insbesondere in der grauen Substanz des Rückenmarks (Lucchinetti et al. 2002; Misu et al. 2007; Roemer et al. 2007).

Eine histopathologische Stadieneinteilung der NMO ist anhand verschiedener Kriterien möglich. So können NMO-Läsionen z. B. in Analogie zum MS-Klassifikationsmuster (s. u.) nach Alter und Demyelinisierungsaktivität klassifiziert werden. Man kann demnach zwischen frühaktiven, spätaktiven, inaktiven und remyelinisierenden Läsionen unterscheiden. Wegweisend ist hierbei das immunhistochemische Antigenprofil der Myelinabbauprodukte in den Makrophagen sowie der Makrophagenmarker *myeloid-related protein 14* (MRP14), der in frühen akut-entzündlichen demyelinisierenden Läsionen positiv ist (Lucchinetti et al. 2002; Brück et al. 1995). Auch der Verlust an Myelinproteinen, die Lokalisation und Ausdehnung der Plaques, das Muster der Oligodendrozytendestruktion und der immunpathologische Nachweis von Komplementaktivierung werden als Klassifikationskriterien herangezogen (Lucchinetti et al. 2002).

Aktive NMO-Läsionen werden nach Misu et al. (2013) in sechs verschiedene histopathologische Subtypen unterteilt, welche die unterschiedlichen Mechanismen der Gewebeschädigung in der NMO unterstreichen.

1.1.4 Klinik und Verlaufsformen

Nach den Diagnosekriterien der NMO ist das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung von den Leitsyndromen Optikusneuritis (ON) und longitudinale extensive transverse Myelitis (LETM) gekennzeichnet. Die LETM dehnt sich *per definitionem* über drei oder mehr

Wirbelkörpersegmente aus (Wingerchuk et al. 2006; Wingerchuk et al. 2007a). Klassischerweise tritt die ON bilateral mit simultaner Myelitis auf. Bei Erstmanifestation sind jedoch auch andere Kombinationen möglich wie eine unilaterale ON, eine bilaterale ON, eine Myelitis sowie eine unilaterale ON mit simultaner Myelitis.

Durch die ON verursachte Symptome sind ein reduzierter Visus, Verschwommensehen, verminderte Kontrastempfindlichkeit, Farbsinnstörungen, Augenbewegungsschmerz sowie positive visuelle Phänomene wie Blitze oder Farben (Balcer 2006). In der Regel weisen NMO-Patienten eine schwerere ON mit größerer Sehbehinderung als MS-Patienten auf (Jacob et al. 2007).

Der Ausprägungsgrad der Myelitis ist bei NMO stark variabel und reicht von einer sehr milden Symptomatik bis hin zur kompletten, extensiven und zentral im Rückenmark gelegenen Myelitis. Diese kann zu folgender typischer Symptomatik führen: eine rasch progrediente Para- oder Tetraparese, ein meist symmetrisches sensibles Niveau sowie Blasen- und Mastdarmfunktionsstörungen mit akutem Harnverhalt. Im Vergleich zur MS ist die sensible Symptomatik bei der NMO eher schwerer und symmetrischer (Sellner et al. 2008; Sellner et al. 2010; de Seze et al. 2002; Cordonnier et al. 2003).

In frühen Stadien kommen in der Regel keine Hirnläsionen vor (Wingerchuk et al. 1999).

Die NMO verläuft meist in Schüben und nur selten monophasisch. Der monophasische Verlauf liegt vor, wenn es lediglich bei einer einmaligen Manifestation von ON und LETM bleibt. Die Erstmanifestation ist dabei schwerer als beim schubförmigen Verlauf. Sie ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 90 % verbunden (Wingerchuk et al. 1999). Dafür ist bei der schubförmigen NMO bei jedem weiteren Schub mit erneuten Beeinträchtigungen auf motorischer, sensorischer und visueller Ebene zu rechnen. Der monophasische Verlauf ist schwer zu diagnostizieren, da weitere Schübe auch Jahrzehnte nach Erstmanifestation der NMO auftreten können.

Der schubförmige Verlauf der Erkrankung liegt bei zwei Dritteln der NMO-Patienten vor und ist damit die wesentlich häufigere Form (Wingerchuk et al. 1999). Bei über 50 % aller NMO-Patienten ist ein Jahr nach dem Index-Ereignis ein weiterer Krankheitsschub aufgetreten. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 68 % (Wingerchuk et al. 1999). Patienten mit schubförmiger NMO haben insgesamt eine schlechte Prognose. Während eines Schubs einer zervikalen Myelitis entwickeln sie oftmals eine respiratorische Insuffizienz. Prädestinierend für die schubförmige NMO sind weibliches Geschlecht, hohes Alter bei Erstmanifestation, eine größere Zeitspanne

zwischen den Index-Ereignissen, Komorbidität mit einer systemischen Autoimmunerkrankung sowie weniger schwere Behinderung nach der ersten Myelitis. Verkürzend auf die Überlebenszeit wirken folgende Faktoren: das Vorliegen einer Autoimmunerkrankung, das Ausmaß der Rehabilitation der motorischen Funktionen nach der Index-Myelitis sowie eine erhöhte Schubfrequenz in den ersten beiden Jahren nach Erkrankungsbeginn (Wingerchuk und Weinshenker 2003).

Nach dem ersten Schub ist das Risiko, eine dauerhafte klinische Beeinträchtigung davonzutragen, wesentlich höher als bei MS (Wingerchuk et al. 2007a). Dafür ist ein sekundär progredienter Verlauf der NMO sehr selten (Wingerchuk et al. 2007b).

Die Dauer der meisten NMO-Schübe liegt bei einigen Tagen. Nachdem die maximale klinische Beeinträchtigung erreicht wurde, findet innerhalb von Wochen und Monaten eine zumeist jedoch inkomplette Remission statt. Somit liegt die Hauptursache für eine dauerhafte Behinderung bei der NMO in der Akkumulation einmal entstandener neurologischer Ausfälle. Bei der MS hingegen gelten permanente motorische, sensible und visuelle Funktionseinschränkungen als Ausdruck einer unterlagerten sekundär chronischen Progredienz mit neuroaxonaler Schädigung (Wingerchuk et al. 1999; Wingerchuk et al. 2003; Wingerchuk et al. 2007a; Wingerchuk et al. 2007b).

1.1.5 Diagnostik

Nach den 2006 von Wingerchuk et al. publizierten Diagnosekriterien ist dann sicher von einer NMO auszugehen, wenn neben den beiden klinischen Hauptmerkmalen, der ON und der LETM, zusätzlich zwei der drei folgenden Nebenkriterien erfüllt sind: Das erste Nebenkriterium ist eine spinale Magnetresonanztomographie (MRT) mit langstreckiger, d. h. mehr als drei Wirbelkörpersegmente betreffender, Myelonläsion. Das zweite Nebenkriterium ist eine bei Erkrankungsbeginn bzw. Erstvorstellung für eine MS untypische kraniale MRT nach den Kriterien von Paty (Paty et al. 1988). Der positive NMO-IgG-Antikörpernachweis im Serum stellt das dritte Nebenkriterium dar. Zur Überprüfung dieser Kriterien sind neben Anamnese und körperlicher Untersuchung eine Basislaboranalytik mit fakultativer Untersuchung weiterer Parameter, die Bestimmung der NMO-spezifischen AQP4-Antikörper, eine Liquoruntersuchung sowie eine holospinale und zerebrale MRT erforderlich.

Die Spezifität des Anti-AQP4-Antikörpernachweises für die NMO ist sehr hoch (91-100 %). Da jedoch mit den derzeit verfügbaren Nachweisverfahren nur bei 60-90 % aller Patienten mit klinisch diagnostizierter NMO Anti-AQP4-Antikörper detektiert werden, schließt die Seronegativität eine NMO nicht aus (Jarius und Wildemann 2010).

Wichtige Differentialdiagnosen der NMO sind die MS und insbesondere bei Kindern die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) (McKeon et al. 2008). Diagnostisch von der NMO abzugrenzen sind außerdem die weiteren *neuromyelitis optica spectrum disorders* (NMOSD). Diese Benennung beschreibt Erkrankungen, bei denen AQP4-Seropositivität und mindestens eines der beiden Index-Ereignisse der NMO (rezidivierende oder bilaterale ON und LETM) kombiniert auftreten. Dazu zählen neben der NMO limitierte Formen der NMO (idiopathische monophasische oder schubförmige LETM sowie rezidivierende oder simultane bilaterale ON), asiatische optikospinale Multiple Sklerose (OS-MS), ON oder LETM in Assoziation mit systemischen Autoimmunerkrankungen sowie ON oder LETM in Assoziation mit für NMO typischen Hirnläsionen (hypothalamische, im Corpus callosum gelegene, periventrikuläre oder Hirnstammläsionen) (Wingerchuk et al. 2007a; Lana-Peixoto und Callegaro 2012; Sato et al. 2013).

Eine korrekte Abgrenzung der NMO von der MS ist von erheblicher therapeutischer Relevanz, da sich sowohl Therapieansätze als auch Prognose unterscheiden. Letztere ist insbesondere bei der schubförmigen NMO schlechter, da sie in den meisten Fällen einen wesentlich aggressiveren und schwereren Verlauf als die MS nimmt (Wingerchuk et al. 1999; Kvistad et al. 2013). Daher sollte eine frühzeitige und akkurate Diagnostik erfolgen und die Diagnose so früh wie möglich gestellt werden, vor Entwicklung des kompletten klinischen Bildes, um möglichst eine weitere Behinderung und fatale Schübe zu verhindern (Popescu und Lucchinetti 2012; Matthews 2009).

1.1.6 Therapie

Die Behandlung der NMO stellt noch immer eine Herausforderung dar und ist weit vom Idealzustand entfernt (Chiquete et al. 2010). Trotz der bisherigen Kenntnisse zur Immunopathogenese der NMO und der erzielten Fortschritte in der Diagnostik gibt es bis dato keine Kausaltherapie. Die Behandlungsmöglichkeiten sind auf Immunmodulation bzw. -suppression und symptomorientierte Maßnahmen limitiert, um die Progression der Erkrankung zu verhindern und die Lebensqualität der Patienten langfristig zu erhalten (Ochi 2010). Die Literatur empfiehlt

die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, die v. a. auf die Effektormechanismen der NMO abzielen (Matà und Lolli 2011).

Von großer Bedeutung zur Prävention neuer Schübe und weiterer Behinderung ist ein möglichst früher Therapiebeginn. Die aktuellen Therapieempfehlungen verfolgen dabei zwei Zielsetzungen: zum einen die akute Schubtherapie, zum anderen eine Intervalltherapie zur Schubprophylaxe (Nomura 2013).

Erstere basiert auf einer hochdosierten intravenösen Kortikosteroidpulstherapie über mehrere Tage (Wingerchuk und Weinshenker 2008). Bei unzureichendem oder ausbleibendem Ansprechen wird eine Plasmapherese empfohlen (Nomura 2013).

Die Intervalltherapie beruht auf der Gabe von oralen Kortikosteroiden und nicht-spezifischen Immunsuppressiva wie Azathioprin, Takrolimus, Mycophenolatmofetil und Mitoxantron. Auch neue Therapieansätze wie z. B. die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen *cluster of differentiation 20* (CD20), Rituximab, und gegen C5 Convertase, Eculizumab, zeigen in offenen Studien positive Ergebnisse (Nomura 2013; Sato et al. 2012). Mögliche günstige Effekte von hochdosierten intravenösen Immunglobulinen konnten in einigen Fallberichten nachgewiesen werden (Bakker und Metz 2004; Okada et al. 2007). Zudem kann eine Eskalationstherapie mit Cyclophosphamid bei schweren Verläufen in Einzelfällen in Erwägung gezogen werden (Bonnet et al. 1999; Jarius et al. 2008a; Mok et al. 2008). Günstige Effekte einer Therapie mit Glatirameracetat wurden lediglich vereinzelt berichtet (Bergamaschi et al. 2003; Gartzon et al. 2007).

Als Firstline-Therapie werden Azathioprin und Rituximab empfohlen (Trebst et al. 2014).

Interferon-beta (IFN-beta), Natalizumab und Fingolimod dagegen, Firstline-Therapeutika der MS, zeigen keinen Effekt bei der Behandlung von NMOSD. Interferone wirken sich laut retrospektiver Analysen sogar negativ auf den Krankheitsverlauf der NMO aus (Papeix et al. 2007; Palace et al. 2010; Shimizu et al. 2010).

Es besteht also die dringende Notwendigkeit neuer Therapieoptionen, welche in die Pathogenese der Erkrankung eingreifen.

1.2 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche, schubweise verlaufende Erkrankung des ZNS, der vermutlich eine Autoimmunreaktion gegen Eigenantigene zugrunde liegt (Nylander und Hafler 2012). Hauptmerkmal der Erkrankung ist die Demyelinisierung mit relativem axonalem Erhalt (Stadelmann 2011). Seit Erstbeschreibung der Erkrankung vor nahezu 180 Jahren durch J. Cruveilhier (Cruveilhier 1835; Compston 1988) haben sich die pathogenetischen Konzepte kontinuierlich gewandelt. Gleichzeitig haben sich die therapeutischen Optionen erweitert und entscheidend verbessert. In dieser Arbeit sollen Ausprägung und Zeitverlauf axonaler Schädigung bei NMO und MS verglichen werden, weshalb in diesem Kapitel relevante Informationen zur MS dargelegt werden.

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

1.2.1.1 Epidemiologie

Die MS zählt heute zu den häufigsten organischen Erkrankungen des Nervensystems (Hacke 2015) und ist die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenenalters, welche zu bleibender Behinderung führt (Noseworthy et al. 2000). Der Altersgipfel für die Erstmanifestation liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Flachenecker et al. 2008). Bei Frauen wird die schubförmige Verlaufsform etwa doppelt so häufig diagnostiziert wie bei Männern, die primär chronisch-progrediente Verlaufsform ist allerdings etwa gleich häufig (Cottrell et al. 1999).

Wichtige Einflussfaktoren auf die Erkrankungshäufigkeit sind der geographische Lebensraum und die ethnische Abstammung. Bei der geographischen Verteilung der Erkrankung ist auffällig, dass sie in Europa und den USA häufiger diagnostiziert wird als auf dem afrikanischen und asiatischen Kontinent (Compston 1999). Auch ein Nord-Süd-Gefälle mit einer höheren Erkrankungshäufigkeit im Norden wird beobachtet, die mit wachsender Entfernung vom Äquator zunimmt (Hacke 2015). Als Erklärungsansatz hierfür wird z. B. ein in weniger sonnigen Gebieten vermehrt auftretender Vitamin-D-Mangel angeführt, der mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergeht (Ebers 2008).

1.2.1.2 Ätiologie

Die Frage nach der Ätiologie der Autoimmunerkrankung MS ist bis heute nicht eindeutig beantwortet (Hogancamp et al. 1997; Lutton et al. 2004). Es wird ein Zusammenspiel aus

genetischer Veranlagung, epigenetischen Faktoren und Umweltfaktoren angenommen (Ramagopalan et al. 2008; Huynh und Casaccia 2013).

Zu den letzteren werden virale und bakterielle Erreger wie *Chlamydia pneumoniae* (Giovannoni et al. 2006) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) (Ascherio und Munger 2010; Kakalacheva et Lünnemann 2011) gezählt. Die von Lucchinetti et al. (2000) aufgezeigte klinische und pathologische Heterogenität der MS lässt sich gut vor dem Hintergrund der vielfältigen unterschiedlichen ätiologischen Faktoren erklären.

Es liegen zudem genetische Faktoren in der Prädisposition für MS vor, wie familiär gehäufte Erkrankungsfälle immer wieder zeigen (Hafler 2004; Mumford et al. 1994). Dabei gibt es starke Evidenz für ein polygenetisches Vererbungsmodell (Oksenberg 2013). Mit einem höheren Risiko für MS assoziiert sind bestimmte Subtypen des *major histocompatibility complex*(MHC)-I und -II (Dyment et al. 2004; Kalman und Lublin 1999).

1.2.2 Pathogenese und Pathophysiologie

Bei der MS finden komplexe Autoimmun- und Entzündungsreaktionen statt, mit vermutlich daraus resultierender Demyelinisierung, Oligodendrozytenuntergang sowie Funktionsstörung und Verlust von Axonen (Dutta und Trapp 2007). Dies spielt sich hauptsächlich, wenn auch nicht ausschließlich, in der weißen Substanz des ZNS ab, in Form von herdförmigen, oft periventrikulären Entmarkungsstellen (Koopmans et al. 1989).

Die Pathophysiologie der MS ist heute noch in vielen Aspekten ungeklärt (Brassat 2012). Daran beteiligt sind vermutlich aber folgende Prozesse: Es kommt durch ZNS-Antigene, u. a. Myelin, oder kreuzreaktive Fremdartigene in lymphatischem Gewebe der Körperperipherie zur Aktivierung von T- und B-Zellen (De Vos et al. 2002; Hemmer et al. 2002; Pierson et al. 2014). Nach Penetration der Blut-Hirn-Schranke infiltrieren diese autoreaktiven Zellen das ZNS (Hemmer et al. 2002). Durch Erkennung ihres spezifischen Antigens, das von MHC-Molekülen präsentiert wird, werden die T-Zellrezeptoren aktiviert. Die Aktivierung der T-Zellrezeptoren von CD4⁺-T-Helferzellen wird durch Interaktion mit Antigenen induziert, die von MHC-II-Molekülen auf Makrophagen, Mikrogliazellen und dendritischen Zellen präsentiert werden (Nakahara et al. 2010). Dies führt bei CD4⁺-T-Helfer-1-Zellen zur Sekretion von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α und IFN- γ (Keegan und Noseworthy 2002), die über eine erhöhte Durchlässigkeit der Bluthirnschranke die vermehrte Einwanderung von Makrophagen, T-Zellen

und weiteren immunkompetenten Zellen induzieren. Dadurch wird die Entzündungsreaktion weiter verstärkt (Hemmer et al. 2002). Die Aktivierung von T-Helfer-2-Zellen bewirkt eine Interleukin(IL)-4-vermittelte B-Zell-Aktivierung, die in der Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen mit anschließender Produktion von Autoantikörpern resultiert (Keegan und Noseworthy 2002). CD8⁺-T-Zellen dagegen werden durch Kontakt mit Antigenen, die von MHC-I-Molekülen auf Gliazellen und Neuronen präsentiert werden, zur Schädigung der entsprechenden antigenpräsentierenden Zelle angeregt und fördern demyelinisierende Prozesse durch den apoptoseinduzierenden Fas-Liganden und durch Sekretion von oligodendrozytentoxischem Perforin (Noseworthy 1999).

Alle diese verschiedenen spezifischen (T-Zellen) und unspezifischen (Makrophagen, Mikroglia) zellulären Faktoren sowie die humoralen Komponenten spezifischer (Immunglobuline) und unspezifischer (Zytokine, Komplement) Art führen im Zusammenspiel direkt durch die Oligodendrozyten- bzw. Myelindestruktion oder indirekt über proinflammatorische Mechanismen zur axonalen Demyelinisierung und zu Funktionsstörungen, Schädigung und Verlust der Axone (Witherick et al. 2010).

Das aktivierte Immunsystem zeigt neben der autoreaktiven, destruktiven Wirkung aber auch eine neuroprotektive, remyelinisierende Komponente (Hohlfeld et al. 2000; Stadelmann et al. 2002). Dazu gehört neben dem rückläufigen, entzündlich vermittelten Ödem und der Remyelinisierung auch eine gewisse Kompensation der Axonschädigung (Bjartmar und Trapp 2001).

Eine weitere Folge der dargestellten Entzündungsreaktion ist eine Astrozytenproliferation mit letztendlicher Glianarbenbildung (Norton et al. 1992).

1.2.3 Klinik und Verlaufsformen

Die erste klinische Episode der MS wird durch das klinisch isolierte Syndrom (KIS) markiert. Dies bezeichnet plötzlich auftretende Symptome ohne zeitliche Dissemination, die auf ein demyelinisierendes Ereignis des ZNS hindeuten und ein hohes Risiko für die Entwicklung einer MS implizieren (Miller D et al. 2012; Marcus und Waubant 2013).

Da sich die Entzündungsreaktionen der MS im gesamten ZNS manifestieren können, wird ein weites Spektrum an neurologischen und psychiatrischen Symptomen beobachtet, welche im Einzelnen von der Lokalisation der MS-Läsionen abhängen. Häufig beobachtete Symptome und

Symptomkombinationen sind z. B. Optikus- und Retrobulbärneuritiden bei Beteiligung des visuellen Systems (Lightman et al. 1987), Ataxie und Ophthalmoplegie bei Herden im Hirnstamm bzw. Kleinhirn und sensomotorische Querschnittssymptome bei Befall des Myelons (Huijbregts et al. 2006). Hinzu kommen autonome Dysfunktionen sowie kognitive und psychische Veränderungen, insbesondere im späteren Krankheitsverlauf (Hacke 2015).

1996 wurden die klinischen Verlaufsformen durch die National Multiple Sclerosis Society in vier Gruppen eingeteilt: Die schubförmige MS (*relapsing-remitting MS*; RR-MS) weist akute Schübe im Wechsel mit kompletten oder inkompletten Remissionen auf, wobei zwischen den Schüben kein Krankheitsprogress vorliegt (Lublin und Reingold 1996). Die primär chronisch-progrediente MS (PP-MS) beschreibt eine sukzessive kontinuierliche Verschlechterung der MS mit minimalen Fluktuationen ohne abgrenzbare Schübe (Lublin und Reingold 1996). Die RR-MS kann in die sekundär chronisch-progrediente MS (SP-MS) übergehen, bei der eine schleichende Zunahme klinischer Symptome und neurologischer Defizite charakteristisch ist (Lublin und Reingold 1996). Bei der schubförmig-progredienten MS (*progressive-relapsing MS*; PR-MS) ist von Erkrankungsbeginn an ein chronischer Progress mit Schüben und vollständigen oder auch unvollständigen Remissionen zu finden. Auch in den schubfreien Phasen ist die Krankheit progredient (Lublin und Reingold 1996). Da die schubförmig-progrediente MS in die sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform übergeht, werden heute meist beide Gruppen zusammengefasst.

2014 dagegen wurde von Lublin eine neue Klassifikation von MS-Phänotypen vorgeschlagen. Diese Klassifikation berücksichtigt neue Erkenntnisse zur Erkrankungspathologie und schlägt eine Unterteilung in aktive und nicht-aktive MS-Formen vor. Aktive MS wird definiert durch klinische Rückfälle oder neue T2- oder gadoliniumanreichernde Läsionen in bildgebenden Untersuchungen, die über einen definierten Zeitraum, in der Regel ein Jahr, auftreten. Des Weiteren wird die Subkategorie der progressiven MS abgegrenzt. Diese unterscheidet zwischen Patienten, die über einen bestimmten Zeitraum eine Krankheitsprogression zeigen, und solchen, die stabil bleiben (Lublin 2014).

1.2.4 Histopathologie und Stadien der Entmarkungsaktivität

Makroskopisch gesehen werden MS-Läsionen durch graue Herde, sog. Plaques, v. a. in der weißen, aber auch in der grauen Substanz repräsentiert. Diese Plaques können im gesamten ZNS lokalisiert sein, werden aber insbesondere an Prädilektionsstellen wie periventrikulären Arealen,

Sehnerv, Hirnstamm, Kleinhirn und subpiale Kortex beobachtet (Popescu und Lucchinetti 2012).

Zu den histologischen Schlüsselmerkmalen der MS zählen fokale Demyelinisierung, Entzündung, relativer axonaler Erhalt und variable Gliose. Dem Myelinverlust kann im Verlauf auch ein Oligodendrozytenverlust folgen. Daneben kann eine unterschiedlich stark ausgeprägte Remyelinisierung vorliegen. Die entzündlichen Infiltrate setzen sich vorwiegend aus T- und B-Lymphozyten sowie Mikroglia und Makrophagen zusammen. Die axonale Dichte ist in MS-Läsionen vermindert, obwohl meist ein größerer Teil der Axone erhalten ist. Man spricht daher von relativem axonalem Erhalt (Stadelmann und Brück 2005; Popescu und Lucchinetti 2012).

Die Kriterien für eine Klassifikation der MS-Läsionen sind kontrovers, verschiedene Schemata werden dazu herangezogen. Eine mögliche Einteilung orientiert sich an Alter und Demyelinisierungsaktivität der Plaques. Sie werden demnach in aktive und chronische MS-Läsionen unterteilt. Die chronischen untergliedern sich nochmals in chronisch-aktive und chronisch-inaktive Stadien. Die Klassifikation basiert auf der Anwesenheit und Verteilung von myelinbeladenen Makrophagen in den demyelinisierten Läsionen. Dazu werden histologische Färbungen herangezogen wie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung; zur Darstellung der Gewebe- und Zellmorphologie), eine Myelinfärbung (Luxol Fast Blue/Periodic Acid-Schiff oder Immunhistochemie für Myelinproteine), makrophagenspezifische Marker (Immunhistochemie für KiM1P oder CD68 und für MRP14) und eine Färbung für Axone (Bielschowsky-Silberimprägnation oder Immunhistochemie für das Neurofilamentprotein). Die strengste Bestimmung der Demyelinisierungsaktivität wird durch die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Myelinabbauprodukte in den Makrophagen ermittelt wie zyklische Nukleotidphosphodiesterase (CNP), Myelin-Oligodendrozytenglykoprotein (MOG), myelinassoziertes Glykoprotein (MAG), *myelin-associated proteolipid protein* (PLP) und basisches Myelinprotein (MBP) (Popescu und Lucchinetti 2012).

Akute MS-Läsionen weisen neben der akuten axonalen Schädigung sowohl Lymphozyten und myelinbeladene Makrophagen als auch reaktiv veränderte Astrozyten und teilweise bereits Remyelinisierungen auf. In frühaktiven MS-Läsionen sind die Makrophagen selektiv positiv für MRP14 (Brück et al. 1995; Brück et al. 1996). Aktive Plaques sind außerdem durch erhöhte AQP4-Immunoreaktivität gekennzeichnet, entsprechend einer Aufregulation auch von GFAP (Popescu und Lucchinetti 2012). Die hyperzellulären Plaques werden zudem durch variablen Oligodendrozytenverlust und v. a. durch T-lymphozytäre, weniger auch B-lymphozytäre

Infiltrate charakterisiert. Makrophagen, welche Myelinproteine wie MOG, CNP oder MAG enthalten, bedecken in unterschiedlichem Ausmaß die Läsionsstellen.

Die chronischen MS-Läsionen werden nochmals in chronisch-aktive und chronisch-inaktive Stadien untergliedert.

Die chronisch-aktiven Plaques sind vollständig demyelinisierte, scharf begrenzte Läsionen mit relativem Axonerhalt. Sie werden durch einen hyperzellulären Randsaum mit einzelnen myelinbeladenen Makrophagen gekennzeichnet, die von vereinzelt perivaskulären und parenchymalen T-Zellen und aktivierter Mikroglia begleitet werden. Das Läsionszentrum ist hypozellulär, inaktiv und stark gliotisch verändert. Da chronisch-aktive Plaques im Verlauf der Zeit eine zunehmende Axondestruktion bewirken, werden sie ebenfalls als histologisches Korrelat der Krankheitsprogression angesehen (Prineas et al. 2001).

Inaktive MS-Läsionen sind hypozellulär und komplett demyelinisiert. Sie zeigen insbesondere Fasergliose und einen erheblichen Verlust an Axonen und Oligodendrozyten sowie ein geringfügiges Infiltrat aus Makrophagen, Mikroglia und Lymphozyten (Frohman et al. 2006; Popescu und Lucchinetti 2012).

1.2.5 Diagnostik

Eine wesentliche Bedeutung bei der Diagnosestellung der MS kommt der Anamnese, der klinischen Feststellung neurologischer Defizite, die auf eine Schädigung des ZNS hinweisen, und deren Objektivierung zu. Dabei müssen für die Diagnose MS eine zeitliche und örtliche Dissemination klinisch oder paraklinisch nachgewiesen sowie andere neurologische Ursachen ausgeschlossen werden. Dies wird neben Anamneseerhebung und klinisch-neurologischer Untersuchung durch diagnostische Untersuchungsmethoden wie labormedizinische Blutuntersuchungen, Liquoruntersuchungen, eine kraniale MRT, evozierte Potentiale, Erhebung des neuropsychologischen Befundes und der maximalen Gehstrecke, eine urodynamische Untersuchung und die optische Kohärenztomografie ermittelt (Brownlee et al. 2017).

1.2.6 Therapie

Eine kausale, zur Heilung der MS führende Therapie ist bis heute nicht bekannt (Kesselring 2013). Das Therapieziel besteht daher in der Linderung oder Beseitigung der Symptome, um

den Patienten eine möglichst hohe Lebensqualität und Autonomie im Alltag zu ermöglichen. Immunsuppression bzw. Immunmodulation und die symptomatische Therapie stellen derzeit die beste Vorgehensweise dar (Henze 2004). Einige Therapeutika der MS und NMO sind identisch, andere haben genau gegenteilige Effekte und können nur zur Behandlung der einen oder der anderen Erkrankung angewendet werden.

1.3 Axonale Schädigung

Da in dieser Arbeit der Zeitverlauf und die Therapie axonaler Schädigung bei NMO untersucht und der Zeitverlauf axonaler Schädigung bei NMO und MS verglichen werden soll, geht dieses Kapitel auf Grundlagen der Axonschädigung bei beiden Krankheitsbildern ein.

Eine Axonschädigung ist definiert als pathologische Veränderung in der Zytoarchitektur eines Axons, die innerhalb eines kleinen Zeitfensters vor dem Axonuntergang auftreten, aber auch spontan reversibel sein kann (Gentleman et al. 1993; Nikic et al. 2011).

Histologische Erscheinungsformen akuter Axonschädigung sind dystrophische Veränderungen (z. B. axonale Kaliberverminderung), fokale Akkumulation von Proteinen des schnellen axonalen Transports, sog. Axonsphäroide, unregelmäßige, perlschnurartige Axone, intrazelluläre Vakuolisierung und axonale Transsektionen (Axonaufreibungen mit nur einer einzigen Verbindung zum restlichen Axon) (Popescu und Lucchinetti 2012; Ferguson et al. 1997; Kornek et al. 2001; Miller und Leary 2007). Axonale Transportstörungen sind das akkurateste und sensitivste Anzeichen für eine Axonschädigung (Gentleman et al. 1993).

1.3.1 Axonale Schädigung bei der MS

Obwohl axonale Schädigung bei der MS bereits von dem Erstbeschreiber der Erkrankung beobachtet wurde (Charcot 1868), ging man lange von einem weitgehenden Erhalt der Axone trotz des zentralnervösen Krankheitsprozesses aus (Marburg 1906). Im Verlauf der letzten Jahrzehnte ist die Axonpathologie immer mehr in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt und durch neu entwickelte präzise histologische Techniken zunehmend genauer beschrieben worden. Heute gilt die axonale Schädigung als allgemein anerkanntes Merkmal der MS-Pathologie (Popescu und Lucchinetti 2012).

1.3.1.1 Bedeutung

Man geht davon aus, dass die Axonpathologie von großer praktischer klinischer Bedeutung ist.

Diverse bildgebende Studien ergaben eine positive Korrelation axonaler Schädigung mit dem Grad der klinischen Behinderung. So konnte z. B. der neuronale Metabolit N-Acetylaspartat zum spektroskopischen Nachweis axonaler Integrität und Funktionsstörung herangezogen und mit neurologischen Ausfallserscheinungen korreliert werden (De Stefano et al. 1998). Denselben Zusammenhang zeigte die Bestimmung der Konzentration an Neurofilamenten im Liquor von MS-Patienten, die einen Marker für akute Axonschädigung darstellt (Lim et al. 2005). Diese Beobachtung konnte bereits ab frühesten Stadien der Erkrankung gemacht werden (De Stefano et al. 2001).

Das Ausmaß der Axonschädigung wird zudem als wichtiges pathologisches Korrelat der Krankheitsprogression angesehen. So konnte in Kernspinresonanztomographie-Studien gezeigt werden, dass zerebrale axonale Schädigung von frühesten Krankheitsstadien an zur Behinderungsprogression beiträgt (De Stefano et al. 2001). Sicherlich ist die kumulative axonale Schädigung an der permanenten neurologischen Beeinträchtigung wesentlich beteiligt (Davie et al. 1995). Dafür spricht *per exclusionem* ebenfalls, dass die Läsionen der weißen Substanz schlecht mit dem Ausmaß der Behinderung und der Behinderungsprogression korrelieren.

1.3.1.2 Histologische Nachweismethoden der Axonpathologie

Die Versilberung nach Bielschowsky (Bielschowsky 1903) ermöglicht die Feststellung einer verminderten axonalen Dichte und eine generelle Beurteilung der Axonmorphologie. Die Silberimprägnation bewirkt eine schwarze bis tiefbraune Färbung von Axonen, Neurofibrillen und Dendriten. Sie lässt jedoch keine direkte Differenzierung zwischen geschädigten und intakten Axonen zu. Allerdings kann der Nachweis von Axonsphäroiden und Wallerscher Degeneration zusammen mit einer Reduktion der axonalen Dichte und einer generellen Kaliberverminderung der Axone auf eine axonale Schädigung hinweisen. Eine Aussage über den Zeitpunkt der axonalen Schädigung ist durch diese Färbung nicht möglich.

Die immunhistochemische Färbung des *amyloid precursor protein* (APP) ist eine weitere Nachweismethode der Axonpathologie. Das neuronale Membranprotein APP wird im Soma der Neurone produziert. Es ist in den Axonen von Nervenzellen zu finden und unterliegt einem schnellen anterograden axonalen Transport (Koo et al. 1990). In normal funktionierenden Axonen ist die

Konzentration an APP so gering, dass sie unter der Nachweisgrenze herkömmlicher immunhistochemischer Methoden liegt. Bei Funktionsstörung von Axonen, häufig durch Schädigung oder Durchtrennung, kommt es zur Unterbrechung des axonalen Transports und somit zur Akkumulation von APP. Dadurch entstehen lichtmikroskopisch erkennbare charakteristische Schwellungen der Axone, sogenannte APP-positive Sphäroide (Gentleman et al. 1993). Bisher ist noch fraglich, ob sich APP nur in irreversibel oder auch in reversibel geschädigten Axonen nachweisen lässt (Bitsch et al. 2000). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass inflammatorischer Axonschaden, dargestellt durch APP-Immunoreaktivität, spontan reversibel sein kann (Nikic et al. 2011). Durch den kurzen zeitlichen Abstand zwischen Axonschaden und letzter immunhistochemischer Nachweisbarkeit der APP-Akkumulation, die nur 30 Tage beträgt, werden die APP-positiven Sphäroide als sensitiver Marker für akute axonale Schädigung angesehen (Trapp et al. 1998; Mai et al. 2011). Als Marker für axonale Schädigung bei MS wurde APP erstmals von Ferguson et al. eingesetzt (Ferguson et al. 1997).

1.3.1.3 Ausmaß und zeitlicher Verlauf der Axonpathologie

Eine Verminderung der Axondichte ist in nahezu allen MS-Läsionen zu finden. Das Ausmaß der Abnahme ist jedoch zwischen den einzelnen MS-Verlaufsformen, den verschiedenen Läsionsstadien sowie interindividuell, aber auch innerhalb eines einzigen MS-Patienten sehr unterschiedlich (Bitsch et al. 2000). Außerdem weisen die verschiedenen histopathologischen Stadien der MS-Läsionen jeweils bestimmte Muster der Axonpathologie auf.

Aktive Läsionen zeigen ein hohes Ausmaß an Axonsphäroiden und zahlreiche schmalkalibrige Axone. Die axonale Dichte ist im Vergleich zu nicht betroffener weißer Substanz stark reduziert (Mews et al. 1998). Trotz relativem axonalem Erhalt werden Axonsphäroide und relativ große Axontranssektionen beobachtet, die sowohl mit als auch ohne Myelinscheide vorkommen (Frischer et al. 2009; Trapp et al. 1998; Bjartmar und Trapp 2001; Bjartmar et al. 2001). Auffällig ist, dass die Neurofilamentfasern von dystrophischen Axonen und Axonsphäroiden normalerweise nicht phosphoryliert sind (Ferguson et al. 1997). Die Axonschädigung korreliert mit dem Ausmaß der entzündlichen Infiltrate innerhalb der Läsion (Frischer et al. 2009). Insgesamt kann bei aktiven MS-Läsionen von starker akuter Axonschädigung gesprochen werden, die nicht lediglich als Endergebnis wiederholter entzündlicher Krankheitsprozesse anzusehen ist, sondern bereits in sehr frühen Krankheitsstadien beginnt (Kuhlmann und Brück 2000).

Chronisch-aktive Läsionen weisen ein qualitativ und quantitativ milderer Bild an Axonschwellungen auf (Ferguson et al. 1997). Axontranssektionen sind am zahlreichsten im Bereich entzündlicher Infiltrate lokalisiert, also insbesondere in den geringgradig, aber aktiv demyelinisierenden hyperzellulären Rändern der chronischen Läsionen. Dies unterstreicht den Zusammenhang zwischen Axonschädigung und Entmarkung (Trapp et al. 1998). Da chronische Läsionen durch einen beträchtlichen axonalen Verlust gekennzeichnet sind, der bis zu 70 % erreichen kann (Stadelmann et al. 2011), kann der fehlende Axonschaden im Zentrum der Läsion ein Hinweis auf Axonverlust sein.

In chronisch-inaktiven Läsionen sind nur wenige Axonsphäroide zu finden, jedoch wird eine kontinuierliche, chronische Schädigung von Axonen auf deutlich geringerem Niveau beobachtet (Kornek et al. 2000) sowie ein ausgeprägter Verlust an Axonen. Noch vorhandene Axone erscheinen verdickt im Vergleich zu solchen in chronisch-aktiven Läsionen. Dies ist möglicherweise die Folge von Axonschwellung in Verbindung mit chronischen Krankheitsprozessen (Shintaku et al. 1988). Das Ausmaß an akut geschädigten Axonen und Entzündung in inaktiven Läsionen von MS-Patienten und der weißen Substanz gesunder Kontrollpersonen gleichen Alters ist vergleichbar (Frischer et al. 2009).

Insgesamt sind chronische Läsionen allerdings durch einen beträchtlichen axonalen Verlust gekennzeichnet. Akute Axonschädigungen im Sinne von axonalen Transportstörungen sind dagegen nur in geringem Maß zu finden. Dagegen sind axonale Transportstörungen in akuten Läsionen (Kornek et al. 2000) und im Randbereich von chronisch-aktiven Läsionen (Ferguson et al. 1997) am stärksten ausgeprägt.

Der Vergleich der verschiedenen klinischen Verlaufsformen zeigt, dass bei der schubförmigen und der sekundär chronisch-progredienten Manifestationsform der akute Axonschaden in den frühen Stadien der Erkrankung ein signifikant stärkeres Ausmaß aufweist als im weiteren Verlauf. Bei der primär chronisch-progredienten Verlaufsform treten dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung der akuten Axonpathologie auf (Kuhlmann et al. 2002). Die relativ geringe klinische Auswirkung der deutlichen Axonpathologie der schubförmigen Verlaufsform kann möglicherweise auf zu Beginn der Erkrankung noch funktionierende Kompensationsmechanismen zurückgeführt werden. Sind diese nicht mehr ausreichend, nimmt die Erkrankung einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf an (Petzold et al. 2005; Trapp et al. 1999).

1.3.1.4 Pathogenese und Mechanismen der axonalen Schädigung

Als Hauptursache axonaler Schädigung gilt oft die entzündlich bedingte Demyelinisierung. Durch den Verlust der Myelinscheide kann es zu schwerer Dysregulation der Axonphysiologie und -homöostase und elektrophysiologisch zu Leitungsverzögerungen und -blöcken kommen (Lubetzki und Stankoff 2014). Allerdings wurde das Vorkommen geschädigter Axone auch in normal erscheinender, nicht demyelinisierter weißer Substanz beschrieben (Bjartmar und Trapp 2003). Tierexperimentelle Daten zeigen, dass selbst ausgeprägte Demyelinisierung nicht unbedingt in Funktionsstörungen des ZNS resultiert (Murray et al. 1998). Daher dürften zumindest teilweise auch andere pathogenetische Faktoren zu neurologischen Defiziten und zu deren histologischem Korrelat, der Axonschädigung, führen.

Inflammatorische und exzitotoxische Einwirkungen auf die Axone sowie der Untergang von Oligodendrozyten und weiteren für die Axonhomöostase bedeutsamen Zellen des ZNS zählen zu den auslösenden Faktoren der neuroaxonalen Schädigung. Diese verursachen schließlich ein Energieungleichgewicht des Axons, welches wiederum zu einem Zustand der virtuellen Hypoxie führt. Schlussendlich kommt es zur Degeneration des axonalen Zytoskeletts (Harris und Sloane 2012).

Folgende zelluläre und molekulare Mechanismen sind im Einzelnen am Axonuntergang beteiligt: In der Literatur ist eine Korrelation zwischen Axonschädigung und Entzündung, speziell der Anzahl an zytotoxischen **CD8+ T-Zellen** sowie **Mikroglia und Makrophagen**, beschrieben (Bitsch et al. 2000; Neumann 2003). Die **CD8+-zytotoxischen T-Zellen** können durch Perforin und Granzym unter bestimmten Bedingungen MHC-I-exprimierende Neurone und insbesondere deren Axone akut schädigen (Medana et al. 2001; Bitsch et al. 2000). Auch autoreaktive, MBP-spezifische T-Zellen fördern potentiell die Aktivierung von Mikroglia und damit die Axondestruktion (Gimsa et al. 2000). **Makrophagen** in akuten MS-Läsionen und im Randsaum chronisch-aktiver Läsionsstellen exprimieren Matrix-Metalloproteinasen. Diese führen u. a. zu Demyelinisierung und Axonverlust (Anthony et al. 2000; Newman et al. 2001). Zudem produzieren Makrophagen während der akuten Inflammation toxische Mediatoren wie Stickstoffmonoxid oder weitere Proteasen (Lassmann et al. 2001; Lassmann 2003). Das im entzündlichen Milieu hoch konzentrierte Stickstoffmonoxid kann reversible Leitungsblöcke in demyelinisierten und unauffälligen Axonen und schlussendlich deren irreversible Schädigung verursachen (Redford et al. 1997). Zu den **unspezifischen Entzündungsmediatoren** in MS-Läsionen

zählen auch Zytokine, freie Radikale und Exzitotoxine wie Glutamat (Kornek et al. 2000). Glutamat wird im Rahmen der Entzündungsreaktion von Immunzellen in großem Maß sezerniert und wirkt in dieser Konzentration schädigend auf Axone ein (Pitt et al. 2000). Zudem ist **Oligodendrozytendenzimierung** ein häufig beobachtetes Phänomen in älteren MS-Läsionen und in der weißen Substanz, die an Entzündungsareale angrenzt, und hat einen negativen Einfluss auf die Axonhomöostase (Harris und Sloane 2012). Dem Oligodendrozytentod vorausgehen kann eine Funktionsstörung der Oligodendrozyten mit nachfolgender Demyelinisierung (Lucchinetti et al. 2000). Außerdem sind die Oligodendrozyten nicht nur für die Myelinscheide sondern auch für die Axone selbst wichtig. Daher wirkt sich eine Oligodendrozytendenzimierung in mehrfacher Hinsicht negativ auf die Axone aus (Bottelbergs et al. 2010). Auch die **oxidative Schädigung** von Oligodendrozyten und Neuronen ist mit einer Axon- und Neuronschädigung assoziiert. Eine wichtige Rolle kommt dabei vermutlich der mitochondrialen Schädigung zu, welche durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmonoxidverbindungen getriggert werden kann (Mahad et al. 2008). Destruktiv auf die Axone wirken zudem **spezifische Antikörper**. Diese können gegen Neurofascin, welches man an Ranvierschen Schnürringen findet (Mathey et al. 2007; Meinel et al. 2011), oder gegen das Myelinprotein MOG gerichtet sein. In letzterem Fall wird tierexperimentell ein Zusammenhang mit Demyelinisierung beschrieben (Zhou et al. 2006). Die **Demyelinisierung**, ein histologisches Schlüsselmerkmal der MS, zieht einen sog. *loss of trophic support* nach sich. Das bedeutet, dass die fehlende Myelinscheide nicht mehr einer ihrer Aufgaben, der trophischen Unterstützung des Axons, nachkommt. Da die Remyelinisierung jedoch insbesondere im chronischen Krankheitsstadium unvollständig ist, kommt es zur Axondegeneration (Bjartmar et al. 2003; Compston 2004).

Der Axonschädigung in den verschiedenen Läsionsformen und Stadien der MS können verschiedene der genannten Pathomechanismen zugrunde liegen, die möglicherweise dennoch in einer gemeinsamen Wegstrecke der Schädigung enden (Lassmann et al. 2001; LoPachin und Lehning 1997). Viele der genannten Mechanismen führen nämlich zu einem **Energieungleichgewicht des Axons**, häufig durch die Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen (Mahad et al. 2009). Dadurch werden energieabhängige Prozesse wie die Proteinsynthese und der schnelle axonale Transport reduziert. Auch die Funktion der energieabhängigen Na^+/K^+ -Adenosintriphosphatase (ATPase) kann nicht mehr ausreichend aufrechterhalten werden. Das daraus resultierende Elektrolytungleichgewicht triggert eine Reihe von calciummedierten neurodegenerativen Prozessen, ähnlich einem ischämischen Ereignis. Man spricht von virtueller Hypoxie

(Trapp und Stys 2009). Weitere Mechanismen, u. a. die bereits genannte Demyelinisierung, Glutamatergische Toxizität und die axonale Energieimbalance, bewirken einen **vermehrten Calcium-einstrom** in das Axon. Dies aktiviert calciumabhängige Proteasen, welche das axonale Zytoskelett zerstören (Anthony et al. 1998; Wilkins et al. 2003; Lassmann et al. 2003). Das Axon wird durchtrennt und die elektrophysiologische Leitung unterbrochen. Einen weiteren Beitrag zum Axonverlust leistet die **Wallerische Degeneration**. Sie beschreibt einen Prozess, bei dem eine Transsektion in einem bestimmten Abschnitt der Nervenfasern, induziert durch verschiedene Schädigungsmechanismen, eine Degeneration der distal der Läsion gelegenen Axonabschnitte bewirkt (Shindler et al. 2008). Dies ist eine mögliche Erklärung für den Axonverlust in ansonsten im Wesentlichen unauffälliger weißer Substanz (Evangelou et al. 2000).

In akuten Läsionen überwiegen vermutlich andere Schädigungsmechanismen als in chronischen Läsionen (Stadelmann 2011). Bei ersteren scheint die Entzündung eine entscheidende Rolle zu spielen, insbesondere Entzündungsmediatoren, zytotoxische T-Zellen und Autoantikörper. Bei den chronischen MS-Läsionen stehen neurodegenerative Prozesse im Vordergrund. Führende Mechanismen sind hier Demyelinisierung und Oligodendrozytendegeneration, mitochondriale Dysfunktion bei gleichzeitig erhöhtem Energiebedarf sowie humorale und zelluläre Komponenten des Immunsystems, die immer noch in inaktiven Plaques zu finden sind. Es kommt zum langsamen progredienten Verlust demyelinisierter Axone (Lassmann 2003; Popescu und Lucchinetti 2012).

Des Weiteren besteht die Vermutung, dass immunologische Mechanismen in der normal erscheinenden weißen Substanz maßgeblich zum Ausmaß der neuroaxonalen Schädigung beitragen können (Stadelmann 2011).

Die Kompensation der Axonschädigung ist für die Schubrückbildung von großer Bedeutung. Im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch zur Akkumulation des Axonverlusts und damit zu persistierenden neurologischen Ausfällen (Bjartmar und Trapp 2001).

1.3.1.5 Therapie der Axonschädigung bei der MS

Die neuroaxonale Einheit ist zur therapeutischen Zielstruktur mehrerer Studien geworden, die bisher jedoch noch nicht das Stadium der klinischen Anwendbarkeit erreicht haben.

Kürzlich durchgeführte klinische Studien betonen die Bedeutung früher und intensiver antiinflammatorischer Behandlung zur Verbesserung des Outcomes bei MS-Patienten. Dennoch besteht weiterhin die dringende Notwendigkeit, wirksame Pharmaka zu entwickeln, die in der progredienten Krankheitsphase den Axonverlust verhindern (Stadelmann 2011).

1.3.2 Axonale Schädigung bei der NMO

1.3.2.1 Bedeutung der axonalen Schädigung bei der NMO

Im Gegensatz zur MS besteht bei der NMO bereits nach dem ersten Schub ein hohes Risiko für eine dauerhafte klinische Behinderung (Wingerchuk et al. 2007b). Für die MS wird angenommen, dass von allen histopathologischen Charakteristika das Ausmaß an Axonschädigung und -verlust am besten mit dem Schweregrad der bleibenden klinischen Behinderung korreliert (De Stefano et al. 1998). Auch für die NMO gilt, dass ausgedehnte Axonschädigung zu schwerer Behinderung führt (Bukhari et al. 2012). Es wird sogar angenommen, dass die axonale Schädigung bei der NMO gravierender ist als bei der MS (Miyazawa et al. 2007; Fujihara 2006). Bei beiden Krankheitsbildern korreliert jedoch der Axonschaden mit der Schwere des Krankheitsverlaufs (Wang et al. 2013). Bisher existieren keine publizierten Langzeitstudien zu Zeitverlauf, Ausmaß und Mechanismus axonaler Schädigung sowie axonalem Verlust in humanen und experimentellen NMO-Läsionen.

1.3.2.2 Mechanismen

Welche Mechanismen könnten nun pathogenetische Relevanz bei der Axonschädigung der NMO haben?

Im Folgenden soll gezeigt werden, dass eine starke Evidenz für die pathogenetische Relevanz der Glutamatexzitotoxizität für axonale Schädigung bei NMO angenommen werden kann. Dies legen folgende Erkenntnisse zur NMO und ihrem verwandten Krankheitsbild MS nahe.

Astrozyten, welche den Neurotransmitter Glutamat wieder aus dem synaptischen Spalt entfernen, sind bei NMO erkrankt bzw. depletiert (Misu et al. 2007).

Bei MS werden Astrozyten, im Gegensatz zur NMO, als voll funktionsfähig angesehen. Das bedeutet, dass der Neurotransmitter Glutamat schnell aus dem Läsionsparenchym entfernt werden kann. Dennoch ist Glutamatexzitotoxizität an oligodendroglialer und axonaler Schädigung

in MS und entsprechenden Tiermodellen beteiligt (Pitt et al. 2000; Werner et al. 2001). Dementsprechend kann bei der NMO, die wesentlich durch Astrozytopathie gekennzeichnet ist, in noch höherem Maß mit Glutamatergischer Exzitotoxizität gerechnet werden.

Glutamaterge N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)- und Aminomethylphosphonsäure(AMPA)/Kainat-Rezeptoren, welche durch die hohen Glutamatspiegel verstärkt aktiviert werden, sind auf Neuronen und deren Axonen exprimiert, aber auch auf Oligodendrozyten der weißen Substanz (Karadottir et al. 2005; Kukley et al. 2007; Misu et al. 2006; Stys und Lipton 2007). Dies gibt erste Hinweise darauf, auf welche Zellen das Glutamat exzitotoxisch wirken kann (Marignier et al. 2010).

Neue Daten klären einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen der NMO-IgG-Wirkung auf Astrozyten und der Glutamatoxizität: AQP4 und der Glutamat-Transporter EAAT2, der wesentlich für die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt ist, liegen als makromolekularer Komplex in der Astrozytenmembran vor. Die Bindung von AQP4-Antikörpern an AQP4 der Astrozyten bewirkt die Internalisierung von AQP4 mit nachfolgender Herunterregulation von EAAT2. Dies führt über eine herabgesetzte Glutamatwiederaufnahme vermutlich zur Störung der Glutamat-Homöostase (Hinson et al. 2008; Hinson et al. 2010; Jacob 2009).

Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass exzessive Glutamatspiegel in NMO-Läsionen, die als Folge einer verminderten Clearance durch die NMO-IgG-mediiert zerstörten Astrozyten entstehen, zu einer verstärkten Bindung an NMDA- und AMPA-Rezeptoren auf Axonen, Neuronen und Oligodendrozyten (Ogden und Taynelis 2011) und somit zu einer exzitotoxischen Schädigung der Axone führen können. Angesichts der enormen Bedeutung der Glutamatoxizität, insbesondere in NMO-Läsionen der grauen Hirnsubstanz, stelle ich die Hypothese auf, dass antiglutamaterge Therapie zu einer erheblichen Reduktion von neuroaxonaler Schädigung und Verlust führen kann.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die glutamatinduzierte Apoptose von Neuronen selektiv durch einen Caspase-3-Inhibitor geblockt werden kann (Steinbach und Lutz 2007). Daher erscheint auch die Applikation eines Caspase-3-Inhibitors im fokalen NMO-Modell sinnvoll, um die Auswirkung desselben auf die axonale Schädigung zu untersuchen.

Die Literatur bietet ebenfalls mehrfach Evidenz für eine zusätzliche Exzitotoxizität durch Adenosintriphosphat (ATP). ATP wird verstärkt durch geschädigte Neurone und aktivierte Gliazellen freigesetzt und kann durch Ca^{2+} -Überladung seine exzitotoxische Wirkung auf Oligodendrozyten, Myelin, Neurone und Axone entfalten, bis hin zum neuronalen Zelltod (Liu et al. 2010; Arbeloa et al. 2012; Domercq et al. 2010; Matute 2011).

Anhaltende Aktivierung des purinergen ionotropen *P2X purinoceptor 7* (P2X7-Rezeptor) durch ATP verursacht *In-vivo*-Läsionen, welche typische Merkmale von MS-Plaques zeigen, wie z. B. Demyelinisierung, Oligodendrozytentod und axonale Schädigung. Umgekehrt verhindert die Anwendung von P2X7-Rezeptorantagonisten(RA) nicht nur die ATP-Exzitotoxizität in Oligodendrozyten, sondern zeigt auch neuroprotektive Effekte und verbessert die neurologischen Symptome der chronischen experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Krankheitsmodell der MS (Arbeloa et al. 2012; Oyanguren-Desez et al. 2011; Matute et al. 2007).

Diese Zusammenhänge sind ein starker Hinweis darauf, dass ATP möglicherweise über exzitotoxische Mechanismen zur axonalen Schädigung bei der NMO beiträgt. Es liegt daher nahe, den Einfluss einer verminderten ATP-Konzentration auf die Axonschädigung der NMO zu untersuchen. Das kann über die Blockierung der P2X7-Rezeptoren oder über die Applikation eines ATP-abbauenden Enzyms, wie z. B. Apyrase, erreicht werden. Dies ist meines Wissens nach bisher noch nicht geschehen und soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Axonschädigung und -verlust ist ein Schlüsselmerkmal der NMO und wahrscheinlich die Hauptursache irreversibler neurologischer Beeinträchtigung bei dieser Erkrankung. Dennoch wurden bisher weder der Zeitverlauf noch die Mechanismen und Therapiemöglichkeiten der Axondegeneration in experimenteller und humaner NMO im Detail untersucht. Zudem liegt noch keine klinisch anwendbare gezielte Therapieoption für die Axonschädigung bei der NMO vor, obwohl die Literatur Hinweise auf eine erfolgreiche antiglutamaterge und antipurinerge pharmakologische Therapie enthält. Auch ein Vergleich zwischen dem Ausmaß der Axonschädigung in NMO und MS wurde bisher nicht beschrieben.

Die vorliegende Arbeit soll daher folgende Fragen beantworten:

Wie früh sind axonale Transportstörungen im experimentellen fokalen NMO-Modell in der Ratte nachweisbar? Wie stark ist ihre Ausprägung? Und wie entwickeln sie sich im zeitlichen Verlauf?

Bewirkt die gezielte Applikation verschiedener Pharmaka wie Glutamat-Rezeptorantagonisten, P2X7-Rezeptorantagonisten, Caspase-3-Inhibitoren, ATP-abbauenden Enzymen und von IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-RA) eine signifikante Reduktion an APP⁺ Axonsphäroiden in fokalen NMO-Läsionen? Ist ein potenzieller Erfolg der antiglutamatergen Behandlung durch einen direkten Effekt auf die neuroaxonale Einheit oder einen indirekten Effekt auf z. B. die Protektion von Oligodendrozyten zu erklären?

Wie ausgeprägt fällt die Axonschädigung in den verschiedenen Aktivitätsstadien der humanen NMO sowie im Vergleich mit MS aus, nachgewiesen durch APP⁺ Axonsphäroide als Indikator axonaler Transportstörungen?

2 Material und Methoden

Zusätzliche Informationen und Erläuterungen zu konventionellen Verfahren, Laborausstattung, Instrumenten, Lösungen und anderen Chemikalien sind im Anhang zu finden.

2.1 Das fokale NMO-Tiermodell

2.1.1 Tierexperimente

2.1.1.1 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden an sechs bis acht Wochen alten Lewis-Ratten mit einem Gewicht von 170 bis 240 g durchgeführt. Die Tiere wurden von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) erworben. Die Unterbringung erfolgte in Käfigen mit je sechs Tieren bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 h sowie Futter und Wasser *ad libitum*. Es wurden nur weibliche Ratten für die Experimente verwendet. Alle Versuche erfolgten nach dem deutschen Tierschutzgesetz, und die Protokolle wurden von der Bezirksregierung Braunschweig, Deutschland, anerkannt.

2.1.1.2 Das fokale NMO-Modell

Um die Pathogenese und den zeitlichen Verlauf der axonalen Schädigung bei NMO zu untersuchen, wurde ein antikörpermediertes, T-Zell-unabhängiges Modell verwendet. Dazu erfolgte der Einsatz AQP4-spezifischer bivalenter, IgG1-rekombinanter monoklonaler Antikörper (rAbs), die aus dem Liquor eines NMO-Patienten nach klinischer Erstmanifestation gewonnen wurden. Die Rekonstruktion der Antikörper aus den gepaarten schweren und leichten Kettensequenzen von Plasmazellklonen aus dem Liquor wurde im Labor von Jeffrey Bennett im Department of Neurology and Ophthalmology, University of Colorado, Denver, USA, unternommen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden der rekombinante anti-AQP4-Antikörper 53 (rAb-53) und der rekombinante Kontrollantikörper Ab 2B4, der gegen das Masernvirus-Nukleokapsid-Protein gerichtet ist, eingesetzt.

Die intrazerebrale stereotaktische Antikörperinjektion wurde unter Anästhesie mit Ketamin (60 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt. Nach vollständigem Verlust des Bewusstseins wurde durch einen Rostrokaudalschnitt der Zugang zum Schädel freigelegt. Anschließend wurde das zu operierende Tier in einem stereotaktischen

Rahmen fixiert. 1 mm kaudal und 2 mm sagittal des Bregmas wurde der Schädel mit einem sehr kleinen Bohrloch versehen. Lediglich eine minimal dünne Knochenschicht wurde zum Schutz des darunterliegenden Hirngewebes belassen. Anschließend erfolgte die vorsichtige Eröffnung des Schädels und der Meningen mit einem Mikrodissektionsmesser. Mit einer fein kalibrierten Glaskapillare wurde stereotaktisch ein Antikörper-Serum-Gemisch (1 μ l rAb-53 (2.5 mg/ml) oder ein rekombinanter Kontrollantikörper (2.5 mg/ml) verdünnt in Serum und Komplement) in den M1-Motorcortex oder das Corpus callosum injiziert. Das Gemisch enthielt zudem den Farbstoff *monastral blue* zur Markierung der Läsionsstelle. Um die Gewebeschädigung zu minimieren, erfolgte die Applikation sehr langsam über einen Zeitraum von mehreren Minuten. Die Tiere erhielten Buprenorphin (Temgesic®; 0.03 mg/kg Körpergewicht) während der Operation, 6 h später und 12 h später, um eine ausreichende Analgesie zu gewährleisten. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, drei Tage, sieben Tage) nach Injektion wurden die Ratten perfundiert. Anschließend wurde das gewonnene Gewebe für die immunhistochemische Behandlung aufbereitet.

2.1.1.3 Pharmakologische Experimente

Die fokalen NMO-Läsionen sind neben dem Astrozytenverlust auch durch eine Schädigung von Axonen und axonalem Transport gekennzeichnet, bedingt durch die destruiende Wirkung von Anti-AQP4-Antikörpern und injiziertem Komplement. Um die Rolle von Glutamat und ATP auf die Axonpathologie zu untersuchen, wurden den Tieren NMDA-Rezeptor-, AMPA/Kainat-Rezeptor-, P2X7-Rezeptorantagonisten und ein IL-1-RA sowie Apyrase und Caspase-Inhibitoren injiziert.

Als NMDA-Rezeptorantagonisten wurden *D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid* (D-AP5) und Dizocilpin (MK-801) eingesetzt, als P2X7-Rezeptorantagonisten Periodat-oxidiertes Adenosintri-phosphat (oATP) und *brilliant blue G* (BBG). Des Weiteren fanden die AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo[f]quinoxalin-7-sulfonamid-Dinatriumsalz (NBQX) und *6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion* (CNQX) Einsatz sowie ein IL-1-RA, der Caspase-3-Inhibitor z-VAD und Apyrase. Die Pharmaka wurden zusammen mit rAb-53 und humanem Komplement intrazerebral lokal injiziert bei einem Gesamtinjektionsvolumen von 2 μ l und einer Pharmakonkonzentration von 500 μ mol/l. Die Pharmaka MK-801, BBG und Memantin wurden außerdem in je einem eigenen Experiment systemisch appliziert (je ein Gesamtinjektionsvolumen von 2 μ l bei einer Pharmakomenge von 0,3 mg/kgKG MK-801,

45,5 mg/kgKG BBG und 20 mg/kg KG Memantin). Die systemische Gabe erfolgte 0,5 h vor und 6 h nach der fokalen stereotaktischen Injektion von NMO-Antikörpern und humanem Komplement. Kontrolltieren wurden nur rAb-53 und Komplement mit Pufferlösung (Vehikel) oder nur die Pharmaka injiziert. Die Ratten wurden nach 24 h perfundiert, und das Hirngewebe wurde für die histologische Auswertung vorbereitet.

2.1.1.4 Gewebeasservation

Zu den für das jeweilige Experiment festgesetzten Zeitpunkten wurden die Tiere mit einer letalen Dosis an 14%igem Chloralhydrat anästhesiert. Nach Verlust der nozizeptiven Reflexe und des Lidschlussreflexes erfolgte die Perfusion. Die Ratten wurden transkardial mit *phosphate-buffered saline* (PBS) perfundiert, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen, sowie mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) zur Gewebefixierung. Die Gehirne wurden entnommen und für 48 h bei 4 °C in 4%igem PFA aufbewahrt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde das Gewebe in 4-6 mm dicke Scheiben geschnitten und anschließend in Wasser gewaschen. Die Gehirne wurden in einer aufsteigenden Alkohol-Xylol-Paraffin-Reihe schrittweise dehydriert. Dazu wurde ein automatischer Gewebeprozessor über Nacht verwendet. Das Gewebe wurde dann in Paraffinblöcke eingebettet, mit einem Schlittenmikrotom in sehr dünne Scheiben von 1 µm Schichtdicke geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Injektionsstellen wurden durch die erfolgte Mitinjektion von *monastral blue* identifiziert.

Vor der histologischen bzw. immunhistochemischen Färbung der Gehirne wurden die Gewebeschnitte in Xylol (viermal 5 min) und Isopropyl (einmal für 1 min) sowie in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal für 4 min in 100%igem Isopropylalkohol, einmal für 3 min in 90%igem, in 70%igem und in 50%igem Isopropylalkohol) deparaffiniert und rehydriert und mit destilliertem Wasser gespült. Die gefärbten Gewebeproben wurden nach der histologischen Färbeprozedur, welche im folgenden Abschnitt beschrieben wird, zwecks Konservierung dehydriert, indem die oben beschriebenen Alkoholreihen in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt wurden, und anschließend mit DePex-Medium eingedeckelt.

2.1.2 Histologische Aufarbeitung der Präparate

2.1.2.1 Histologische Färbungen

Folgende histologische Färbungen wurden zur Gewebeaufbereitung verwendet:

Die HE-Färbung wurde routinemäßig nach Standardprotokollen im histologischen Labor des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Beurteilung der Zellmorphologie durchgeführt.

Desweiteren wurde die Versilberung nach Bielschowsky verwendet. Hierfür wurden die Gewebeschnitte nach der Entparaffinierung und der Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe für 20 min in 20%iger Silbernitrat-Lösung inkubiert und nachfolgend mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde der 20%igen Silbernitrat-Lösung unter Rühren so lange tropfenweise 32%ige Ammoniak-Lösung hinzugefügt, bis der entstandene Niederschlag verschwand. Im Anschluss daran wurden der Silbernitrat-Ammoniak-Lösung zwei weitere Tropfen der 32%igen Ammoniak-Lösung hinzugegeben. In der so hergestellten Lösung wurden die Schnitte für 15 min bei Dunkelheit inkubiert und anschließend in mit drei Tropfen Ammoniak versetztem destilliertem Wasser gespült. Zur Silbernitrat-Ammoniak-Lösung wurden unter Rühren zehn Tropfen Entwickler-Lösung hinzugegeben und die Schnitte bis zur Schwarzfärbung der Nervenfasern und Braunfärbung des Parenchyms in der Lösung belassen. Danach wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült, um die Reaktion zu stoppen, und 2 min lang in eine 2%ige Natriumthiosulfat-Lösung gegeben. Zum Schluss wurden die Schnitte kurz mit Leitungswasser gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

2.1.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Ziel der immunhistochemischen Färbungen ist es, bestimmte Gewebestrukturen, welche als Antigene fungieren, durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu identifizieren und sichtbar zu machen. Dies beruht auf dem Prinzip, dass der jeweilige Antikörper spezifisch an ein bestimmtes Epitop, d. h. an den eine Immunantwort auslösenden Abschnitt eines Antigens, bindet. Mit Hilfe von Enzymen, Chromogenen und ggfs. weiteren Antikörpern lassen sich diese Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar machen.

Im Folgenden sollen zunächst das Prinzip und Protokoll der Einfachfärbung beschrieben werden und im Anschluss daran das Prinzip und Protokoll der Doppelfärbung.

Die hier angewendeten Einfachfärbungen beruhen auf der Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Dies ist eine indirekte Nachweismethode, bei welcher mono- oder polyklonale Antikörper aus z. B. Mäusen oder Kaninchen als Primärantikörper verwendet werden. Sie binden nach Inkubation mit dem Gewebe an ihre spezifischen Antigenstrukturen und werden anschließend durch

einen biotinylierten Sekundärantikörper erkannt. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin bindet aufgrund seiner hohen Affinität zu Avidin an den hinzugegebenen Avidin-Peroxidase-Komplex. Über eine Farbreaktion mit einem Chromogen, z. B. 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB), wird der Antigen-Antikörper-Enzym-Komplex sichtbar gemacht.

Folgendes Protokoll liegt den bei dieser Arbeit verwendeten Einfachfärbungen zugrunde: Die in PFA fixierten Gewebeschnitte wurden zuerst in Xylol entparaffiniert (Xylol dreimal 5 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100 %, 100 %, 90 %, 70 %, 50 % für jeweils 3 min, dann Spülen in destilliertem Wasser) rehydriert. Die Verweildauer betrug in Xylol 10 min und in den Alkoholen und in Aqua dest. je 5 min. Dann erfolgte die Demaskierung der Antigene (*epitope retrieval*), denn durch die Fixierung des Gewebes in PFA kann es zu einer Modifikation der Gewebeproteine, zu einer Einschränkung ihrer Immunreaktivität und zu einem Verlust an Epitopen kommen. Da in diesem Fall die Paratope eines Antikörpers nicht mit den entsprechenden Antigenen reagieren können, ist eine Wiederherstellung der Epitope, eine sogenannte Antigendemaskierung, erforderlich, wodurch die Präsentation und Reaktivität der Antigene verbessert oder wiederhergestellt werden. Eine solche Vorbehandlung wurde in der Mikrowelle mit Citratpuffer (10 mM und pH 6) für fünfmal 3 min durchgeführt. Dazwischen wurde die Küvette abwechselnd mit Aqua dest. und Citratpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Schnitte mit entionisiertem Wasser gespült und für 10 min in eine Küvette mit PBS-Puffer gestellt. Es folgte die Inkubation in 3 % H₂O₂ bei 4 °C für 20 min zur Blockierung der endogenen Peroxidase. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 10 % *fetal calf serum* (FCS) in PBS bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht mit dem spezifischen Primärantikörper (siehe Liste der Primärantikörper in Tabelle 2) bei 4 °C inkubiert, welcher in 10 % FCS in PBS verdünnt wurde. Am nächsten Tag erfolgte eine dreimalige Spülung mit PBS und die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, der in 10 % FCS in PBS verdünnt war und spezifisch an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet. Nach 1 h wurde erneut mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 1 h in 0.1 % Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (POX) inkubiert, welche in 10 % FCS in PBS verdünnt war. Ungebundene Peroxidase wurde durch anschließendes Spülen mit PBS entfernt. Die Reaktion wurde unter Verwendung eines Chromogens, bei dieser Arbeit zumeist DAB, entwickelt, welches durch die gebundene Peroxidase oxidiert wurde und eine dunkelbraune Färbung hervorrief. Die Entwicklung der Gewebeschnitte erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle. Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine

einminütige Gegenfärbung in Hämalun-Lösung angewandt. Danach wurden die Schnitte 7 min lang in Leitungswasser gebläut, in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis Xylol (erst Spülen in Aqua dest, dann Ethanol 50 %, 70 %, 90 %, 100 %, 100 % für jeweils 3 min, dann Isoxylol für einmal 1 min, dann Xylol dreimal 5 min) dehydriert und abschließend mit DePeX eingedeckelt.

Im Folgenden soll auf die immunhistochemische Doppelfärbung eingegangen werden. Die Grundlage der Doppelfärbungen soll im Folgenden am Beispiel der in dieser Arbeit verwendeten Doppelmarkierungen für APP und GFAP erläutert werden.

In den durchgeführten Experimenten wurde die indirekte Methode immunhistochemischer Färbungen angewandt, die auf dem folgenden Prinzip beruht: Ein muriner Primärantikörper gegen APP wird mit dem Gewebe inkubiert, sodass eine Bindung an das nachzuweisende Markerprotein erfolgt. Der spezifische biotinylierte Sekundärantikörper (Schaf-Anti-Maus), dessen eigenes Fc-Fragment kovalent an Biotin gebunden ist, bindet mit seinem Fab-Teil spezifisch an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Des Weiteren wird als Enzym die Avidin-gekoppelte Peroxidase hinzugegeben. Aufgrund der starken Affinität des basischen Hühnereiweißes Avidin zu Biotin findet eine Bindung zwischen diesen beiden Molekülen statt. Unter Anwesenheit von H_2O_2 oxidiert die Peroxidase hinzugegebenes DAB, was zur einer Präzipitation von DAB und damit zu einem braunen Niederschlag führt, der folglich an genau denjenigen Gewebestellen auftritt, wo der primäre Antikörper an APP gebunden hat. Damit wird das zu detektierende Markermolekül sichtbar gemacht. Eine Amplifizierung des Signals findet zum einen durch die potenzielle Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper statt, zum anderen durch die mögliche Bindung von bis zu vier Avidin-Molekülen an ein Biotin-Molekül (Mulisch und Welsch 2010).

Analog dazu bindet bei der Doppelmarkierung der zweite Primärantikörper (anti-GFAP aus dem Kaninchen) an das darzustellende Antigen, in dieser Arbeit das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Der Sekundärantikörper stammt aus der Ziege und bindet mit einem Fab-Fragment an das Fc-Teil des Kaninchen-Antikörpers. Dies verhindert Interaktionen mit den an APP gebundenen Antikörper-Komplexen, die aus Maus und Schaf gewonnen wurden. Das andere Fab-Teil des Sekundärantikörpers richtet sich gegen den ebenfalls aus dem Kaninchen stammenden Tertiärantikörper, der mit der alkalischen Phosphatase (AP) verbunden ist. Dieses Enzym setzt hinzugegebenes *fast blue* zu einem blauen Produkt um. Diese Vorgehensweise wird Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP-Methode) genannt.

Das folgende Protokoll wurde in dieser Arbeit für die Doppelmarkierungen für APP und GFAP verwendet: Um einen optimalen Erhalt der Gewebemorphologie zu gewährleisten, wurde das Gewebe in 4%igem PFA fixiert. Die dadurch erforderliche Antigendemaskierung erfolgte durch Erhitzen der Gewebeproben in einer Mikrowelle in 10 mM Citratpuffer, für viermal bis zu 4 min. Nach jedem Hitzezyklus wurde destilliertes Wasser nachgefüllt. Die Gewebeschnitte wurden abgekühlt und mit destilliertem Wasser sowie anschließend in PBS gewaschen.

Es folgte nun die Blockierung der endogenen Peroxidase durch zehnmünütige Inkubation mit 3%igem H₂O₂ in PBS bei Raumtemperatur sowie anschließend die Blockierung unspezifischer Proteine durch zehnmünütige Inkubation mit 10 % FCS in PBS bei Raumtemperatur.

Nach Waschen mit PBS wurde als Primärantikörper ein muriner Antikörper gegen APP in der Endverdünnung 1:2000 verwendet mit 10 % FCS in PBS als Verdünnungsmittel. Alle Inkubationen mit Antikörpern erfolgten in einer feuchten Kammer, so auch der Primärantikörper gegen APP über Nacht bei 4 °C. Als Sekundärantikörper fungierte ein biotinylierter **Sheep-Anti-Mouse**-Antikörper in der Endverdünnung 1:200, welche ebenfalls durch Hinzugabe von 10 % FCS in PBS hergestellt wurde. Zwischen den Inkubationen mit den einzelnen Antikörpern wurde jeweils für mindestens 5 min mit PBS gespült.

Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Gewebeschnitte mit ExtrAvidin-Peroxidase in der Konzentration 1:1000 inkubiert, erneut mit PBS gespült, mit DAB (25 mg DAB in 50 ml PBS + 20 µl 30 % H₂O₂) entwickelt und mit destilliertem Wasser und *tris-buffered saline* (TBS; pH 7,45) gespült.

Die Blockierung von unspezifischen Antigenbindungsstellen erfolgte erneut, in diesem Fall durch Vorinkubation der Schnitte mit 10 % FCS in TBS für 20 min, in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Der Primärantikörper gegen GFAP aus dem Kaninchen wurde in der Endkonzentration 1:1000 aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert.

Nach einem Waschschrift in TBS wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:50 für 60 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit TBS folgte die Entwicklung mittels *fast blue* (50 mg *fast red TR* in 49 ml 0,1 M TBS + 10 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat in 1 ml N,N-Dimethylformamid + 50 µl 1 M Levamisol) unter mikroskopischer

Kontrolle sowie eine Kernfärbung mit Hämalaun zur Zellkern-Detektion. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser und Leitungswasser gespült und mit Aquatex eingedeckelt.

Im tierexperimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurden spezifische Markerproteine für Astrozyten (GFAP und AQP4), für transportgestörte Axone (APP), für ein Myelinprotein (MBP), für Oligodendrozyten (*neurite outgrowth inhibitor protein A* (NogoA)) inklusive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Olig2) immunhistochemisch markiert. Diese sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

Auf APP wurde in der Einleitung bereits eingegangen (s. 1.3.1.2).

GFAP ist ein gliaspezifisches Intermediärfilament, welches spezifisch in Astrozyten und Astrozytom-Zelllinien vorkommt und eine große Bedeutung für die zytoskelettale Stabilität der Astrozyten hat (Bignami et al. 1972; Weinstein et al. 1991). Aufgrund seines spezifischen Vorkommens wird es als Markerprotein zum immunhistochemischen Nachweis von Astrozyten verwendet.

MBP ist das am zweithäufigsten vorkommende Protein im ZNS. Es repräsentiert 30 % aller zentralnervösen Myelinproteine (Hildebrand 1993). Sein Vorkommen als Myelinabbauprodukt in Makrophagen in Abwesenheit von Abbauprodukten seltenerer Myelinproteine wie MAG, MOG oder CNP gilt als Marker für spät demyelinisierende MS-Läsionen (Popescu und Lucchinetti 2012).

AQP4 ist das häufigste und wichtigste Kanalprotein des ZNS, welches die Wasserhomöostase reguliert (Amiry-Moghaddam und Ottersen 2003). Es ist in großer Dichte in der Zellmembran von Astrozytenfortsätzen lokalisiert, welche an der Bildung der Bluthirnschranke beteiligt sind (Roemer et al. 2007; Wolburg 1995), sowie auch in den Astrozyten des posterioren Nervus opticus, in den Ependymzellen der Ventrikel und den meningealen Zellen der Pia mater (Graber et al. 2008). AQP4 ist an der Migration von Astrozyten beteiligt und übt aufgrund seiner Bedeutung für die extrazelluläre K^+ -Clearance auch einen wichtigen Einfluss auf die neuronale Signaltransduktion aus (Saadoun et al. 2005; Padmawar et al. 2005).

NogoA wirkt im ZNS hemmend auf das Neuritenwachstum und ist ein Marker für reife Oligodendrozyten (Reindl et al. 2003; Kuhlmann et al. 2008; Hao et al. 2014).

Olig2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) und reifen Oligodendrozyten exprimiert wird. Er detektiert beide Zelltypen, weist aber bei letzterem ein schwächeres Färbungssignal auf (Kuhlmann et al. 2008).

2.2 Humanes Gewebe

2.2.1 Verwendetes Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde neben den Tierexperimenten humanes Gewebe von NMO- und MS-Patienten aus der Sammlung des Instituts für Neuropathologie der Universität Göttingen verwendet, das sechs NMO-Patienten bioptisch (Alter 24 bis 58 Jahre, Durchschnittsalter 38 Jahre, drei weibliche und drei männliche Patienten) und sechs NMO-Patienten autoptisch (Alter 16 bis 77 Jahre, Durchschnittsalter 50 Jahre, sechs weibliche und keine männlichen Patienten) entnommen wurde. Weiterhin wurde Gewebe von drei MS-Biopsien (Alter 32 bis 69 Jahre, Durchschnittsalter 46 Jahre, ein weiblicher und zwei männliche Patienten) und von zwölf MS-Autopsien (Alter 30 bis 63 Jahre, Durchschnittsalter 50 Jahre, fünf weibliche und sechs männliche Patienten) entnommen und histologisch aufbereitet. Tabelle 1 zeigt relevante klinische und pathologische Daten der Patienten.

Nach neuropathologischer Standardmethode wurden die Präparate in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Tabelle 1: Epidemiologische Daten der untersuchten Patienten

	Patient	Alter, Geschlecht	Dauer der Erkrankung [in Jahren]	Verlaufs- form (RR/KIS/ PP/SP)	Anti- AQP4- Antikörper- Se- rostatus
NMO-Biopsien:	B12/1752	51, m	1,5	RR	sero-negativ
	B05/1274K	28, w	unbekannt	unbekannt	sero-negativ
	B12/1258KV	24, m	wenige Monate	rasch progredient	sero-negativ
	B09/958K (V)	37, w	9	RR	sero-positiv
	B11/758K	58, m	10	RR	sero-positiv
	B09/502 (I)	32, w	5	RR	sero-positiv
MS-Biopsien	B12/1201K	69, w	wenige Wochen	KIS	-
	B12/507K	32, m	12	RR	-
	B12/617 (K I)	38, m	wenige Wochen	KIS	-

	Patient	Alter, Geschlecht	Dauer der Erkrankung [in Jahren]	Verlaufs- form (RR/KIS/ PP/SP)	Anti- AQP4- Antikörper- Se- rostatus
NMO- Autopsien	106-09-25	77, w	23	RR	sero-po- sitiv
	206/04-9	44, w	1,3	RR	nicht ge- testet
	M43/80	49, w	unbekannt	RR	nicht ge- testet
	L66/62	69, w	0,5	Rasch schubförmig progredient	nicht ge- testet
	SN51/96-7	42, w	unbekannt	unbekannt	nicht ge- testet
	AN05/99YY	16, w	4	RR	nicht ge- testet
MS-Au- topsien	136/09-25	45, w	unbekannt	unbekannt	-
	M42-80J	57, m	29	PP	-
	M22-74G	30, w	9	PP	-
	4174-5	36, m	1	PP	-

	Patient	Alter, Geschlecht	Dauer der Erkrankung [in Jahren]	Verlaufs- form (RR/KIS/ PP/SP)	Anti- AQP4- Antikörper- Serostatus
	290/95-8	44, w	15	SP	-
	L36/81R	41, m	6	SP	-
	T8/00	62, m	unbekannt	SP	-
	M38-68E	61, m	32	SP	-
	M10-82J	63, m	19	SP	-
	M57-85C	61, w	19	PP	-
	M82-83D	59, w	9	PP	-

2.2.2 Histologische Aufarbeitung des humanen Gewebes

Zur Untersuchung des humanen Gewebes wurden sowohl histologische Färbungen (Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff-Färbung (LFB/PAS-Färbung), Bielschowsky-Färbung) als auch immunhistochemische (GFAP, AQP4, KiM1P, APP, IgG, MRP14, MBP) Färbungen angewandt.

2.2.2.1 Histologische Färbungen

Bei der LFB/PAS-Färbung werden mittels *luxol fast blue* phospholipidhaltiges Myelin blau bis grün und Zellkerne sowie Nisslsubstanz rosa bis violett gefärbt. Die Inkubation im Schiff'schen Reagenz bewirkt eine rotviolette Färbung von Parenchym und entmarkten Arealen.

Bei der Durchführung der Färbung erfolgte zunächst die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe (hier nur bis zum 90%igen Ethanol). Über Nacht

wurden die Gewebeschnitte bei 60 °C mit der Luxol-Fast-Blue-Lösung inkubiert und am nächsten Tag in 90%ige Ethanollösung überführt. Zur anschließenden Differenzierung wurden die Gewebeschnitte so lange in 0,05%ige Lithiumcarbonatlösung, 70%iges Ethanol und in destilliertes Wasser eingetaucht, bis die überschüssige Färbelösung ausgewaschen war und schließlich nur noch das Myelin die blaue Färbung zurückbehielt.

Hiernach wurden die Gewebeschnitte zunächst 5 min lang in 1%iger Perjodsäure mit Aqua dest. inkubiert und anschließend für 5 min mit Leitungswasser sowie danach dreimal mit Aqua dest. gespült. Der nächste Arbeitsschritt bestand in zwanzigminütiger Inkubation mit Schiff'schem Reagenz und erneutem Spülen mit Leitungswasser für 5 min. Dadurch erfolgte die Rosafärbung des Parenchyms. Anschließend wurden zur Gegenfärbung der Zellkerne die Gewebeschnitte für 2 min in Meyer'sche-Hämalaun-Lösung eingetaucht, mit Aqua dest. gespült, kurz in 1%igem Chlorwasserstoff-Alkohol differenziert und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Die Bielschowsky-Versilberung wurde bereits genauer beschrieben (s. 2.1.2.1).

2.2.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Es wurden immunhistochemische Färbungen zur Detektion von GFAP, AQP4, KiM1P, APP, IgG, MRP14 und MBP durchgeführt. Das Prinzip ist dasselbe wie oben beschrieben.

Im Folgenden sollen relevante Informationen zu den einzelnen Markerproteinen dargelegt werden:

APP, GFAP, AQP4 und MBP wurden bereits in vorhergehenden Abschnitten näher beschrieben (s. 1.3.1.2 und 2.1.2.2).

KiM1P wird als Panmakrophagenmarker angesehen (Bitsch et al. 1997), der neben Makrophagen auch mikrogliale Zellen detektiert (Paulus et al. 1992). KiM1P kommt insbesondere in lipidbeladenen Makrophagen von MS-Läsionen vor. Die Akkumulation dieser Makrophagen stellt ein Kennzeichen fortschreitender Demyelinisierung in MS-Läsionen dar (Li et al. 1996).

Immunglobuline der Klasse G stellen die größte Fraktion aller humanen Immunglobuline dar. Ihre immunhistochemische Anfärbung lässt die Aktivität des humoralen Immunsystems genau lokalisieren.

Das MRP14-Antigen, auch Calgranulin genannt, ist ein 14 kDa schweres calciumbindendes Protein der S-100-Familie, welches in neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird (Goebeler et al. 1993; Roth et al. 1994). Es ist ein Marker für frühe Aktivierung von Monozyten und ihre Gewebeinvasion bis zu ihrer endgültigen Differenzierung zu Makrophagen. Somit gilt MRP14 als immunhistochemischer Indikator für akute entzündliche Makrophagenaktivierung und frühaktive Läsionen (Hessian et al. 1993; Brück et al. 1995).

Tabelle 2 und Tabelle 3 zeigen relevante Daten zu den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern.

Tabelle 2: Primärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Antigen	Marker für	Ursprungsspezies /Klon	Hersteller	Verdünnung in 10 % FCS/PBS
APP	<i>amyloid precursor protein</i> ; Marker für frühe Axonschädigung	Maus/ 22C11	Chemicon	1:3000
AQP4	Aquaporin 4 auf Astrozytenfortsätzen	Kaninchen	Millipore	1:500
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> ; astrozytenspezifisches Intermediärfilament	Kaninchen	Dako	1:1000
IgG	Immunglobulin G	Kaninchen	BioGenex	1:100
KiM1P	makrophagen- und mikroglia-spezifischer Marker	Maus	Radzun et al., 1991	1:5000

Antigen	Marker für	Ursprungsspezies /Klon	Hersteller	Verdünnung in 10 % FCS/PBS
MBP	Basisches Myelinprotein	Kaninchen/ polyklonal	Dako	1:500
MRP14	Makrophagenmarker des frühaktiven entzündlichen demyelinisierenden Stadiums	Maus/ monoklonal	Acris	1:500

Tabelle 3: Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Bezeichnung	Konjugiert mit	Kat.Nr.	Hersteller	Verdünnung in 10 % FCS/PBS
Schaf-Anti-Maus-IgG	Biotin	RPN 1001	Amersham	1:200
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	AP	D 0487	Dako	1:50
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	Biotin	111-065-144	Dianova	1:500
Kaninchen-Anti-Maus-IgG	-	Z 0259	Dako	1:50

2.3 Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurde der axonale Schaden im tierexperimentellen NMO-Modell und in humanem NMO- und MS-Gewebe mikroskopisch quantifiziert. Zur genaueren

Charakterisierung von Läsionsstellen erfolgten zudem deskriptive Analysen verschiedener, oben genannter histologischer und immunhistochemischer Färbungen.

2.3.1 Mikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung und Morphometrie erfolgte unter 400- und 1000-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop von Olympus (Olympus BX-41; Olympus, Hamburg, Deutschland). Dieses war mit folgenden Objektiven ausgestattet: Objektiv 2x/0,05 (20-fache Vergrößerung), Objektiv 4x/0,10 (40-fache Vergrößerung), Objektiv 10x/0,25 (100-fache Vergrößerung), Objektiv 20x/0,40 (200-fache Vergrößerung), Objektiv 40x/0,65 (400-fache Vergrößerung) und Objektiv 100x/1,25 (1000-fache Vergrößerung).

Die verwendeten Okulare mit zehnfacher Vergrößerung, ebenfalls von der Firma Olympus hergestellt, verfügten über ein standardisiertes Zählgitter, um Zellzählungen zu ermöglichen. Die bildliche Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera (Olympus DP-71; Olympus, Hamburg, Deutschland). Sie wurde durch die Bildanalyse-Software Cell-F (Cell-F; Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) und durch die Photoshop-Software (Adobe Photoshop; Adobe Systems GmbH München, Deutschland) ergänzt.

2.3.1.1 Auswertung des Rattengewebes

Bei der Auswertung des tierischen Gewebes wurde in den fokalen NMO-Läsionen in der APP-GFAP-Doppelmarkierung die akute axonale Schädigung anhand der APP⁺ Sphäroide quantifiziert. Die stereotaktischen Injektionsstellen in den Rattengehirnen wurden mittels *monastral blue* identifiziert. In der benachbarten Umgebung wurden meist der Stichkanal und durch die Doppelmarkierung mit GFAP und APP zudem die astrozytendepletierten Läsionsstellen detektiert. Die braungefärbten Axonsphäroide wurden mit dem oben beschriebenen Zählgitter im gesamten Läsionsareal quantifiziert. Die Quantifizierung wurde in zwei Kategorien durchgeführt: Die parenchymale axonale Schädigung wurde durch Einzelzählung eines jeden APP⁺ Axons ermittelt, wohingegen die perivaskuläre Axonschädigung visuell quantifiziert und in folgende semi-quantitative Kategorien eingeteilt wurde: 0 = keine axonale Schädigung, 0,5 = kaum axonale Schädigung, 1 = sehr wenig axonal Schädigung, 1,5 = wenig axonale Schädigung, 2 = mittelgradige axonale Schädigung, 2,5 = deutliche axonale Schädigung, 3 = sehr starke axonale Schädigung. Die Dichte an parenchymalen Axonsphäroiden wurde nur für die graue Substanz

ermittelt, das Ausmaß der perivaskulären axonalen Schädigung wurde für graue und weiße Substanz getrennt bestimmt.

Es wurde stets ein ausreichender Abstand zum Stichkanal eingehalten, um durch die Injektion mechanisch geschädigte Axone nicht zu berücksichtigen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass bei jedem Präparat vergleichbare Kriterien zur Quantifizierung geschädigter Axone angewandt wurden. Um diese Vergleichbarkeit und Auswertungsobjektivität zu gewährleisten, wurden die einzelnen Gewebeproben bis zu viermal unabhängig voneinander ausgewertet. Dabei ließ die bei jedem Präparat unterschiedliche Größe der Läsion keine einheitliche Anzahl an ausgewerteten Feldern zu. Anschließend erfolgte die Hochrechnung auf geschädigte Axone pro mm².

2.3.1.2 Auswertung des humanen Gewebes

Das bioptisch und autoptisch gewonnene Hirnparenchym der NMO- und MS-Patienten wurde anhand der oben genannten histologischen und immunhistochemischen Färbungen ausgewertet. Bevor der axonale Schaden in den Läsionen quantifiziert wurde, wurden die Läsionen anhand ihrer Demyelinisierungsaktivität klassifiziert. Dazu wurden für die NMO-Fälle die Färbungen LFB/PAS, Bielschowsky, GFAP, AQP4, KiM1P, APP und IgG herangezogen, für die MS-Fälle die Färbungen LFB/PAS, Bielschowsky, MRP14, MBP, KiM1P und APP.

Alle ausgewerteten MS-Läsionen wiesen die typischen Merkmale der Erkrankung auf: Demyelinisierung, relativer Axonerhalt in der weißen Substanz sowie ein entzündliches Infiltrat aus Makrophagen, Mikroglia und Lymphozyten. Die Läsionen wurden anhand ihrer Demyelinisierungsaktivität klassifiziert, welche folgendermaßen bestimmt wurde (Brück et al. 1995): Aktive Läsionen wiesen Makrophagen mit eingeschlossenen Myelinabbauprodukten auf, welche positiv für LFB und Myelinproteine wie MOG, MAG und CNP (in frühaktiven Läsionen) sowie PLP und MBP (auch in spätaktiven Läsionen) waren. Auf frühe Demyelinisierungsaktivität wies außerdem der Makrophagenmarker MRP14 hin. Chronisch-aktive Läsionen wurden durch einen hyperzellulären Randsaum mit myelinbeladenen Makrophagen, Mikroglia und vereinzelt T-Lymphozyten gekennzeichnet. Inaktive Läsionen waren hypozellulär und vollständig demyelinisiert. Es waren in geringer Zahl Makrophagen zu finden, die keine immunhistochemisch darstellbaren Myelinproteine, sondern lediglich leere Vakuolen oder PAS-positive Granula aufwiesen.

Bei den NMO-Fällen waren die Astrozytendepletion und der Verlust an AQP4 ausschlaggebend für die Festlegung der Läsionsgrenzen. Auch hier war die Demyelinisierung charakteristisch für alle ausgewerteten Läsionen. Die Klassifikation erfolgte, analog zum Vorgehen bei den MS-Fällen, über die Demyelinisierungsaktivität: Aktive Läsionen wurden, genau wie die aktiven MS-Läsionen, anhand der Myelinabbauprodukte in den Makrophagen sowie des Makrophagenmarkers MRP14, der in frühaktiven Läsionen positiv ist, definiert (s. o.). Weiteres Charakteristikum war die perivaskuläre Deposition von Immunglobulin G und Komplement. Inaktive schaumzellige Läsionen (*inactive foamy lesions*) enthielten schaumzellige, myelinbeladene Makrophagen, welche immunoreaktiv für KiM1P waren. Inaktive mikrogliale Läsionen waren komplett demyelinisiert, ohne Zeichen aktiver Demyelinisierung. Sie enthielten ein Infiltrat, welches hauptsächlich aus Mikrogliazellen bestand.

An den beschriebenen Läsionsstellen wurden die durch die APP-Färbung braun dargestellten Axonsphäroide mit dem oben genannten Zählgitter quantifiziert. Auch hier wurde darauf geachtet, dass bei jedem Präparat vergleichbare Kriterien zur Quantifizierung geschädigter Axone angewandt wurden. Anschließend erfolgte die Hochrechnung auf geschädigte Axone pro mm².

2.3.2 Statistische Darstellung der Ergebnisse

Die mikroskopisch ermittelten Daten wurden mit dem Programm Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Deutschland-GmbH; Unterschleißheim) festgehalten. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm GraphPad PRISM 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die durch die morphometrische Analyse gewonnenen Daten der verschiedenen experimentellen Gruppen wurden im Hinblick auf mögliche signifikante Unterschiede überprüft. Dazu wurden zunächst für jede Gruppe der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) bestimmt und mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft, ob die jeweiligen Daten einer Gauß'schen Normalverteilung entsprechen.

Die Berechnung der Signifikanz erfolgte für den Vergleich zwischen zwei Gruppen (Ratten: pharmakologisch behandelte Tiere vs. vehikelbehandelte Tiere; human: NMO-Patienten vs. MS-Patienten) bei verhältnisskaliertem parenchymalem Axonschaden von Ratten und humanen Fällen bzw. intervallskaliertem perivaskulärem Axonschaden der Rattengehirne. Die Daten wurden statistisch durch den ungepaarten t-Test mit ggfs. Welch-Korrektur analysiert. Dabei handelt es sich um einen Korrekturfaktor, der angewandt wird, wenn die zu vergleichenden

Gruppen unterschiedliche Varianzen aufweisen. p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Für den Vergleich von drei oder mehr Gruppen (Ratten: vehikelbehandelte Tiere vs. mit verschiedenen Pharmaka behandelte Tiere) wurde eine *analysis of variance* (ANOVA) herangezogen.

Auch die graphischen Darstellungen der Ergebnisse zur besseren Vergleichbarkeit und Übersichtlichkeit wurden mit GraphPad PRISM 5.00 generiert.

3 Ergebnisse

3.1 Axonpathologie im fokalen NMO-Modell

Die Untersuchung der axonalen Schädigung im fokalen NMO-Modell erfolgte lichtmikroskopisch, und zwar hauptsächlich in GFAP-APP-Doppelmarkierungen. Dies ermöglichte die Quantifizierung der Axonpathologie selektiv in den astrozytendepletierten Läsionsarealen.

3.1.1 Das fokale NMO-Modell

Das fokale stereotaktische NMO-Modell, welches für den tierexperimentellen Teil dieser Arbeit verwendet wurde, basiert auf der intrazerebralen stereotaktischen Injektion rekombinanter humaner Anti-AQP4-Antikörper zusammen mit Komplement oder humanem Serum. Durch diese Methode konnten Läsionen generiert werden, welche den humanen NMO-Läsionen in Bezug auf histopathologische Charakteristika wie Astrozytendepletion, Oligodendrozytenverlust und Axonpathologie sehr stark ähneln (**Abbildung 1**). Zum einen zeigen diese fokalen NMO-Läsionen 24 h nach Läsionsinduktion einen massiven selektiven Astrozytenverlust. Dies wird am Verlust der Immunoreaktivität für AQP4 und GFAP in Gewebeschnitten des Kortex und des Corpus callosum deutlich (**Abbildung 1B+C**). Zudem weisen die Läsionen eine akute Axonschädigung in Form von APP⁺ Axonsphäroiden auf. Diese treten sowohl im Hirnparenchym als auch in großer Dichte um zerebrale Blutgefäße herum auf (**Abbildung 1C**). Die Bielschowsky-Färbung zeigt dagegen keinen ausgeprägten Axonverlust, sondern einen relativen axonalen Erhalt (**Abbildung 1D**). Bereits nach 24 h ist eine verminderte Anfärbbarkeit des Myelins, hier repräsentiert durch MBP, zu beobachten (**Abbildung 1E**). Auch die Dichte der Oligodendrozyten (**Abbildung 1F**) und der OPCs ist stark reduziert (**Abbildung 1G**).

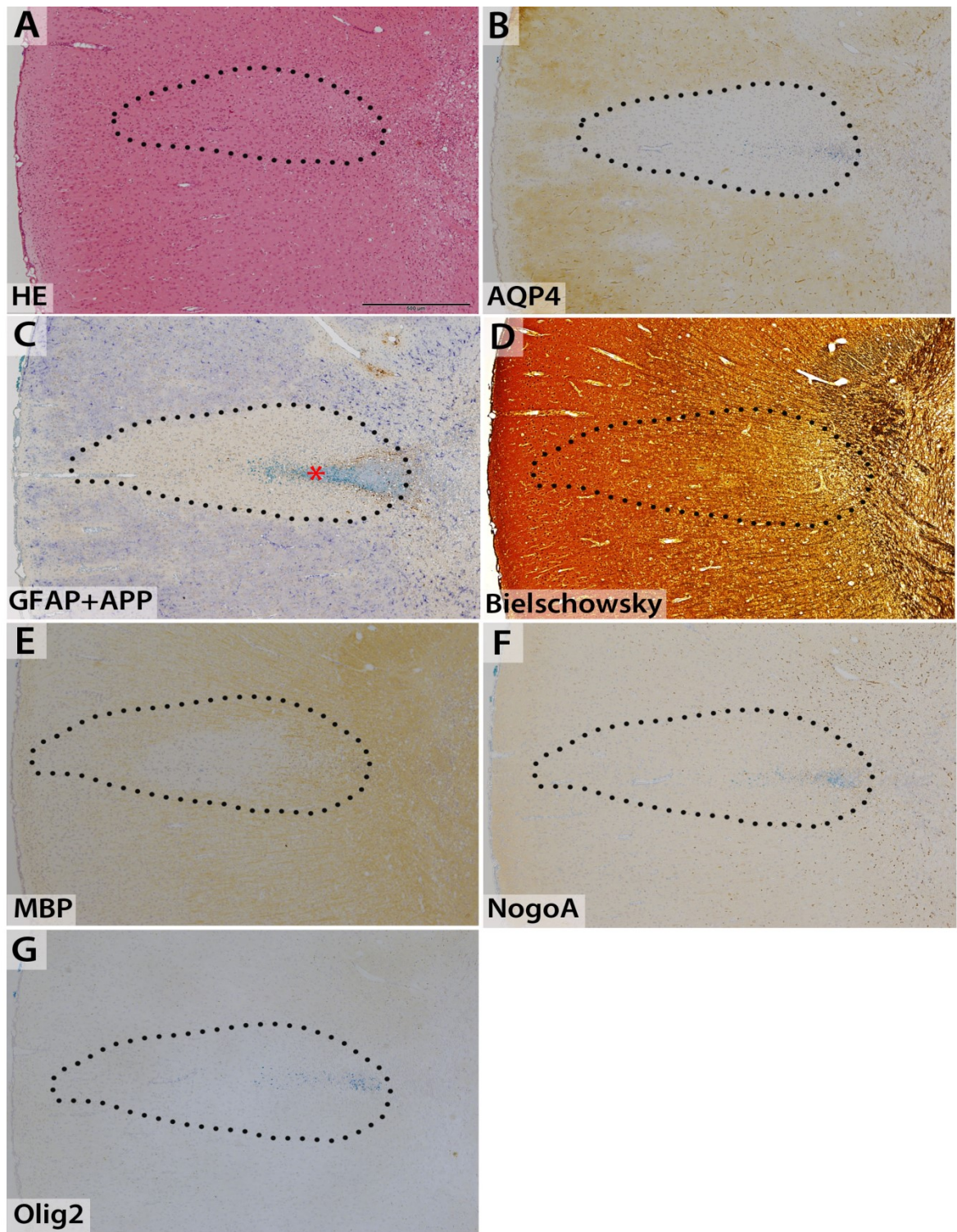


Abbildung 1: Histopathologische Eigenschaften der astrozytendepletierten Läsionen im fokalen NMO-Modell 24 h nach Injektion von NMO-IgG mit humanem Serum. Der Astrozytenverlust wird in den immunhistochemischen Färbungen gegen AQP4 (B, braun) und GFAP (C, dunkelblau) deutlich, welche ein vergleichbares Depletionsmuster aufweisen. Außerdem zeigen die NMO-Läsionen akute Axonschädigung in Form von parenchymalen und perivaskulären APP⁺ Axonsphäroiden (C, braun) bei relativem axonalem Erhalt (D; Bielschowsky). Zudem werden eine Abblassung des Myelins (E; MBP; braun) sowie ein Verlust an

Oligodendrozyten (F; NogoA; braun) und OPCs (G; Olig2; braun) beobachtet. Ein blauer Farbstoff (*monastral blue*) markiert die Injektionsstelle und das rote Sternchen den Injektionskanal. Die gestrichelten Linien begrenzen die astrozytendepletierten Areale. 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 500 μm .

3.1.2 Zeitverlauf der axonalen Schädigung im fokalen NMO-Modell

Anhand der GFAP-APP-Doppelmarkierung wurde der Zeitverlauf der Axonpathologie entsprechend der in Kapitel 2.3.1.1 erläuterten Vorgehensweise mikroskopisch beurteilt.

Mit den Zeitverlauf-Experimenten konnte das Ausmaß der axonalen Schädigung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Läsionsinduktion beurteilt werden: Nach 3, 6, 12, 18, 24 h, drei und sieben Tagen sowie zwei und vier Wochen wurden die Anzahl und Dichte an parenchymalen APP⁺ Axonsphäroiden ermittelt. 3 h nach fokaler Injektion waren noch keine deutliche Astrozytendepletion und keine nicht mechanisch bedingte Axonpathologie ersichtlich (**Abbildung 2B**). Die ersten APP-positiven Axonprofile im astrozytendepletierten Parenchym wurden 6 h nach Läsionsinduktion beobachtet (**Abbildung 2C**) (6 h: 801 ± 44 Axonsphäroide/ mm^2 , [angegeben als MW \pm SD, so auch im Folgenden]). Die Dichte an APP-positiven Axonsphäroiden nahm innerhalb des ersten Tages tendenziell zu (**Abbildung 2D+E**) (12 h: 650 ± 760 Axonsphäroide/ mm^2 ; 18 h: 1315 ± 337 Axonsphäroide/ mm^2). Ab 24 h wurde die Zunahme immer stärker und erreichte bei sieben Tagen ihr Maximum (**Abbildung 2F+H**) (24 h: 3381 ± 149 Axonsphäroide/ mm^2 ; drei Tage: 5624 ± 0 ($n = 1$) Axonsphäroide/ mm^2 ; sieben Tage: 7607 ± 1530 Axonsphäroide/ mm^2). Der Graph zeigt also in der ersten Woche einen kontinuierlichen Anstieg der akuten Axonschädigung (**Abbildung 2**). Nach zwei und vier Wochen ist keine akute Axonpathologie mehr zu finden. In den meisten Läsionen liegt nicht einmal mehr eine Astrozytendepletion vor.

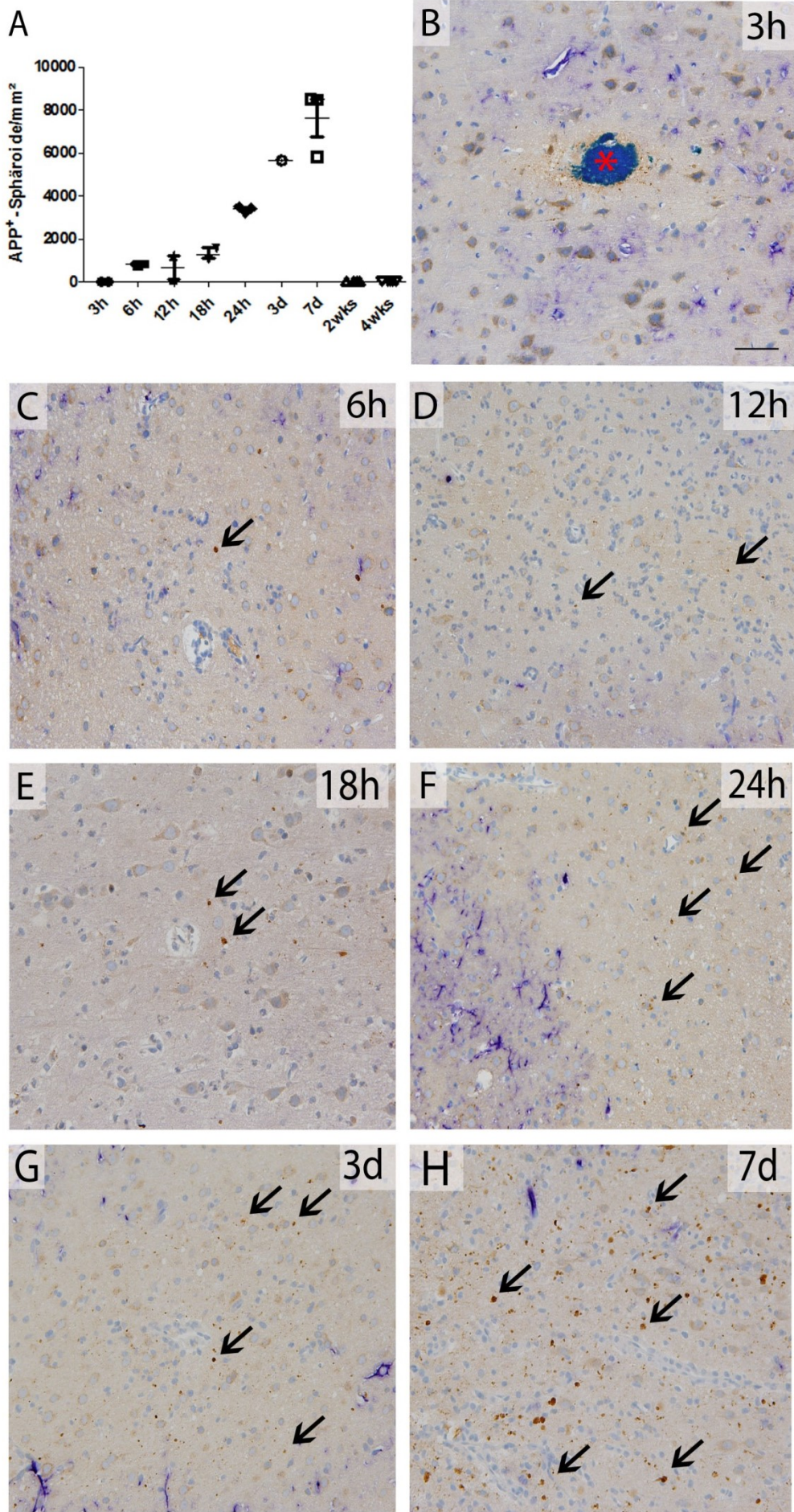


Abbildung 2: Zeitverlauf der Axonpathologie in Läsionen des fokalen NMO-Modells. GFAP-APP-Doppelmarkierungen. Astrozyten stellen sich violett dar und APP-positive Sphäroide braun. 3 h nach fokaler Injektion ist noch keine deutliche Astrozytendepletion und keine nicht mechanisch bedingte Axonpathologie ersichtlich. Unmittelbar um die Injektionsstelle finden sich transportgestörte, mechanisch zerstörte Axone (B). Nach 6 h (C) finden sich in astrozytendepletierten Arealen vereinzelte APP-positive Axonsphäroide, deren Dichte nach 12 h (D) und 18 h (E) zugenommen hat (A). Ab 24 h nach Injektion der NMO-IgG beginnt die Dichte an geschädigten Axonen sehr stark zuzunehmen (F, G) und erreicht das gemessene Maximum nach sieben Tagen (H). Nach zwei Wochen und vier Wochen ist keine axonale Schädigung in den Läsionsstellen mehr zu beobachten. Die quantitative Auswertung zeigt entsprechend in der ersten Woche eine kontinuierliche Zunahme der akuten Axonschädigung (A). Ein blauer Farbstoff markiert die Injektionsstelle (*). Die Pfeile weisen auf APP-positive Axonsphäroide. 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm.

3.1.3 Pharmakologische Behandlung der axonalen Schädigung im fokalen NMO-Modell

Anhand der GFAP-APP-Doppelmarkierung wurde die Axonpathologie entsprechend der in Kapitel 2.3.1 erläuterten Vorgehensweise mikroskopisch beurteilt. Dabei wurde der parenchymale Axonschaden quantitativ und der perivaskuläre axonale Schaden semiquantitativ erfasst.

3.1.3.1 Pharmakologische Behandlung der parenchymalen Axonschädigung

3.1.3.1.1 Parenchymale Axonschädigung nach Applikation von NMDA-Rezeptorantagonisten

Um die Hypothese zu testen, ob die Axonschädigung bei der NMO vom Glutamat- und insbesondere NMDA-Rezeptor abhängig ist, wurde in vier unabhängigen Experimenten je ein potenter NMDA-Rezeptorantagonist verabreicht: D-AP5 in fokaler Applikation, MK-801 in fokaler Applikation, Memantin in systemischer Applikation sowie MK-801 in systemischer Applikation.

Zuerst wurden D-AP5 und MK-801 in einer Konzentration von 500 µmol/L zusammen mit Anti-Aquaporin-4-Antikörpern und humanem Komplement stereotaktisch in den Rattenkortex injiziert (2 µl). Die Läsionen wurden nach 24 h ausgewertet. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass die fokale Injektion von D-AP5 sowie MK-801 die Dichte an parenchymalen APP⁺ Axonsphäroiden in astrozytendepletierten Arealen im Vergleich mit der vehikelbehandelten Kontrollgruppe signifikant reduzierte (**Abbildung 3**; D-AP5: 286 ± 246 APP⁺ Sphäroide/mm², MK-801: 220 ± 136 APP⁺ Sphäroide/mm², Kontrollen: 1606 ± 501 APP⁺ Sphäroide/mm², $p < 0,0001$, ANOVA).

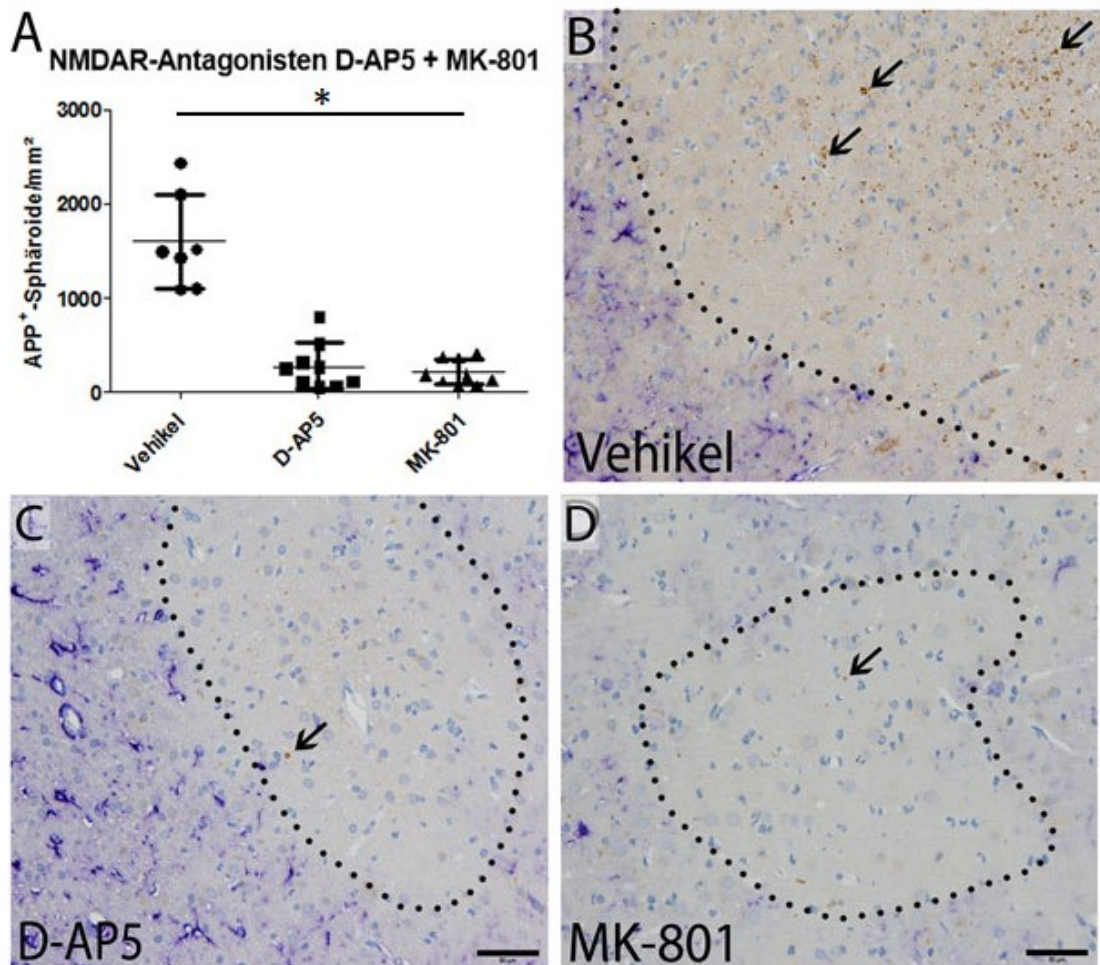


Abbildung 3: NMDA-Rezeptorantagonisten reduzieren signifikant die parenchymale axonale Schädigung. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP-GFAP-Doppelmarkierung nach Applikation von rAb-53 und humanem Serum bei mit D-AP5 (C) und MK-801 (D) behandelten Tieren nach 24 h eine signifikante Reduktion der parenchymalen APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (B; A) ($p < 0,0001$). Die gepunkteten Linien begrenzen die astrozytendepletierten Läsionsstellen. Die Pfeile zeigen auf APP-positive Axonsphäroide (braun). Astrozyten: dunkelblau; 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μm .

Anschließend wurde getestet, ob auch die systemische Applikation von NMDA-Rezeptorantagonisten, namentlich MK-801 und Memantin, axonale Transportstörungen verhindern könnte. Dazu wurden den Ratten 0,5 h vor und 6 h nach der fokalen stereotaktischen Injektion von Antikörpern und humanem Serum die NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 bzw. Memantin systemisch appliziert. Wieder wurden die Läsionen 24 h nach Läsionsinduktion ausgewertet. Auch hierbei zeigte sich, dass MK-801 sowie Memantin die Ausbildung parenchymaler axonaler Sphäroide signifikant verminderten, verglichen mit den vehikelbehandelten Kontrolltieren (**Abbildung 4**; MK-801 systemisch: 426 ± 57 APP⁺ Sphäroide/mm² ($n = 2$), Kontrollen: $1988 \pm$

31 APP⁺ Sphäroide/mm²; Memantin systemisch: 382 ± 137 APP⁺ Sphäroide/mm², Kontrollen: 2422 ± 63 APP⁺ Sphäroide/mm², p = 0,0167, Mann-Whitney-Test). Intrazerebrale Injektion (2 µl) der Rezeptorantagonisten allein wirkte sich nicht schädigend auf die Gehirnzellen bzw. Axone aus.

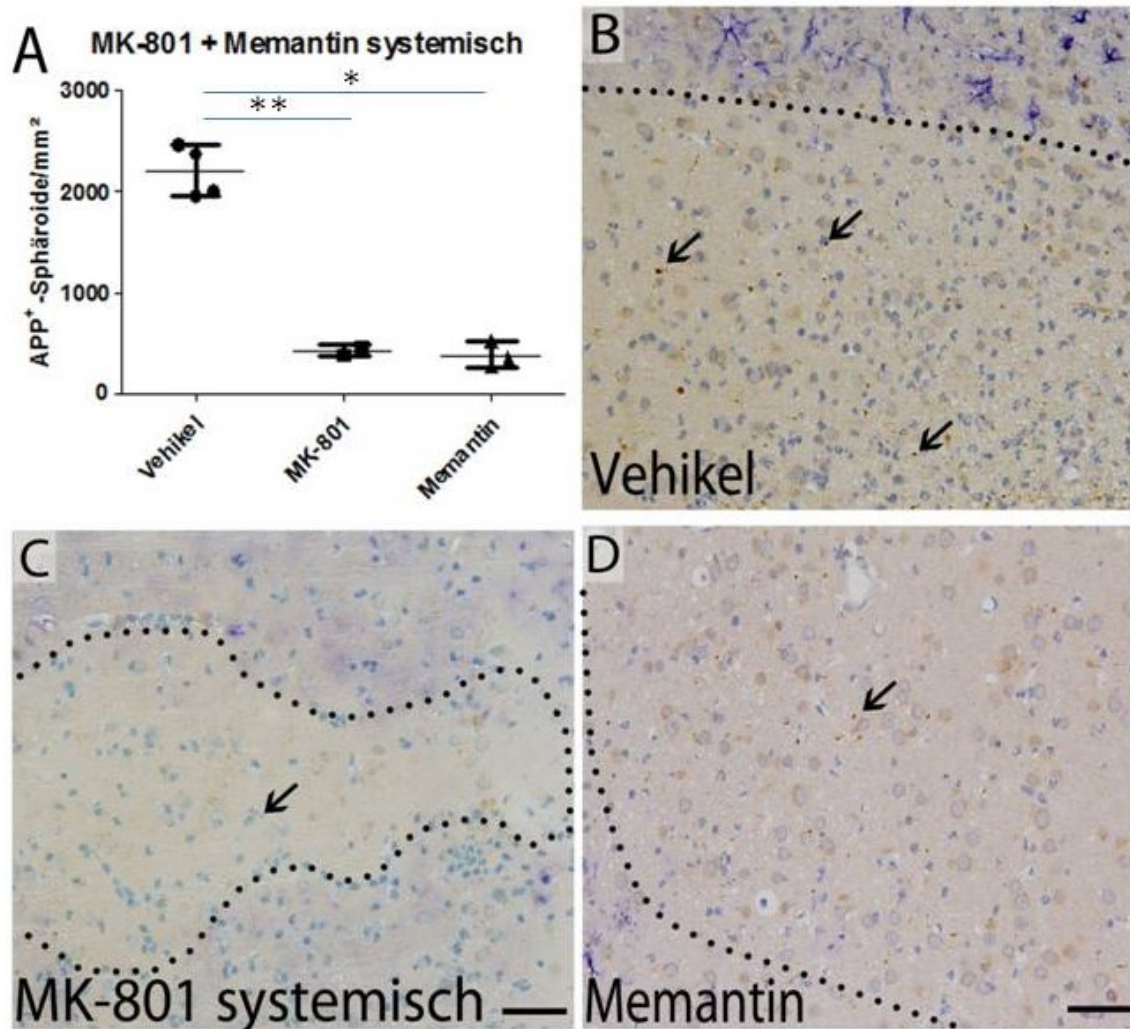


Abbildung 4: Systemisch applizierte NMDA-Rezeptorantagonisten reduzieren die parenchymale axonale Schädigung. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP-GFAP-Doppelmarkierung bei mit Memantin behandelten Tieren (D) nach 24 h eine signifikante Reduktion der parenchymalen APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (B; A) (p = 0,0167). Auch bei mit MK-801 behandelten Tieren (C) ist in der deskriptiven Analyse nach 24 h eine Reduktion der parenchymalen APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe zu beobachten (B; A). Die gepunkteten Linien begrenzen die astrozytendepletierten Läsionsstellen. Die Pfeile zeigen auf APP-positive Axonsphäroide (braun). Astrozyten: dunkelblau; 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm.

3.1.3.1.2 Parenchymale Axonschädigung nach Applikation von AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten

Zur Untersuchung des Einflusses des AMPA/Kainat-Rezeptor-Systems auf axonale Schädigung bei experimenteller NMO wurden den Ratten je NBQX oder CNQX gleichzeitig mit Anti-AQP4-Antikörpern und humanem Komplement injiziert. Ähnlich den NMDA-Rezeptorantagonisten zeigte sich auch nach Applikation jeder der beiden AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten eine signifikante Reduktion der Dichte an parenchymalen APP⁺ Axonsphäroiden verglichen mit den jeweiligen vehikelbehandelten Kontrollgruppen (NBQX: 422 ± 155 APP⁺ Sphäroide/mm², CNQX: 313 ± 113 APP⁺ Sphäroide/mm², Kontrollen: 1776 ± 392 APP⁺ Sphäroide/mm², $p = 0,0008$, ANOVA; siehe **Abbildung 5**).

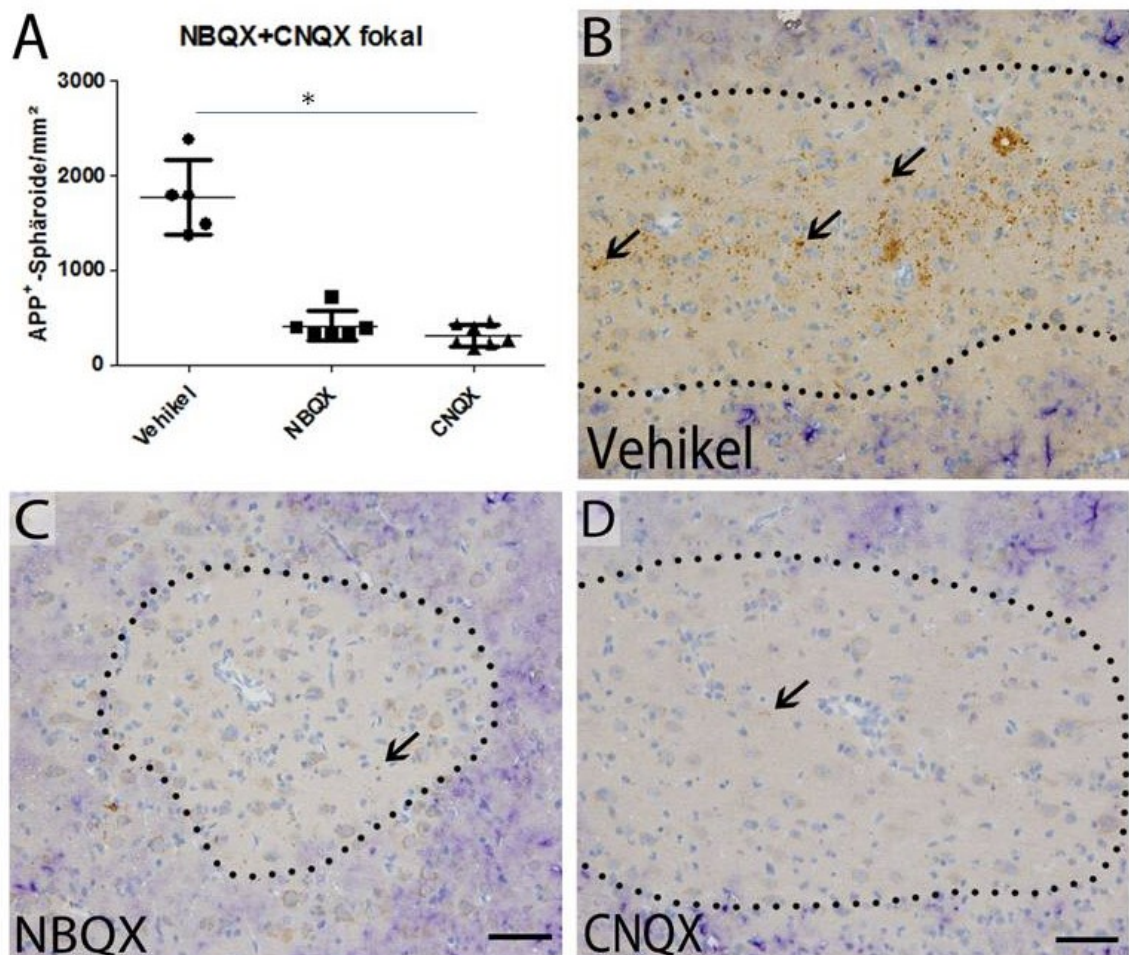


Abbildung 5: AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten reduzieren signifikant die parenchymale axonale Schädigung. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP-GFAP-Doppelmarkierung bei mit NBQX (C) und CNQX (D) behandelten Tieren nach 24 h eine signifikante Reduktion der parenchymalen APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (B; A) ($p = 0,0008$). Die gepunkteten

Linien begrenzen die astrozytendepletierten Läsionsstellen. Die Pfeile zeigen auf APP-positive Axonsphäroide (braun). Astrozyten: dunkelblau; 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μm .

3.1.3.1.3 Parenchymale Axonschädigung nach Applikation von P2X7-Rezeptorantagonisten und Apyrase

In einer weiteren Reihe an Experimenten wurde untersucht, ob die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zur axonalen Schädigung und Transportstörung beiträgt. In zwei dieser Experimentalsreihen wurden je BBG oder αATP zusammen mit Anti-AQP4-Antikörpern und humanem Komplement injiziert. Die Analyse der Axonpathologie 24 h nach Läsionsinduktion zeigte, dass P2X7-Rezeptor-Inhibitoren ebenfalls den Axonschaden in experimentellen NMO-Läsionen reduzieren (BBG: $204 \pm 59 \text{ APP}^+$ Sphäroide/ mm^2 , αATP : $380 \pm 231 \text{ APP}^+$ Sphäroide/ mm^2 , Kontrollen: $1863 \pm 632 \text{ APP}^+$ Sphäroide/ mm^2 , $p < 0,0001$, ANOVA, siehe **Abbildung 6**).

Apyrase, ein ATP-abbauendes Enzym, konnte die axonalen Transportstörungen nicht signifikant vermindern (Apyrase: $2075 \pm 670 \text{ APP}^+$ Sphäroide/ mm^2 , Kontrollen: $2160 \pm 934 \text{ APP}^+$ Sphäroide/ mm^2 , $p = 1,0$; Mann-Whitney-U-Test; **Abbildung 6**).

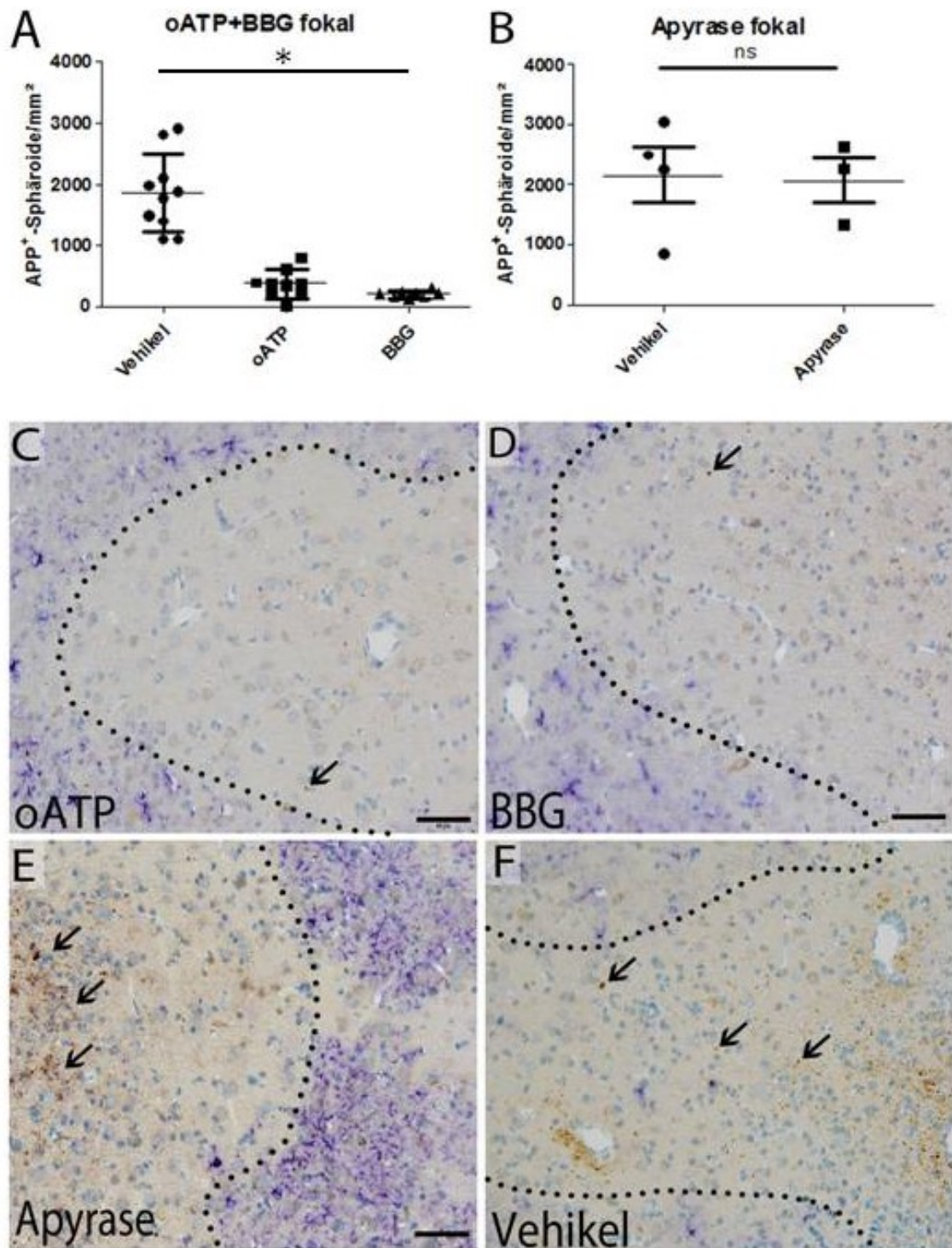


Abbildung 6: P2X7-Rezeptorantagonisten reduzieren signifikant die parenchymale axonale Schädigung, Apyrase jedoch nicht. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP-GFAP-Doppelmarkierung bei mit oATP (C) und BBG (D) behandelten Tieren nach 24 h eine signifikante Reduktion der parenchymalen APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (F; A) ($p < 0,0001$). Bei mit Apyrase behandelten Tieren (E) konnte keine signifikante Reduktion der parenchymalen APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe beobachtet werden (F; B) ($p = 1,0$). Die gepunkteten

Linien begrenzen die astrozytendepletierten Läsionsstellen. Die Pfeile zeigen auf APP-positive Axonsphäroide (braun). Astrozyten: dunkelblau; 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μm .

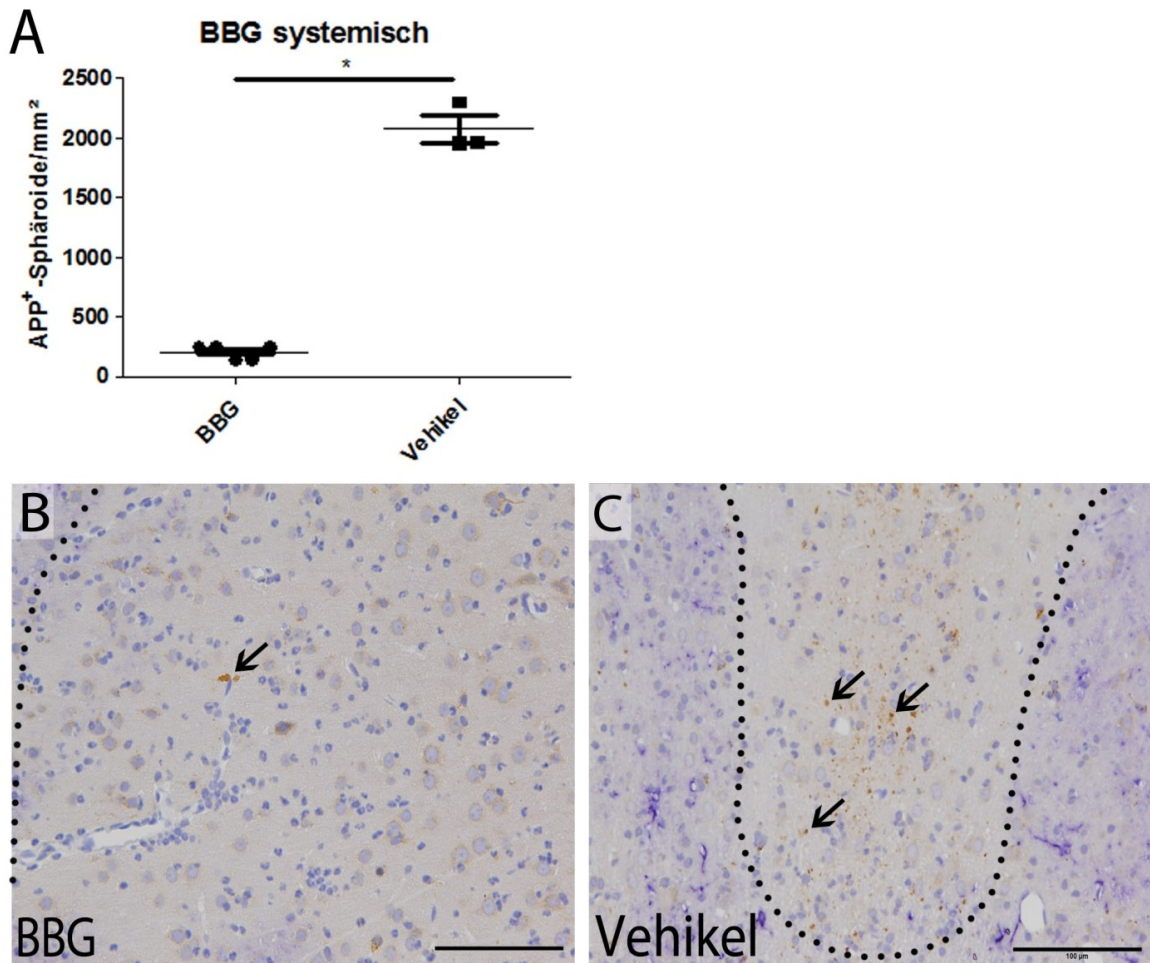


Abbildung 7: Systemische Applikation von P2X7-Rezeptorantagonisten reduziert signifikant die parenchymale axonale Schädigung im fokalen NMO-Modell. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP-GFAP-Doppelmarkierung bei systemisch mit BBG behandelten Tieren (B) nach 24 h eine signifikante Reduktion der parenchymalen APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (C; A) ($p = 0,0357$). Die gepunkteten Linien begrenzen die astrozytendepletierten Läsionsstellen. Die Pfeile zeigen auf APP-positive Axonsphäroide. 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μm .

Systemische Applikation von BBG kurz bevor und 6 h nach der stereotaktischen Läsionsinduktion trug verglichen mit den vehikelbehandelten Kontrolltieren gleichermaßen signifikant zur Verminderung der axonalen Transportstörungen bei (BBG systemisch: 210 ± 55 APP⁺ Sphäroide/mm², Kontrollen: 2081 ± 194 APP⁺ Sphäroide/mm², $p = 0,0357$, Mann-Whitney-U-Test, **Abbildung 7**).

3.1.3.1.4 Parenchymale Axonschädigung nach Applikation eines Caspase-3-Inhibitors und eines IL-1-RA

Um die Wirkung Caspase-3-abhängiger Prozesse auf axonale Schädigung im fokalen NMO-Modell zu untersuchen, wurde der Caspase-3-Inhibitor z-VAD gleichzeitig mit Anti-AQP4-Antikörpern und humanem Komplement in die Rattenhirne injiziert. Bei der Auswertung des Läsionsparenchyms 24 h nach der stereotaktischen Injektion wurde kein signifikanter Effekt auf das Ausmaß der Axonschädigung festgestellt (z-VAD: 2403 ± 790 APP⁺ Sphäroide/mm², Kontrollen: 3669 ± 2130 APP⁺ Sphäroide/mm², $p = 0,9048$, Mann-Whitney-U-Test; **Abbildung 8**).

Zusätzlich wurde die fokale Injektion eines IL-1-RA durchgeführt, um einen indirekten Effekt des P2X7-Blockers auf Mikroglia-Aktivierung und IL-1-Sekretion auszuschließen. Es konnte dabei keine signifikante Reduktion des Axonschadens nach Applikation des IL-1-RA beobachtet werden, verglichen mit vehikelbehandelten Kontrolltieren (IL-1-RA: 2645 ± 81 APP⁺ Sphäroide/mm², Kontrollen: 2807 ± 1612 APP⁺ Sphäroide/mm², $p = 0,3605$, Mann-Whitney-U-Test; **Abbildung 8**).

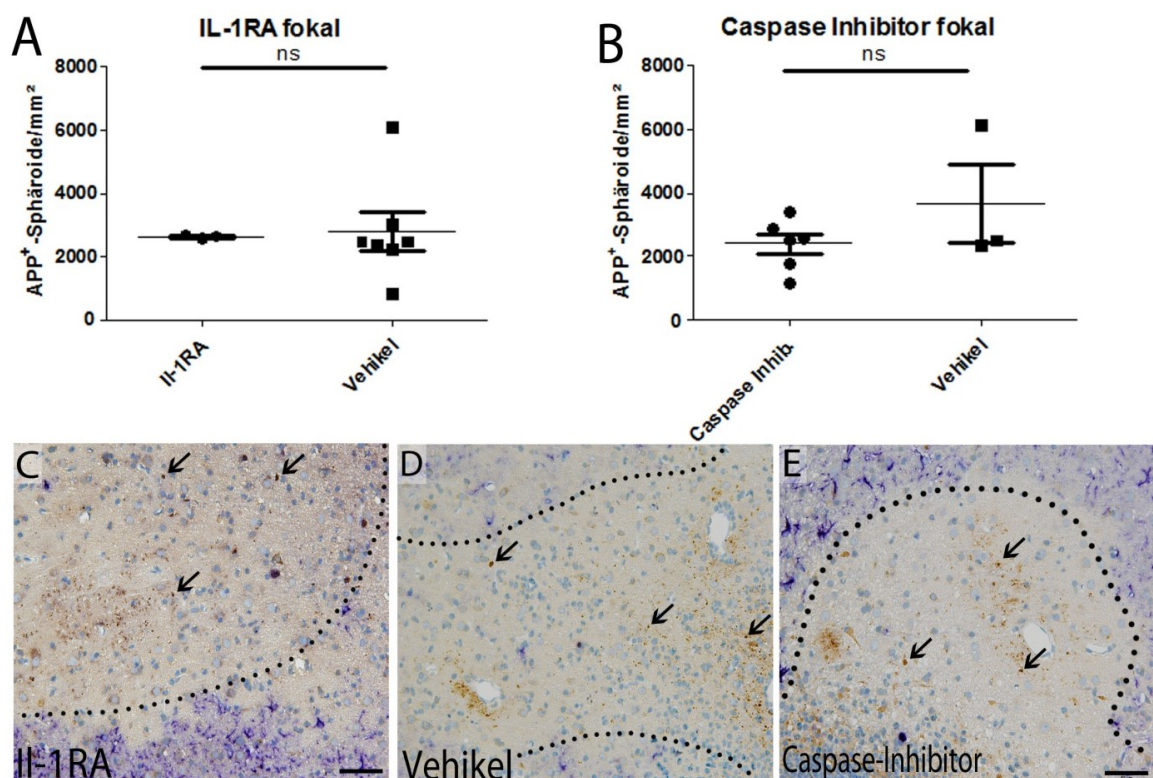


Abbildung 8: IL-1-RA und Caspase-Inhibition reduzieren nicht signifikant die parenchymale axonale Schädigung. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP-GFAP-Doppelmarkierung bei mit

Il-1-RA (C; $p = 0,3605$) und Caspase-Inhibitor (E; $p = 0,9048$) behandelten Tieren nach 24 h keine signifikante Reduktion der parenchymalen APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (D; A; B). Die gepunkteten Linien begrenzen die astrozytendepletierten Läsionsstellen. Die Pfeile zeigen auf APP-positiv Axonsphäroide (braun). Astrozyten: dunkelblau; 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μm .

3.1.3.2 Pharmakologische Behandlung der perivaskulären Axonschädigung

Die in 2.1.1.2, 2.3.1 und 3.1.3.1 beschriebenen Läsionsstellen des fokalen NMO-Modells wurden zudem auf perivaskuläre Axonschädigung in der grauen und weißen Substanz hin untersucht. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte semiquantitativ anhand der GFAP-APP-Doppelmarkierung entsprechend der in Kapitel 2.3 erläuterten Auswertungsskala mit Ziffern von 0 bis 3. Dabei wurde 0 für perivaskulär nicht vorhandene APP⁺ Axonsphäroide und 3 für eine sehr hohe Dichte an perivaskulären APP⁺ Axonsphäroiden vergeben. Die Zuordnung der Werte erfolgte durch wiederholtes visuelles, vergleichendes Abschätzen.

3.1.3.2.1 Perivaskuläre Axonschädigung nach fokaler Applikation von Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten

Um die Hypothese zu testen, ob die perivaskuläre Axonschädigung in der NMO vom Glutamat- und P2X7-Rezeptor abhängig ist, wurde in mehreren unabhängigen Experimenten je ein potenter NMDA-, AMPA/Kainat- und P2X7-Rezeptorantagonist fokal verabreicht: D-AP5 und MK-801 als NMDA-Rezeptorantagonisten, NBQX und CNQX als AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten sowie BBG und oATP als P2X7-Rezeptorantagonisten.

Zuerst wurden als Glutamat-Rezeptorantagonist jeweils D-AP5, MK-801, NBQX oder CNQX zusammen mit Anti-Aquaporin-4-Antikörpern und humanem Komplement in das Rattenhirn injiziert. Die Läsionen wurden nach 24 h ausgewertet. Unsere Experimente zeigten, dass die fokale Injektion von D-AP5, MK-801, NBQX und CNQX die Dichte an perivaskulären APP⁺ Axonsphäroiden in bzw. nahe der Läsionsstelle nicht signifikant reduzierte im Vergleich mit der vehikelbehandelten Kontrollgruppe. Dies traf sowohl für die graue Substanz (**Abbildung 9**) als auch die weiße Substanz (**Abbildung 11**) zu. (Graue Substanz: D-AP5 $0,44 \pm 0,68$, MK-801 $0,37 \pm 0,56$, NBQX $0,33 \pm 0,51$, CNQX $0,78 \pm 1,01$, Kontrollen $0,84 \pm 0,81$, $p = 0,3367$, ANOVA, siehe **Abbildung 9**; weiße Substanz: D-AP5 $0,78 \pm 1,02$, MK-801 $0,8 \pm 0,92$, NBQX $0,75 \pm 0,78$, CNQX $0,9 \pm 1,16$, Kontrollen $1,12 \pm 0,97$, $p = 0,9512$, ANOVA, siehe **Abbildung 11**).

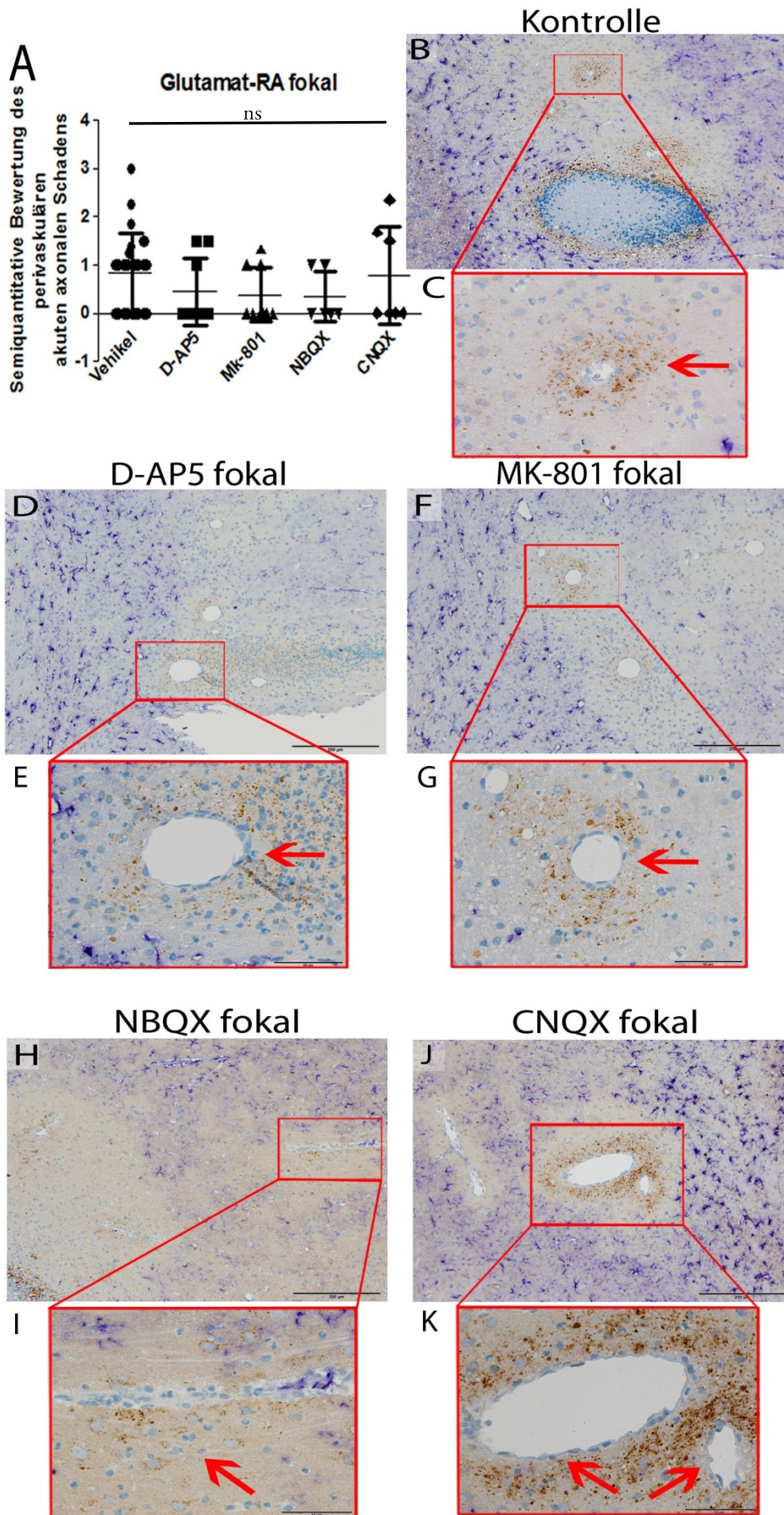


Abbildung 9: Fokal applizierte Glutamat-Rezeptorantagonisten zeigen keine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der grauen Substanz im fokalen NMO-Modell. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP-GFAP-Doppelmarkierung bei mit D-AP5 (D; E), MK-801 (F; G), NBQX (H; I), CNQX (J; K) behandelten Tieren nach 24 h keine signifikante Reduktion der perivaskulären APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (B; C; A) ($p = 0,3367$). Je ein repräsentatives Blutgefäß ist vergrößert dargestellt und mit Pfeil markiert (C; E; G; I; K). B, D, F, H, J: 100-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 μm . C, E, G, I, K: 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μm .

Zur Untersuchung des Einflusses des P2X7-Rezeptorsystems auf axonale Schädigung bei experimenteller NMO wurden den Ratten je BBG oder oATP zusammen mit Anti-AQP4-Antikörpern und humanem Komplement injiziert. Ähnlich den NMDA-Rezeptorantagonisten zeigte sich auch nach fokaler Applikation jeder der beiden P2X7-Rezeptorantagonisten BBG und oATP keine signifikante Reduktion der Dichte an perivaskulären APP⁺ Axonsphäroiden verglichen mit den jeweiligen vehikelbehandelten Kontrollgruppen. Dies traf sowohl für die graue Substanz als auch die weiße Substanz zu. (Graue Substanz: BBG $0,81 \pm 0,92$, oATP $0,93 \pm 0,62$, Kontrollen $1,1 \pm 1,08$, $p = 0,7993$, ANOVA, siehe **Abbildung 10**; weiße Substanz: BBG $0,85 \pm 0,97$, oATP $0,92 \pm 1,25$, Kontrollen $1,12 \pm 0,97$, $p = 0,9512$, ANOVA, siehe **Abbildung 11**).

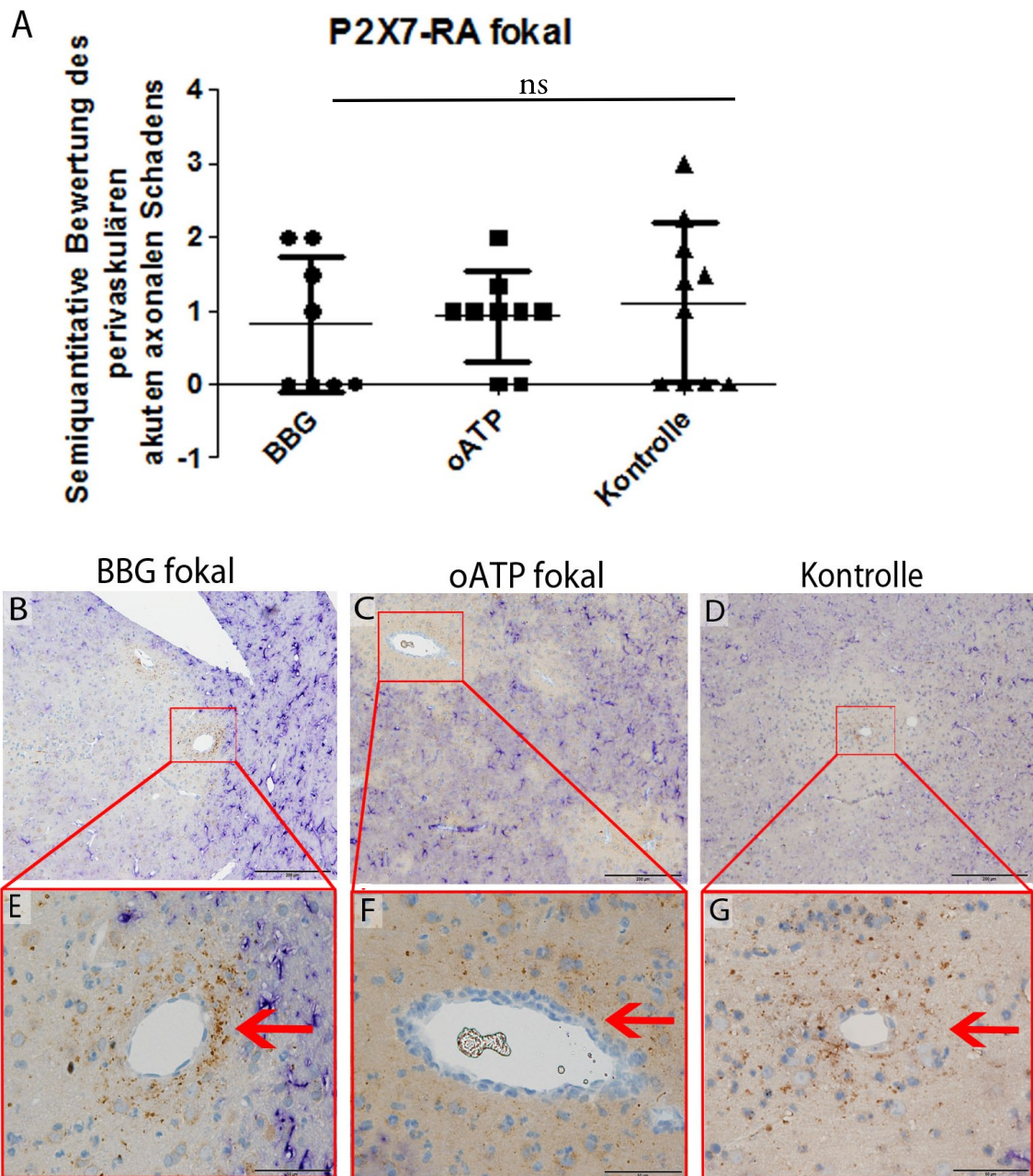


Abbildung 10: Fokal applizierte P2X7-Rezeptorantagonisten zeigen keine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der grauen Substanz. Die Immunhistologie der Axonschädigung zeigt in der APP-GFAP-Doppelmarkierung bei mit BBG (B; E) und oATP (C; F) behandelten Tieren nach 24 h keine signifikante Reduktion der perivaskulären APP-positiven Axonsphäroide (braun) im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (D; G; A) ($p = 0,7993$). Je ein repräsentatives Blutgefäß ist vergrößert dargestellt und mit Pfeil markiert (E; F; G). Astrozyten: dunkelblau; B, C, D: 100-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 μm .

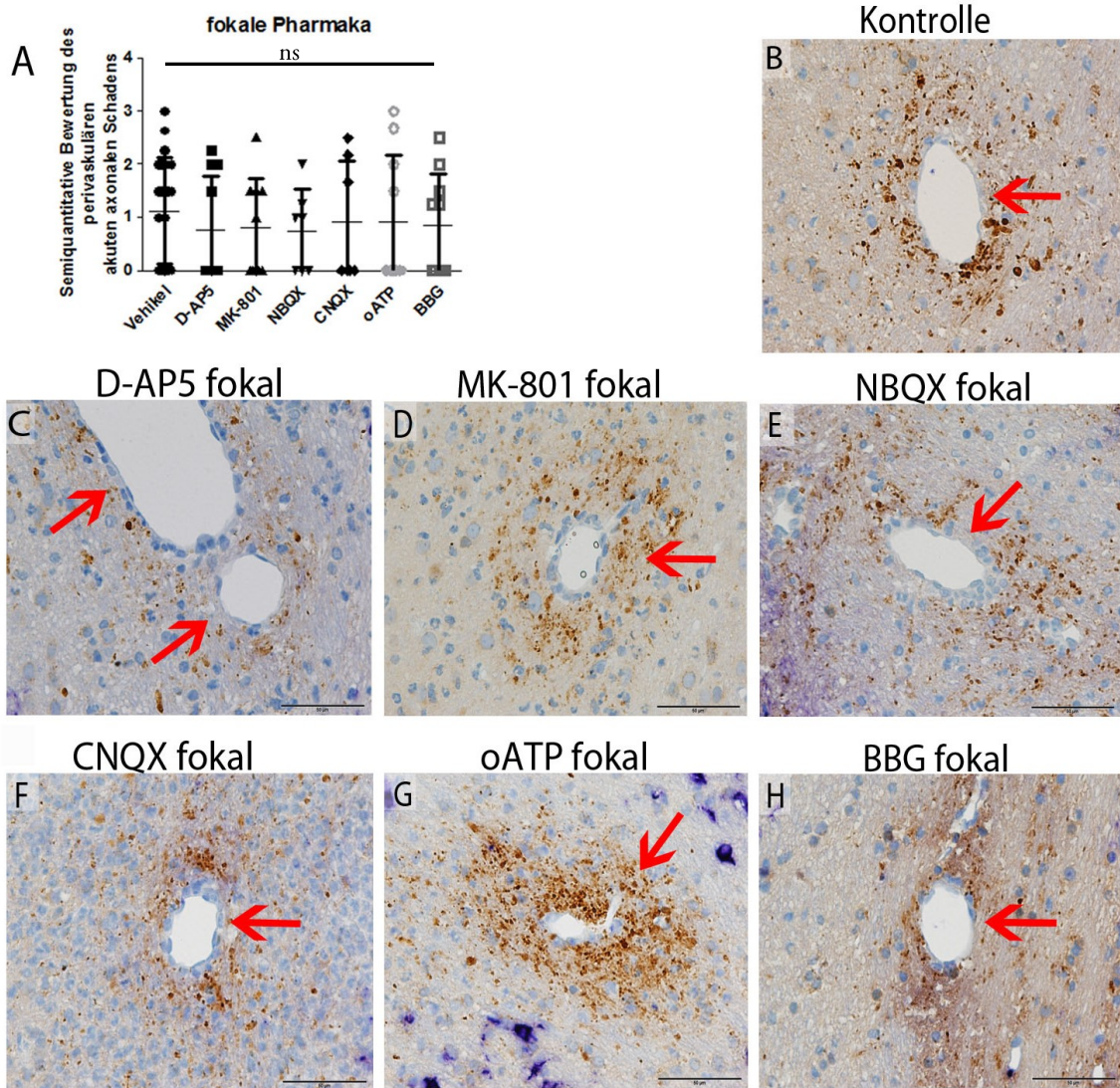


Abbildung 11: Fokal applizierte Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten zeigen keine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der weißen Substanz. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP (braun)-GFAP (dunkelblau)-Doppelmarkierung bei mit D-AP5 (C), MK-801 (D), NBQX (E), CNQX (F), oATP (G) und BBG (H) behandelten Tieren nach 24 h keine signifikante Reduktion der perivaskulären APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (B; A) ($p = 0,9512$). 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μm .

3.1.3.2.2 Perivaskuläre Axonschädigung nach systemischer Applikation von Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten

Wie oben bereits für die parenchymale Axonschädigung beschrieben, wurde im Anschluss an die fokale Applikation der NMDA-Rezeptorantagonisten in einer weiteren Experimentalreihe getestet, ob auch die systemische Applikation von NMDA-Rezeptor- und P2X7-Rezeptorantagonisten, namentlich MK-801, Memantin und BBG, axonale Transportstörungen verhindern kann. Dazu wurden den Ratten 0,5 h vor und 6 h nach der fokalen stereotaktischen Injektion

von Antikörpern und Komplement die NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 bzw. Memantin oder der P2X7-Rezeptorantagonist BBG systemisch appliziert. Wieder wurden die Läsionen 24 h nach Läsionsinduktion ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass MK-801, Memantin und BBG in der systemischen Applikationsform die Ausbildung perivaskulärer axonaler Sphäroide in der grauen Substanz deutlich verminderten, verglichen mit den vehikelbehandelten Kontrolltieren (**Abbildung 12**). In der weißen Substanz konnte in vorläufigen Versuchen bei geringen Tierzahlen ($n = 2$) keine signifikante Verminderung der Axonschädigung im Vergleich mit der vehikelbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden (**Abbildung 13**). (Graue Substanz: MK-801 $0,58 \pm 0,82$, Memantin 0 ± 0 , BBG $0,16 \pm 0,408$, Kontrollen $1,55 \pm 0,82$, $p = 0,0033$, nichtparametrische ANOVA (Kruskal-Wallis-Test), siehe **Abbildung 12**; weiße Substanz: MK-801 $1,31 \pm 1,27$, Memantin $1,16 \pm 1,041$, BBG $0,52 \pm 0,83$, Kontrollen $1,59 \pm 1,14$, $p = 0,2070$, ANOVA, siehe **Abbildung 13**).

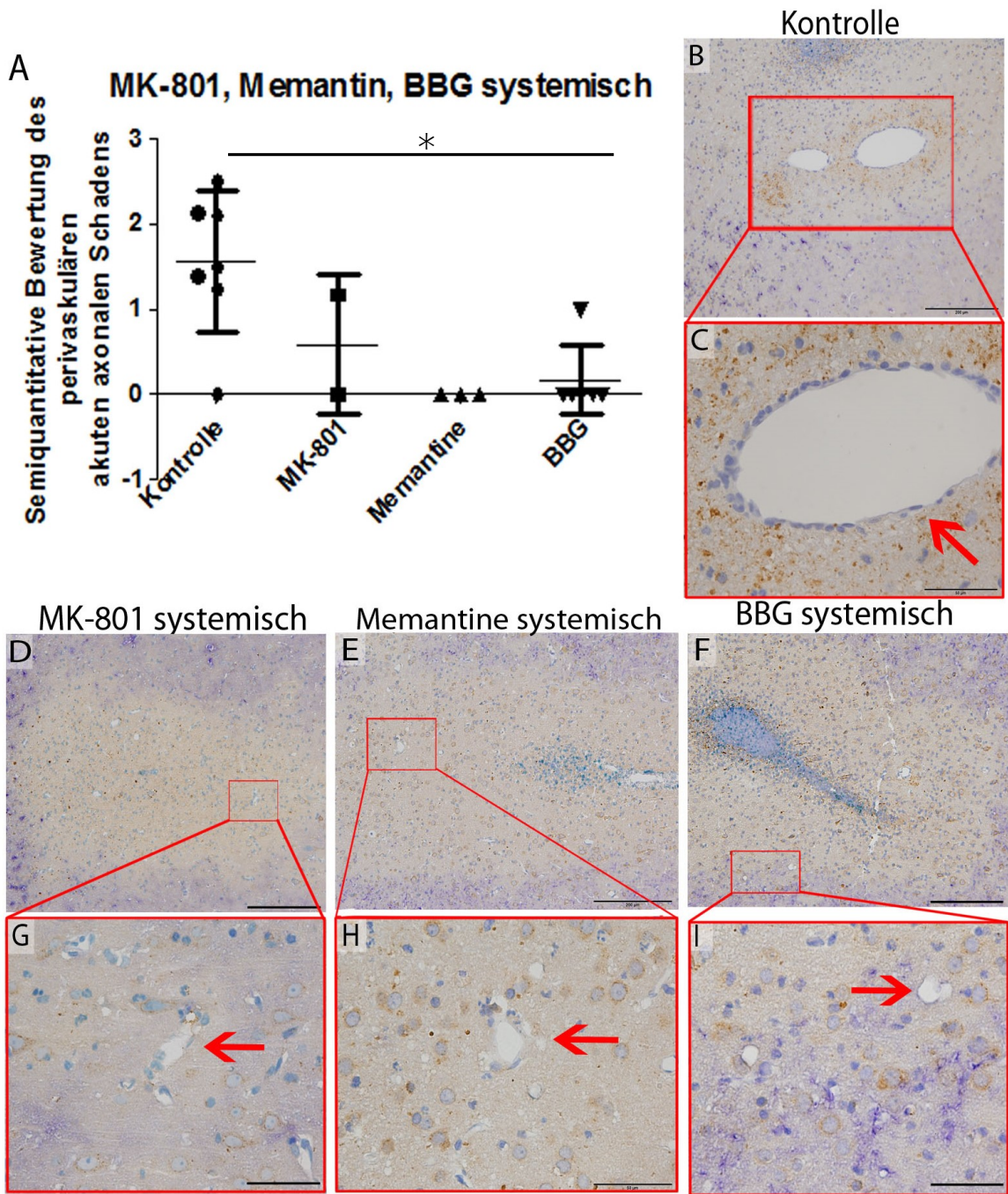


Abbildung 12: Systemisch applizierte Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten zeigen eine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der grauen Substanz. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP (braun)-GFAP (dunkelblau)-Doppelmarkierung bei systemisch mit MK-801 (D; G), Memantine (E; H) und BBG (F; I) behandelten Tieren nach 24 h eine signifikante Reduktion der perivaskulären APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (B; C; A) ($p = 0,0033$). Je ein

repräsentatives Blutgefäß ist vergrößert dargestellt und mit Pfeil markiert (C; G; H; I). B, D, E, F: 100-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 µm. C, G, H, I: 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm.

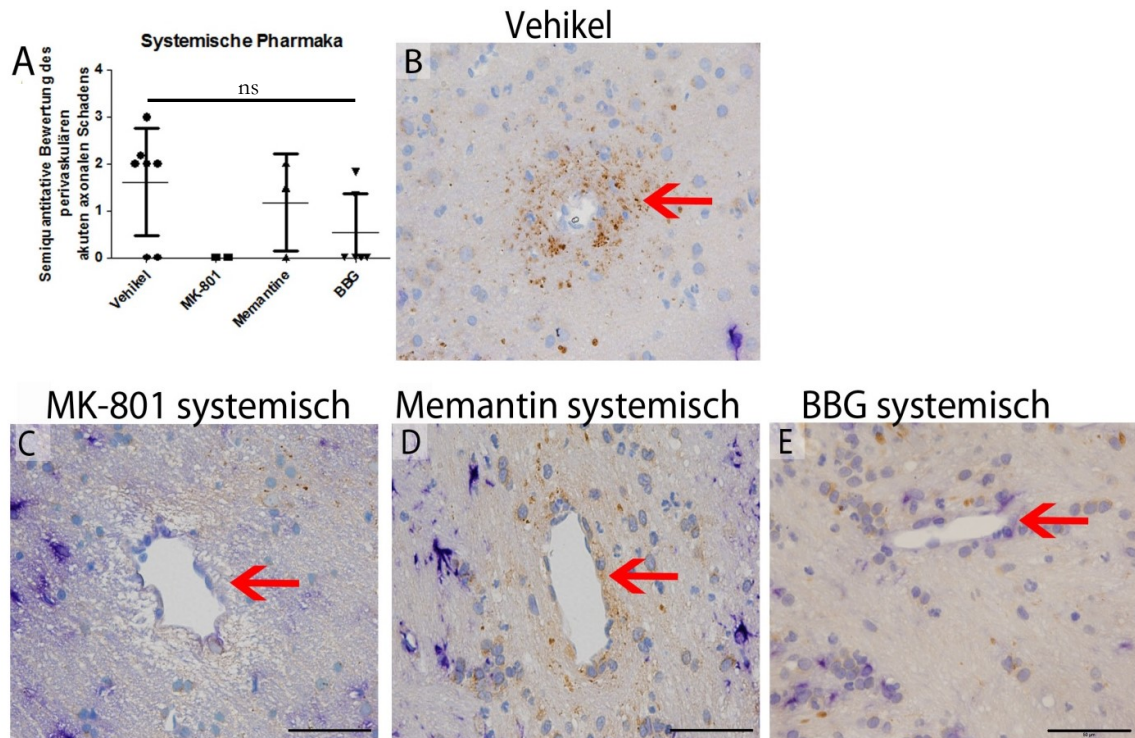


Abbildung 13: Systemisch applizierte Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten zeigen keine signifikante Reduktion des perivaskulären Axonschadens in der weißen Substanz. Die Immunhistologie der axonalen Schädigung zeigt in der APP (braun)-GFAP (dunkelblau)-Doppelmarkierung bei systemisch mit MK-801 (C), Memantin (D) und BBG (E) behandelten Tieren nach 24 h keine signifikante Reduktion der perivaskulären APP-positiven Axonsphäroide im Vergleich mit der vehikelbehandelten Gruppe (B; A) ($p = 0,2070$). 400-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm.

3.2 Axonpathologie in humanen NMO- und MS-Fällen

Die untersuchten Biopsien und Autopsien erfüllen die neuropathologischen Kriterien einer entzündlichen demyelinisierenden Erkrankung des ZNS. Die Einteilung in Stadien unterschiedlicher Demyelinisierungsaktivität erfolgte anhand der in Kapitel 1.2.4 und 2.3.1 genannten Kriterien.

3.2.1 Stadieneinteilung

Zu den einzelnen Demyelinisierungsstadien der NMO- und MS-Fälle wurden unterschiedliche Fallzahlen ausgewertet.

Insgesamt wurden neun Biopsien und 17 Autopsien beurteilt. Sechs der Biopsien stellten sich als NMO-Fälle heraus, drei als MS-Fälle. Von den Autopsien waren sechs Fälle der NMO zuzuordnen und elf der MS.

Die eine Hälfte der NMO-Biopsien war seropositiv, die andere Hälfte seronegativ für Anti-AQP4-Antikörper. Der Serostatus der NMO-Autopsien war größtenteils nicht untersucht worden. Seronegative oder hinsichtlich ihres Anti-AQP4-Antikörper-Serostatus nicht untersuchte Patienten zeigten den seropositiven Patienten vergleichbare Läsionen hinsichtlich des Verlusts GFAP- und AQP4-positiver Astrozyten.

Die NMO- und MS-Biopsien zeigten allesamt aktive Läsionsstadien.

Bei den sechs NMO-Autopsien fanden sich insgesamt drei aktive Läsionsareale, sechs inaktive schaumzellige und zwei inaktive mikrogliale.

Unter den elf MS-Autopsien waren fünf aktive Läsionen, zwei chronisch-aktive und vier inaktive.

3.2.2 Histopathologie der Demyelinisierungsstadien

3.2.2.1 Histopathologie der NMO-Läsionen

In der LFB-PAS-Färbung zeigten Myelinscheiden eine blaue Anfärbarkeit. In allen Läsionsstadien war ein ausgeprägter Myelinverlust in der grauen und weißen Substanz zu finden, welcher in der LFB-PAS-Färbung sichtbar war (**Abbildung 14A, Abbildung 15A, Abbildung 16A, Abbildung 17A**). Alle Läsionen waren zudem durch eine starke, für die NMO charakteristische Astrozytendepletion gekennzeichnet. Diese zeigte sich besonders in der GFAP- und AQP4-Färbung, welche in den Läsionen einen Verlust der Immunoreaktivität für diese Astrozytenmarker aufwies (**Abbildung 14B+C, Abbildung 15B+C, Abbildung 16B+C, Abbildung 17B+C**). Ein weiteres Kennzeichen der Läsionen war die Deposition von Immunglobulin G (**Abbildung 14D**).

3.2.2.1.1 Aktive Läsionen von NMO-Biopsien

Die Läsionen der NMO-Biopsien wiesen zudem zahlreiche infiltrierte Makrophagen auf, wie die positive Immunoreaktivität des Panmakrophagenmarkers KiM1P zeigt (**Abbildung 14E**).

Die Versilberung nach Bielschowsky zeigte eine variabel ausgeprägte verminderte axonale Dichte innerhalb der Läsion bei gleichzeitigem relativem axonalem Erhalt (**Abbildung 14F**). Die immunhistochemische Färbung des APP stellt akut geschädigte Axone dar, in denen das APP durch Transportstörungen akkumuliert. In den Läsionen wurde eine sehr hohe Dichte an APP-positiven Sphäroiden als Korrelat ausgeprägter akuter axonaler Schädigung beobachtet (**Abbildung 14G**).

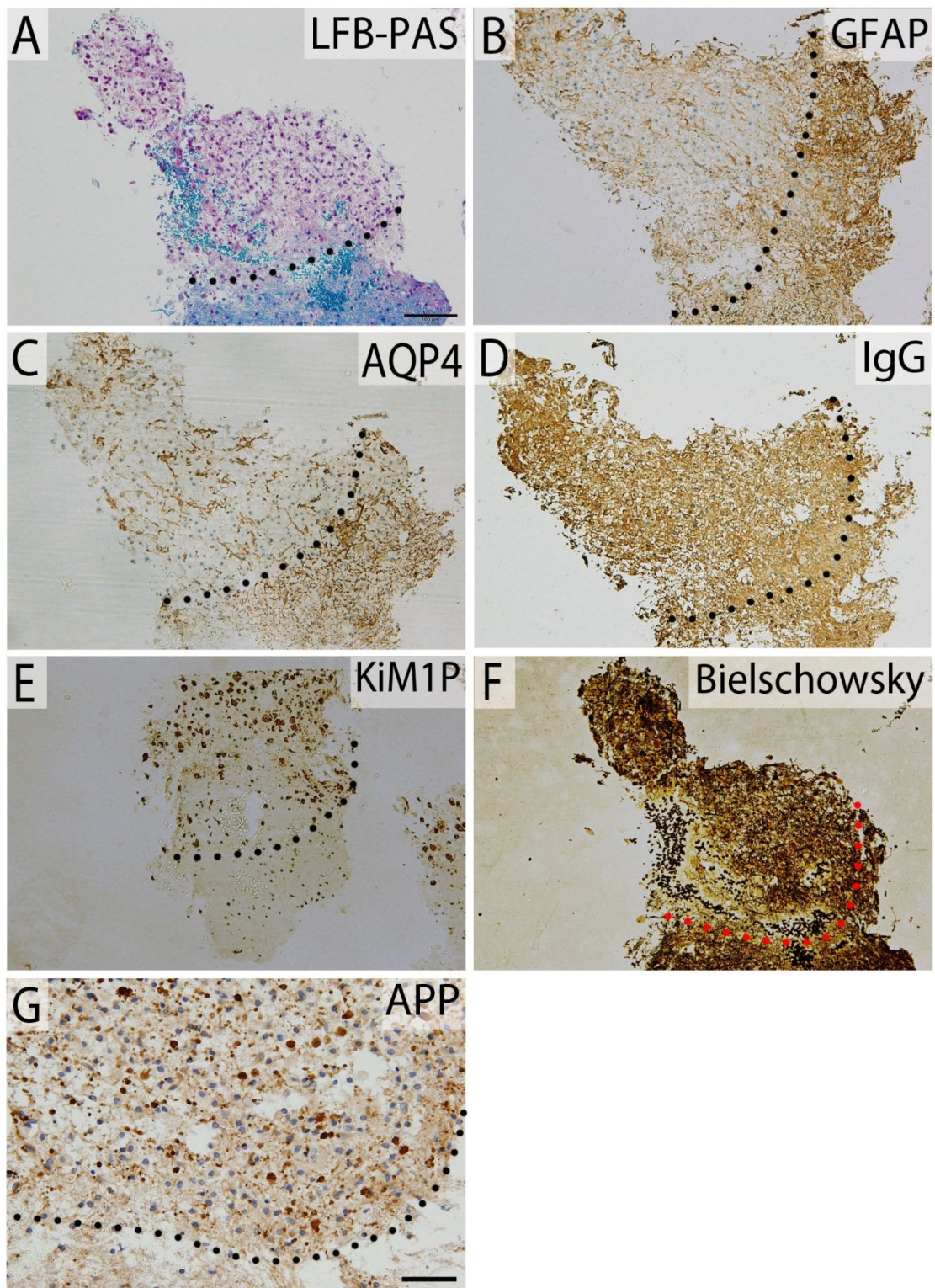


Abbildung 14: Histopathologie aktiver Läsionen von NMO-Biopsien. Die Läsion zeigt eine ausgeprägte Demyelinisierung in der grauen und weißen Substanz (A; LFB-PAS) und eine starke Astrozytendepletion, welche durch den Verlust der AQP4- und GFAP-Immunreaktivität sichtbar ist (B; AQP4 und C; GFAP). Es liegen eine beträchtliche Immunglobulindeposition (D; IgG) sowie zahlreiche Makrophagen in der Läsion vor (E; KiM1P Panmakrophagenmarker). Zudem weist sie eine Reduktion der Axondichte bei relativem axonalem Erhalt und eine

sehr ausgeprägte akute Axonpathologie in Form von Axonschwellungen und -sphäroiden auf (F; Bielschowsky Silber-Imprägnation und G; APP). Die gepunkteten Linien begrenzen die astrozytendepletierten Läsionsareale. A-F: 100-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 100 µm. G: 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm.

3.2.2.1.2 Aktive Läsionen von NMO-Autopsien

Wie in den aktiven Läsionen der Biopsien zeigte sich auch hier eine große Anzahl an KiM1P-positiven Makrophagen (**Abbildung 15E**), welche z. T. MBP-positive Myelinabbauprodukte enthielten. Daher liegt auch hier ein aktives Demyelinisierungsstadium vor.

Zudem wiesen die Läsionen in der Bielschowsky-Silber-Imprägnation eine reduzierte Axondichte bei relativem Axonerhalt und in der immunhistochemischen Färbung für APP eine ausgeprägte akute Axonpathologie in Form von Axonschwellungen und -sphäroiden auf (**Abbildung 15F+G**).

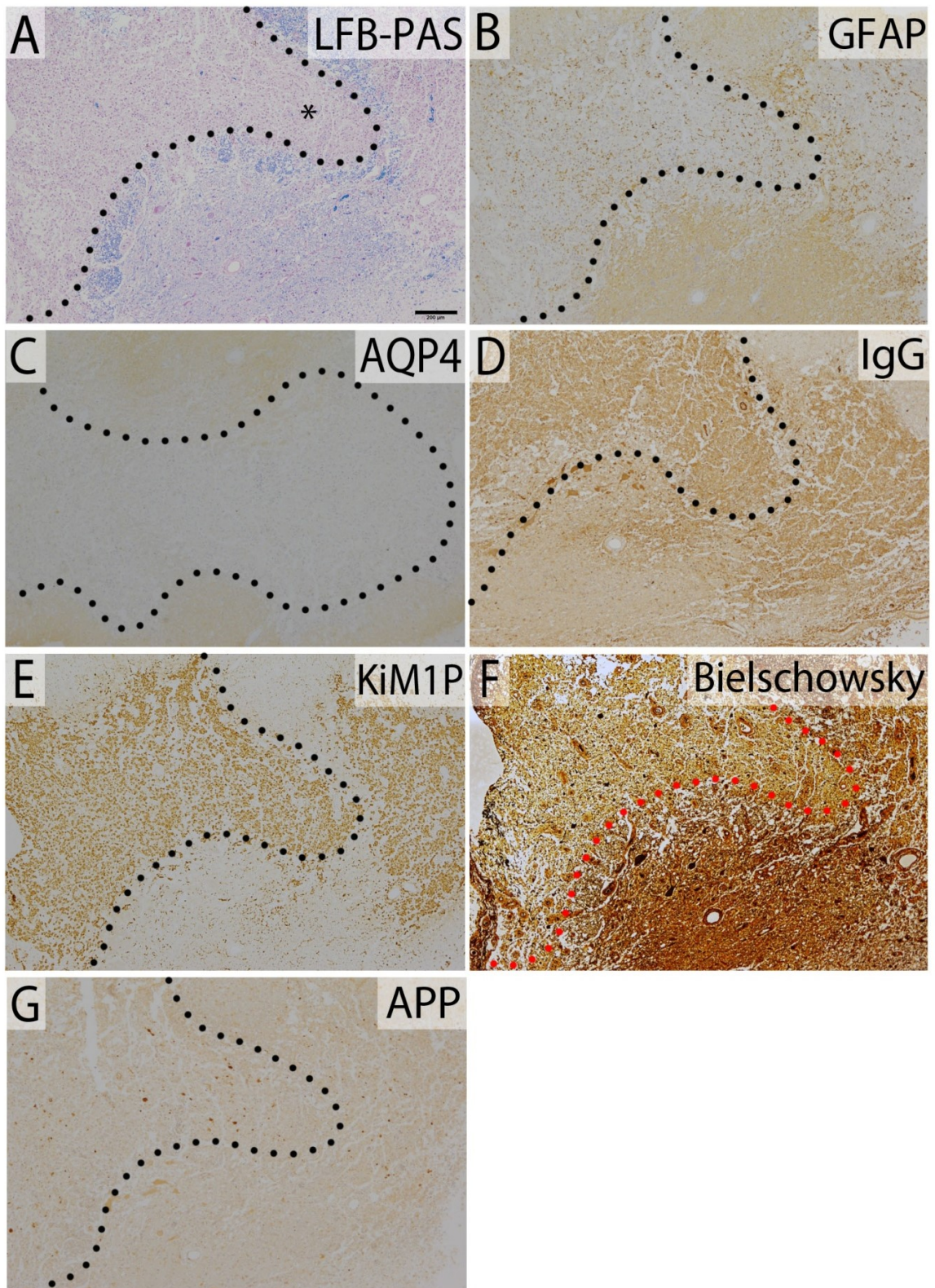


Abbildung 15: Histopathologie aktiver Läsionen von NMO-Autopsien. Die Läsion zeigt einen ausgeprägten Myelinverlust (A; LFB-PAS) und eine starke Astrozytendepletion, welche durch den Verlust der AQP4- und GFAP-Immunoreaktivität sichtbar ist (B; GFAP und C; AQP4). Es liegen eine beträchtliche

Immunglobulindeposition (D; IgG), auch infolge der Blut-Hirn-Schranken-Schädigung, sowie zahlreiche Makrophagen in der Läsion vor (E; KiM1P Panmakrophagenmarker). Zudem weist sie eine stark reduzierte Axondichte bei relativem Axonerhalt und eine ausgeprägte akute Axonpathologie in Form von Axonschwellungen und Axonsphäroiden auf (F; Bielschowsky-Silber-Imprägnation und G; APP). Die gepunkteten Linien begrenzen und das Sternchen markiert die astrozytendepletierten Läsionsareale. 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 µm.

3.2.2.1.3 Inaktive schaumzellige Läsionen von NMO-Autopsien

In diesem Läsionsstadium zeigten sich viele schaumzellige, myelinbeladene Makrophagen (**Abbildung 16D**). Auch hier wies die Versilberung nach Bielschowsky eine verminderte axonale Dichte innerhalb der Läsion bei relativem Axonerhalt nach (**Abbildung 16E**). Die Anzahl an APP⁺ Axonsphäroiden als Nachweis akuter Axonschädigung war im Vergleich mit dem aktiven Demyelinisierungsstadium reduziert (**Abbildung 16F**).

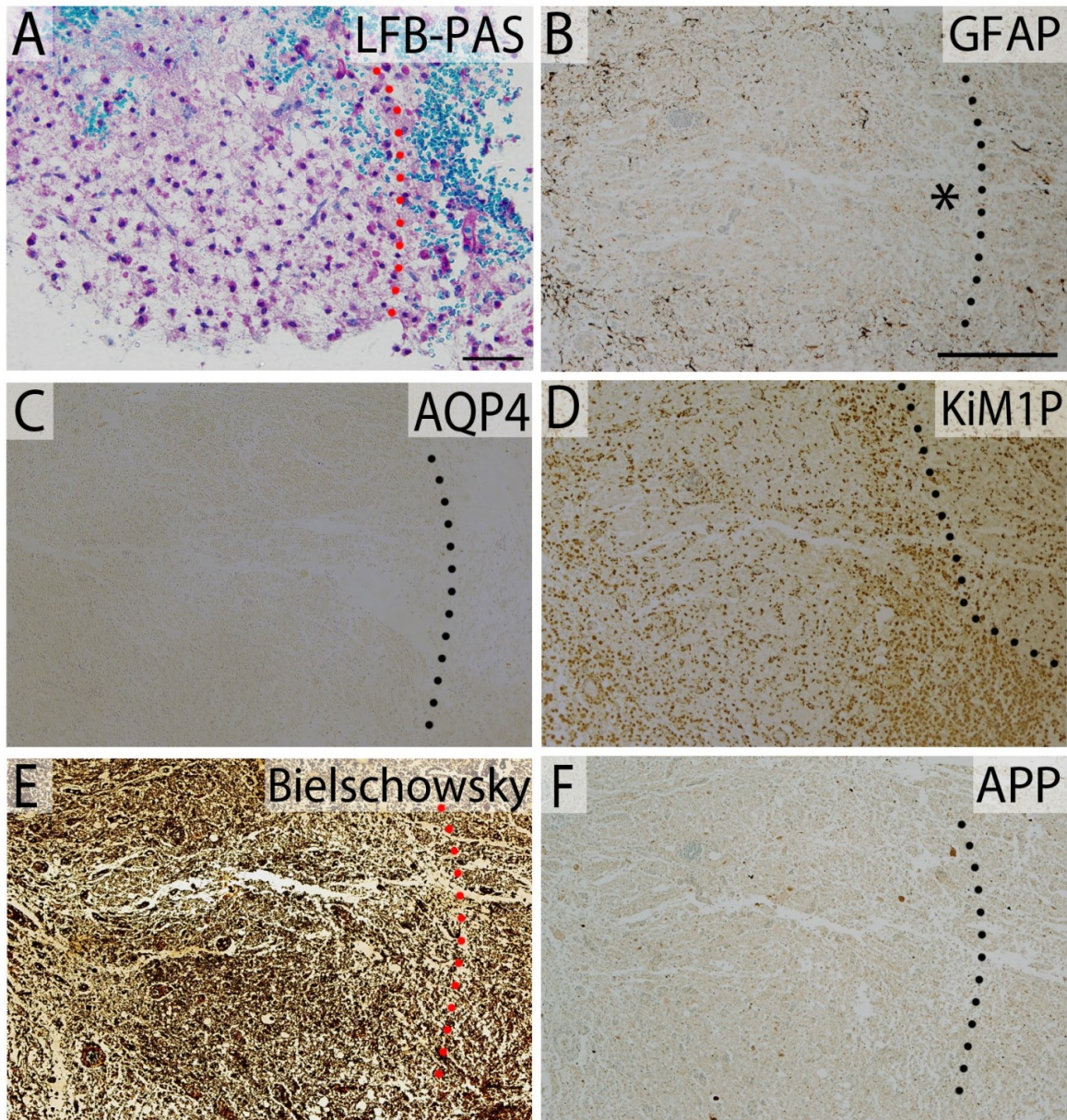


Abbildung 16: Histopathologie inaktiver schaumzelliger Läsionen von NMO-Autopsien. Die Läsion zeigt eine ausgeprägte Demyelinisierung (A; LFB-PAS) und eine starke Astrozytendepletion, welche durch den Verlust der GFAP- und AQP4-Immunoreaktivität sichtbar ist (B; GFAP und C; AQP4). Es liegen zahlreiche schaumzellige, myelinbeladene Makrophagen in der Läsion vor (D; KiM1P Panmakrophagenmarker). Zudem weist sie eine starke Reduktion der Axondichte bei relativem axonalem Erhalt und auch in diesem Stadium noch eine akute Axonpathologie in Form von Axonschwümmen und -sphäroiden auf (E; Bielschowsky Silber-Imprägnation und F; APP). Die gepunkteten Linien begrenzen und das Sternchen * markiert die astrozytendepletierten Läsionsareale. A: 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm. B-F: 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 µm.

3.2.2.1.4 Inaktive mikrogliale Läsionen von NMO-Autopsien

Diese Läsionen waren nur von einigen wenigen KiM1P-positiven Zellen, nämlich Makrophagen und Mikrogliazellen, infiltriert (**Abbildung 17D**). Sie wiesen in der Bielschowsky-Silber-Imprägnation eine stark reduzierte Axondichte bei relativem Axonerhalt auf (**Abbildung 17E**). APP⁺ Axonsphäroide waren lediglich vereinzelt zu beobachten (**Abbildung 17F**).

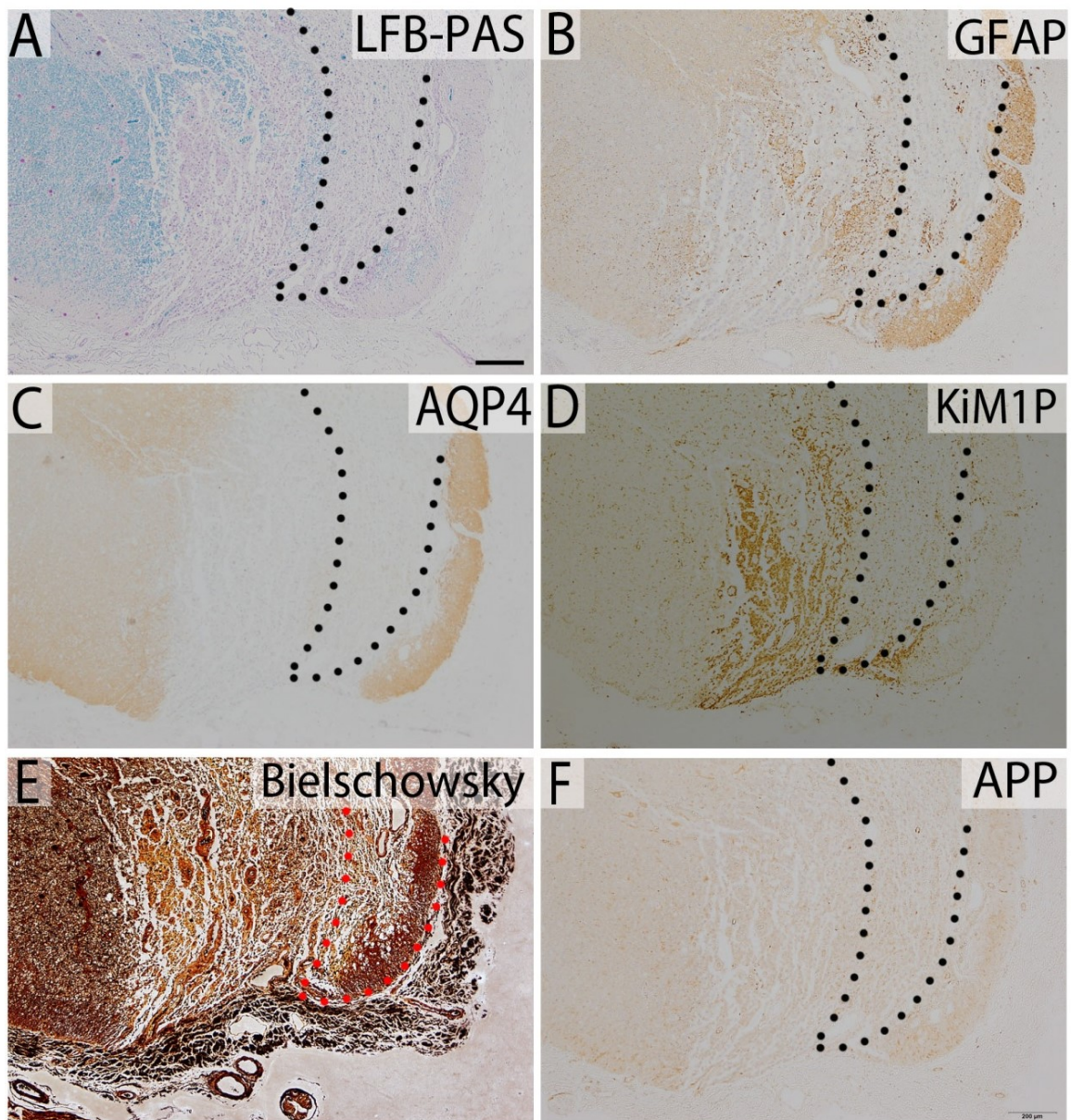


Abbildung 17: Histopathologie inaktiver nicht schaumzelliger Läsionen von NMO-Autopsien. Die Läsion zeigt einen ausgeprägten Myelinverlust in der grauen und weißen Substanz (A; LFB-PAS) und eine starke Astrozytendepletion, welche durch den Verlust der AQP4- und GFAP-Immunoreaktivität sichtbar ist (B; GFAP und C; AQP4). Vereinzelt Makrophagen/Mikrogliazellen liegen in der Läsion vor (D; KiM1P Panmakrophagenmarker). Zudem weist sie eine stark reduzierte Axondichte bei relativem Axonerhalt und eine geringgradig ausgeprägte akute

Axonpathologie in Form von einzelnen Axonschwellungen und -sphäroiden auf (E; Bielschowsky-Silber-Imprägnation und F; APP). Die gepunkteten Linien begrenzen die astrozytendepletierten Läsionsareale. 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 µm.

3.2.2.2 Histopathologie der MS-Läsionen

Alle Läsionen wiesen, unabhängig vom jeweiligen Stadium der Demyelinisierungsaktivität, eine ausgeprägte Demyelinisierung in der LFB-PAS-Färbung auf (**Abbildung 18A**, **Abbildung 19A**, **Abbildung 20A**, **Abbildung 21A**).

3.2.2.2.1 Aktive Läsionen von MS-Biopsien

Die aktiven Läsionen des bioptisch gewonnenen MS-Gewebes waren von zahlreichen akut entzündlich aktivierten Makrophagen infiltriert. Dies wurde durch die Immunoreaktivität für die Makrophagenmarker KiM1P und MRP14 deutlich (**Abbildung 18B+C**). Die Makrophagen enthielten MBP-positive Myelinabbauprodukte (**Abbildung 18D**) und zeigten damit ein akutes Demyelinisierungsstadium an.

Zudem wiesen die Läsionen in der Bielschowsky-Versilberung eine Reduktion der Axondichte bei relativem axonalem Erhalt und in der Immunhistochemie für APP eine sehr ausgeprägte akute Axonpathologie in Form von zahlreichen Axonschwellungen und -sphäroiden auf (**Abbildung 18E+F**).

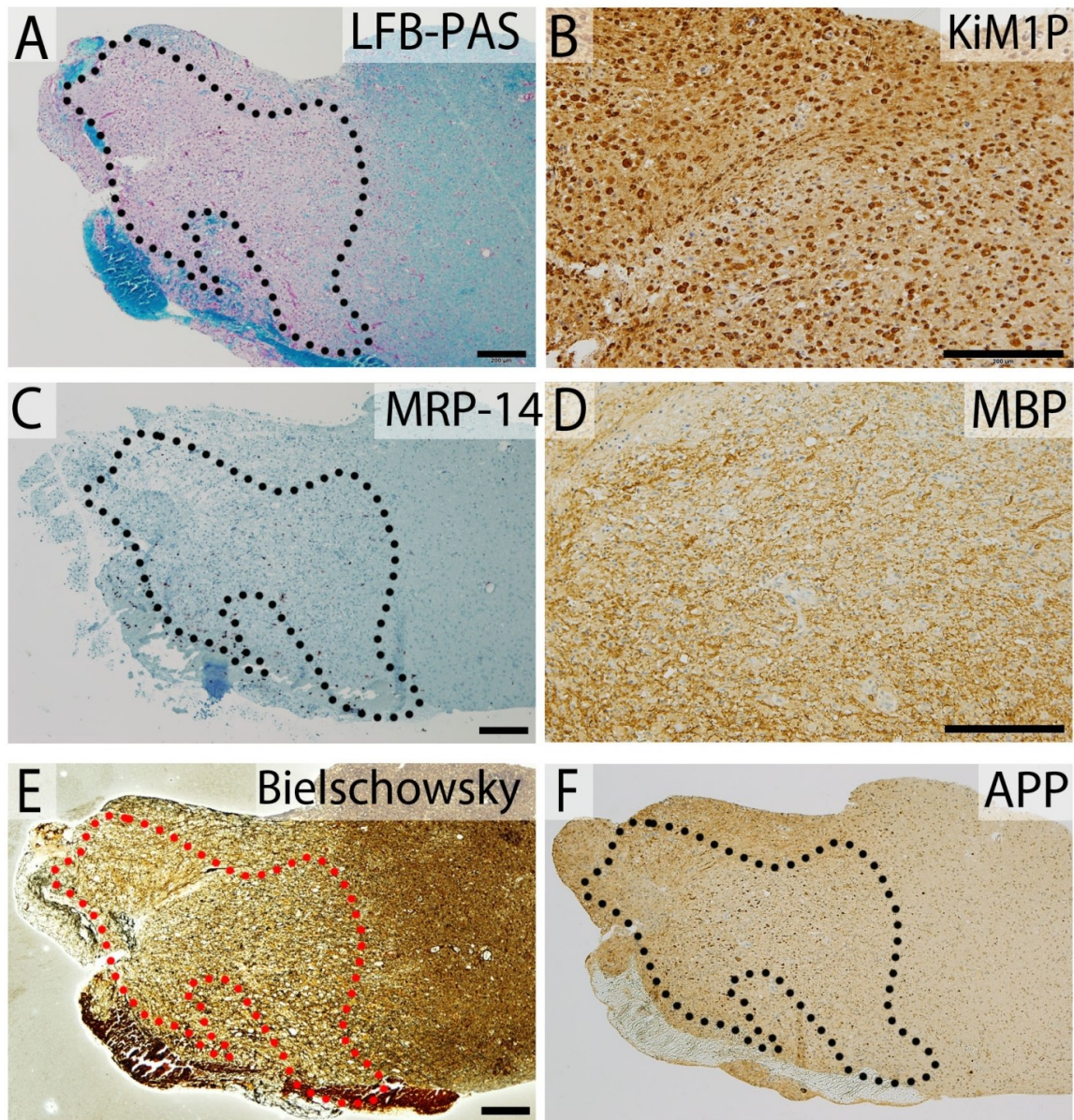


Abbildung 18: Histopathologie aktiver MS-Läsionen (Biopsie). Die Läsion zeigt eine ausgeprägte Demyelinisierung in der weißen Substanz (A; LFB-PAS) sowie zahlreiche akut entzündlich aktivierte Makrophagen (B; KiM1P Panmakrophagenmarker und C; MRP14). Diese enthalten Myelinabbauprodukte (D; MBP). Zudem weist die Läsion eine Reduktion der Axondichte bei relativem axonalem Erhalt und eine sehr ausgeprägte akute Axonpathologie in Form von Axonschwümmungen und -sphäroiden auf (E; Bielschowsky-Silber-Imprägnation und F; APP). Die gepunkteten Linien begrenzen die demyelinisierten Läsionsareale. A, C, E, F: 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 μm . B, D: 100-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 μm .

3.2.2.2.2 Aktive Läsionen von MS-Autopsien

Auch hier fanden sich wie bei den Biopsien neben dem ausgeprägten Myelinverlust zahlreiche KiM1P-positive Makrophagen, welche MBP-positive Myelinabbauprodukte enthielten (**Abbildung 19B+C**). Zudem wiesen die Läsionen eine stark reduzierte Axondichte bei relativem

Axonerhalt auf (Bielschowsky-Silber-Imprägnation, **Abbildung 19D**). Die akute Axonschädigung in der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen APP war auch hier auffallend stark ausgeprägt (**Abbildung 19E**).

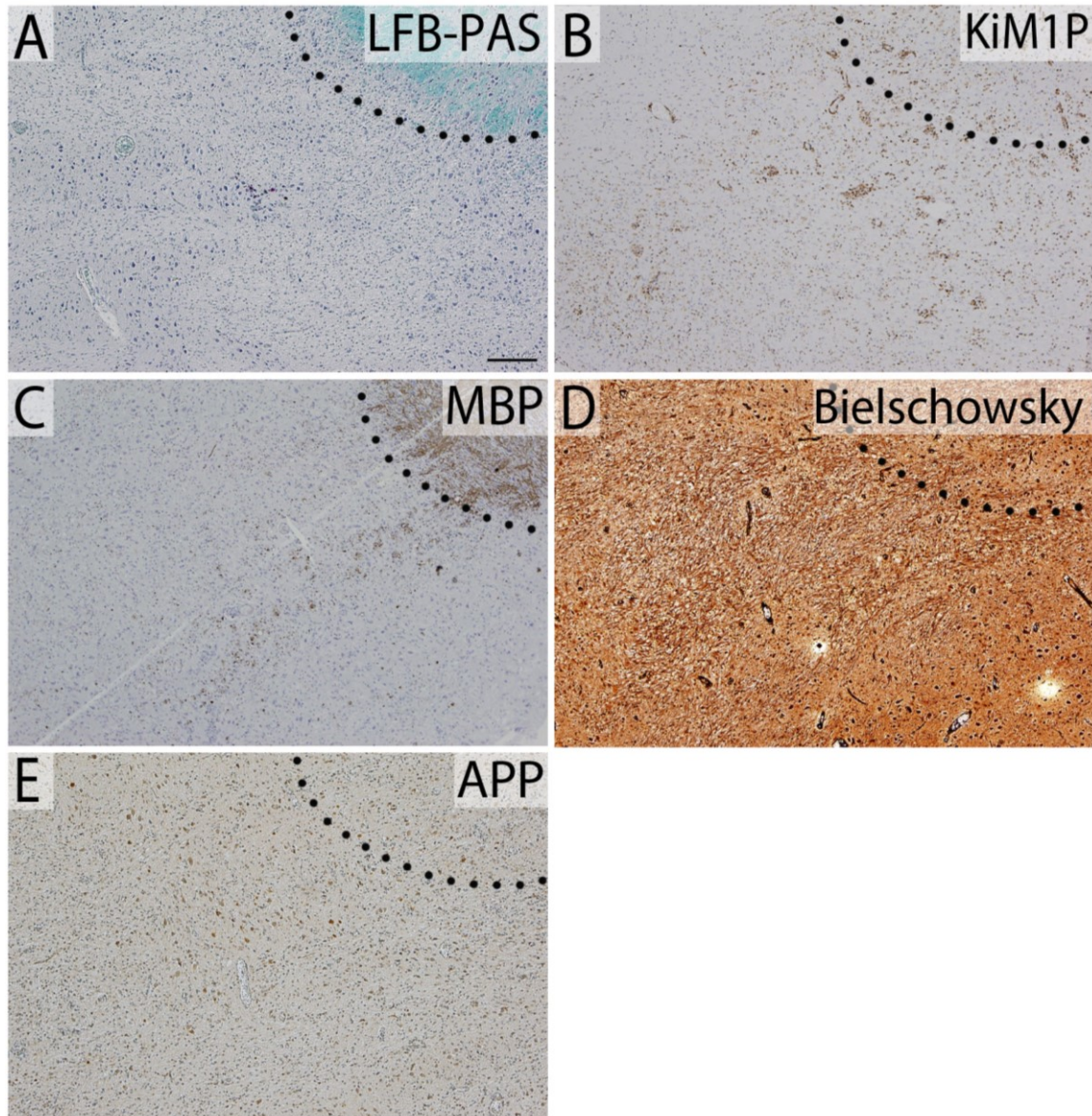


Abbildung 19: Histopathologie aktiver Läsionen von MS-Autopsien. Die Läsion zeigt einen ausgeprägten Myelinverlust (A; LFB-PAS) sowie zahlreiche Makrophagen (B; KiM1P Panmakrophagenmarker). Diese enthalten MBP+ Myelinabbauprodukte (C; MBP). Zudem weist sie eine stark reduzierte Axondichte bei relativem Axonerhalt und eine ausgeprägte akute Axonpathologie in Form von Axonschwellungen und -sphäroiden auf (D; Bielschowsky-Silber-Imprägnation und E; APP). Die gepunkteten Linien begrenzen die demyelinisierten Läsionsareale. 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 μm .

3.2.2.2.3 Chronisch-aktive Läsionen von MS-Autopsien

Läsionen dieses Stadiums waren demyelinisiert und scharf begrenzt. Sie wiesen einen hyperzellulären Randsaum mit einzelnen myelinbeladenen Makrophagen auf, welche immunoreaktiv für KiM1P und MBP waren (**Abbildung 20B+C**). Das Läsionszentrum dagegen stellte sich hypozellulär und inaktiv dar.

Ein weiteres Merkmal war der relative axonale Erhalt trotz stark verringerter Axondichte (Bielschowsky-Versilberung, **Abbildung 20D**). Die akute Axonpathologie war hier mäßig stark ausgeprägt (**Abbildung 20C**).

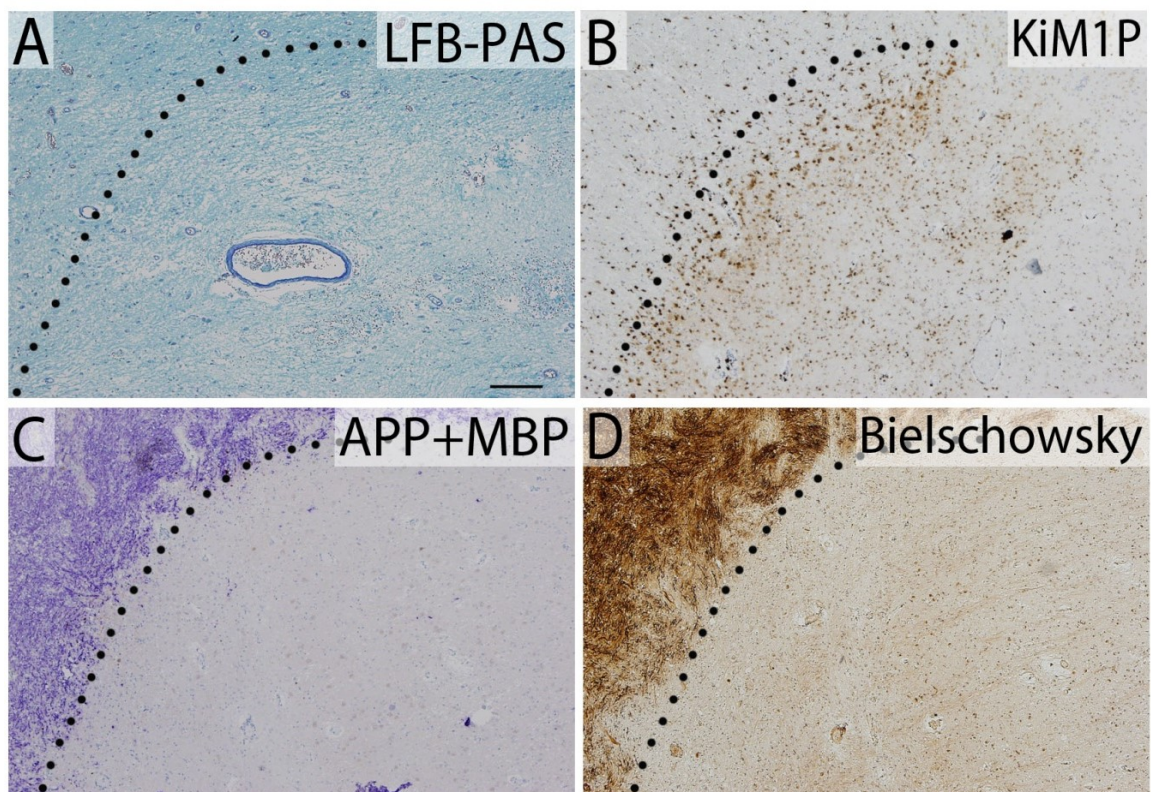


Abbildung 20: Histopathologie chronisch-aktiver Läsionen von MS-Autopsien. Die Läsion zeigt eine leichte Demyelinisierung (A; LFB-PAS) sowie einige Makrophagen am Läsionsrand (B; KiM1P Panmakrophagenmarker). Diese enthalten MBP+ Myelinabbauprodukte (C; MBP) als Korrelat der akuten Demyelinisierungsaktivität. Zudem ist eine starke Reduktion der Axondichte bei relativem axonalem Erhalt und eine mäßig ausgeprägte akute Axonpathologie in Form von Axonschwellungen und -sphäroiden zu finden (D; Bielschowsky-Silber-Imprägnation und C; APP). Die gepunkteten Linien begrenzen die Läsionsareale. 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 μm .

3.2.2.2.4 Inaktive Läsionen von MS-Autopsien

Diese Läsionen zeigten deutlich weniger oder keine Infiltration mit Schaumzellen (**Abbildung 21A+B**). Myelinabbauprodukte in Makrophagen waren nicht nachweisbar (**Abbildung 21C**). Des Weiteren war die Axondichte hier stark verringert, obwohl ein Teil der Axone erhalten war (**Abbildung 21D**). Lediglich vereinzelte APP-positive Axonsphäroide prägten das histologische Bild der Läsion (**Abbildung 21C**).

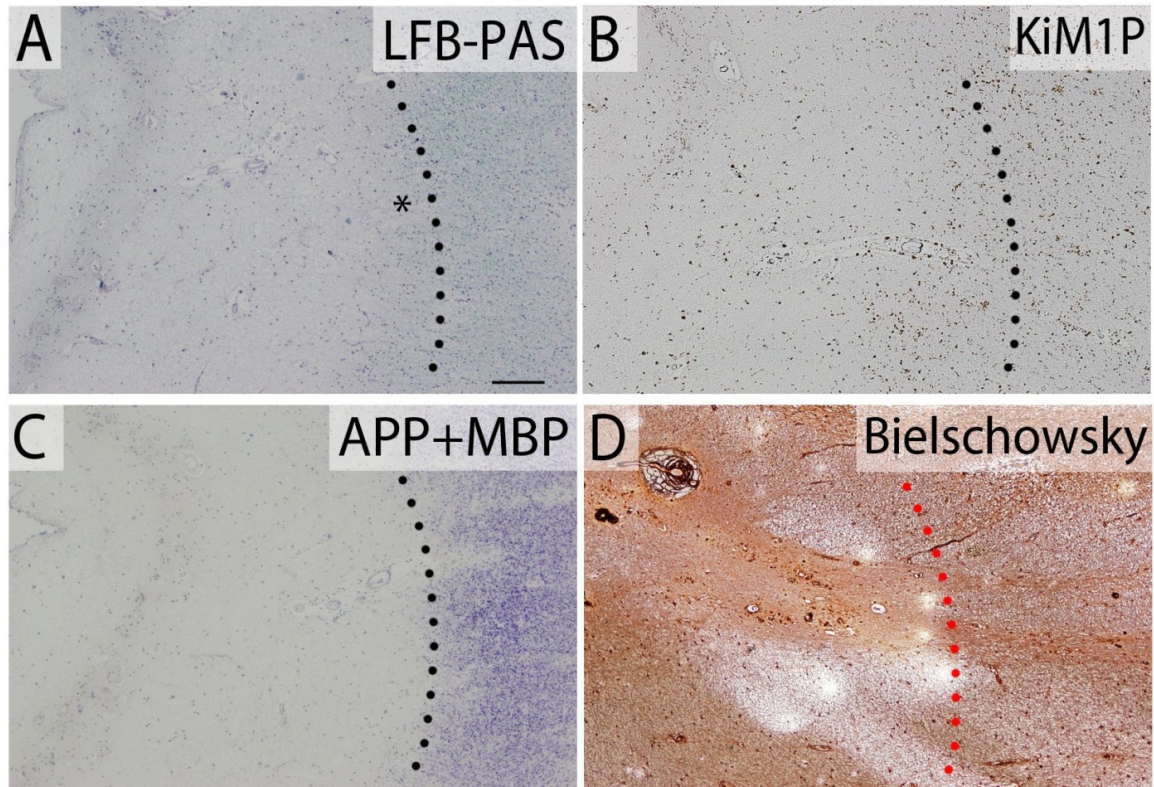


Abbildung 21: Histopathologie inaktiver Läsionen von MS-Autopsien. Die Läsion zeigt einen ausgeprägten Myelinverlust (A; LFB-PAS) sowie einige Makrophagen (B; KiM1P), wenn auch in geringerer Dichte als bei den aktiven Stadien. Diese enthalten keine MBP+ Myelinabbauprodukte (C; MBP). Zudem ist eine stark reduzierte Axondichte bei relativem Axonerhalt und eine sehr gering ausgeprägte akute Axonpathologie in Form von Axonschwellungen und -sphäroiden zu finden (D; Bielschowsky-Silber-Imprägnation und C; APP). Die gepunkteten Linien begrenzen die demyelinisierten Läsionsareale. 40-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 200 μm .

3.2.3 Die akute Axonpathologie bei NMO und MS

Zur Untersuchung der Axonpathologie wurden die mit Antikörpern gegen das APP gefärbten humanen Gewebeschnitte ausgewertet. Die Dichte an APP-positiven Axonsphäroiden spiegelt gut das Ausmaß akuter Axonschädigung in den verschiedenen Stadien der NMO und MS wider.

3.2.3.1 Akute Axonpathologie bei NMO

Aufgrund der geringen Anzahl an ausgewerteten Läsionen pro Demyelinisierungsstadium wurde kein statistischer Test angewandt, sondern die gewonnenen Daten wurden rein deskriptiv analysiert.

In den NMO-Läsionen zeigte sich im akuten Demyelinisierungsstadium ($n = 6$ für NMO-Biopsien und $n = 3$ für NMO-Autopsien) eine sehr hohe Dichte an akuter Axonschädigung, welche im Biopsie-Gewebe bei 5139 ± 2641 Axonsphäroiden/ mm^2 und im Autopsie-Gewebe bei 1643 ± 454 Axonsphäroiden/ mm^2 lag (**Abbildung 22B+C**). Dies weist auf eine bereits früh einsetzende akute axonale Schädigung bei der NMO hin.

In den inaktiven Stadien war die Axonschädigung weniger stark ausgeprägt. Sie lag bei den Läsionen des schaumzellig-inaktiven Stadiums im Mittel bei 680 ± 156 Axonsphäroiden/ mm^2 (**Abbildung 22D**). Inaktive mikrogliale Läsionen zeigten mit nur 112 ± 136 Axonsphäroiden/ mm^2 eine sehr geringe akute axonale Transportstörung (**Abbildung 22E**).

Bei den NMO-Patienten zeigte sich also eine sehr frühe Axonschädigung, welche im Zeitverlauf der Läsionsentwicklung abnahm und zwischen den verschiedenen Stadien einen deutlichen Unterschied aufwies.

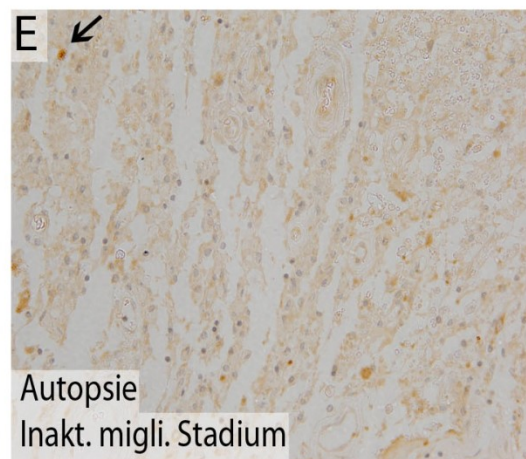
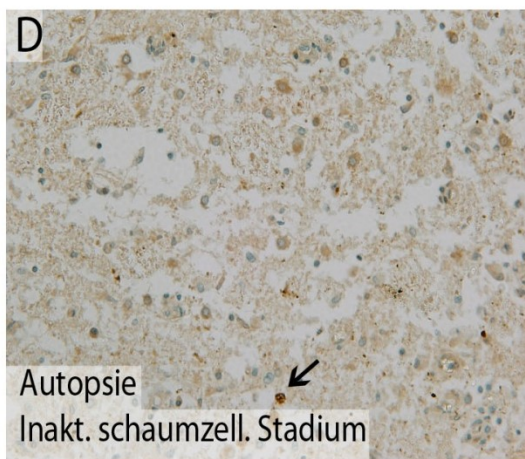
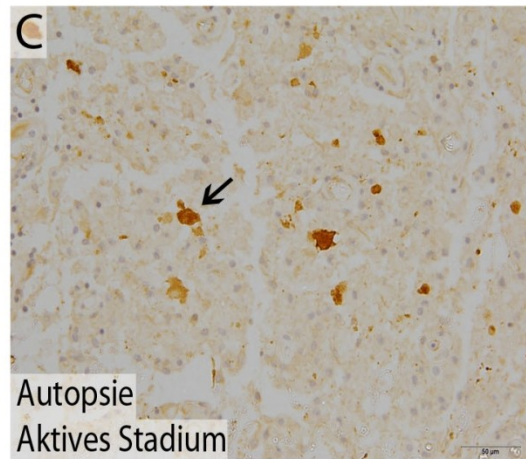
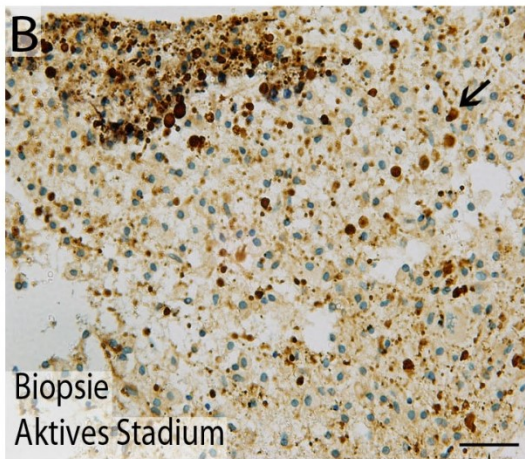
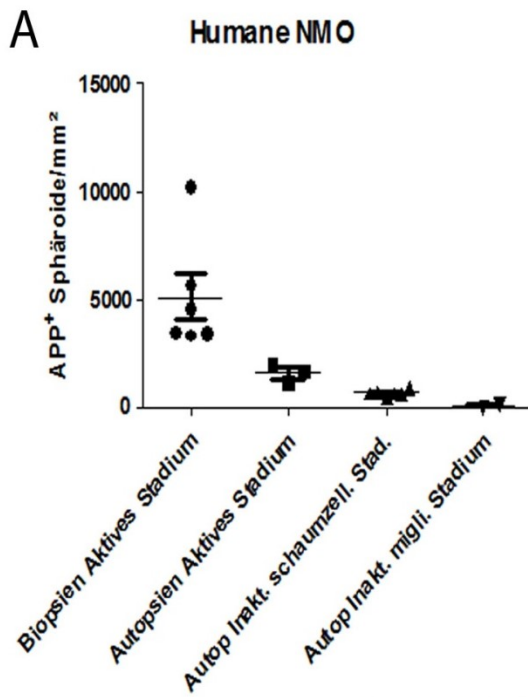


Abbildung 22: Zeitverlauf der akuten Axonpathologie bei NMO. Immunhistochemische APP-Färbung (braun). Die Dichte an APP⁺ Axonsphäroiden ist in den aktiven Läsionen der Biopsien am höchsten (B) und nimmt im weiteren Zeitverlauf ab (A); In den aktiven Läsionen der Autopsien ist der Axonschaden bereits weniger ausgeprägt (C) und im inaktiven schaumzelligen Stadium sehr gering (D). Das inaktive mikrogliale Stadium zeigt nur noch vereinzelte APP⁺ Axonsphäroide (E). Die Pfeile weisen auf APP⁺ Axonsphäroide. B-E: 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm.

3.2.3.2 Akute Axonpathologie bei MS

Auch bei den MS-Fällen wurde ein extensiver Axonschaden in akut demyelinisierten MS-Läsionen nachgewiesen. Die mittlere Dichte an APP⁺ Axonsphäroiden betrug in den Biopsien 4171 ± 1060 APP⁺ Axonsphäroide/mm² und in den aktiven Läsionen der Autopsien 2710 ± 1533 Axonsphäroide/mm² (**Abbildung 23B+C**).

Chronisch-aktive Läsionsareale zeigten eine weniger starke, aber dennoch weiterhin ausgeprägte akute axonale Schädigung von 456 ± 351 Axonsphäroiden/mm² (**Abbildung 23D**).

In inaktiven Läsionen waren nahezu überhaupt keine APP⁺ Axonsphäroiden zu detektieren. Die Anzahl lag im Mittel bei $0,25 \pm 0,5$ Axonsphäroide/mm² (**Abbildung 23E**).

Auch bei den MS-Fällen zeigte sich damit eine sehr frühe und ausgeprägte akute axonale Schädigung. Sie nahm auch hier im Zeitverlauf der Läsionsentwicklung ab und wies zwischen den verschiedenen Stadien einen deutlichen Unterschied auf.

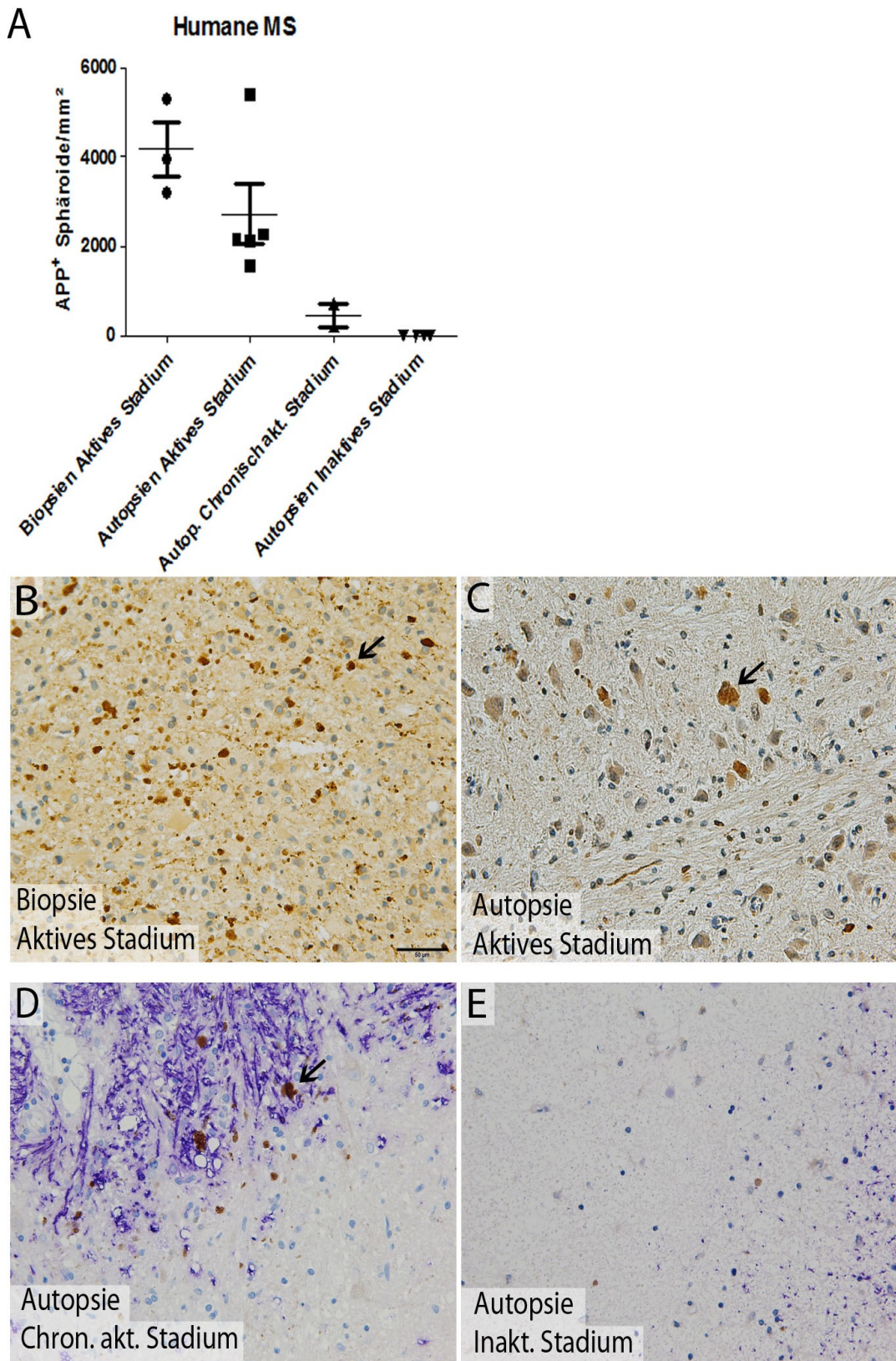


Abbildung 23: Zeitverlauf der akuten Axonpathologie bei MS. Die Dichte an APP⁺ Axonsphäroiden ist in den aktiven Läsionen der Biopsien am höchsten (B; APP) und nimmt im Verlauf der Läsionsentwicklung ab (A):

In den aktiven Läsionen der Biopsien ist der Axonschaden bereits merklich abgeschwächt (C; APP) und im chronisch-aktiven Stadium noch geringer ausgeprägt (D; APP-MBP). Das inaktive Stadium zeigt fast keine APP⁺ Axonsphäroide mehr (E; APP-MBP). Die Pfeile weisen auf APP⁺ Axonsphäroide. 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm.

3.2.3.3 Axonpathologie im Vergleich zwischen NMO und MS

Einige der Demyelinisierungsstadien der NMO und MS entsprechen einander und können damit auch statistisch verglichen werden. Dies betrifft die aktiven Läsionen der Biopsien und Autopsien sowie das inaktive Stadium der MS und das inaktive mikrogliale Stadium der NMO. Ein chronisch-aktives Stadium der NMO ist bisher nicht bekannt.

Es konnte beim Vergleich der entsprechenden Läsionsstadien hinsichtlich der akuten axonalen Schädigung zwischen MS und NMO kein signifikanter Unterschied festgestellt werden: Bei der Durchführung der Varianzanalyse nach dem Mann-Whitney-U-Test ergab sich mit einem p-Wert von $p = 0,7143$ kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl APP-positiver Axonsphäroide in aktiven Läsionen von NMO- und MS-Biopsien (**Abbildung 24**).

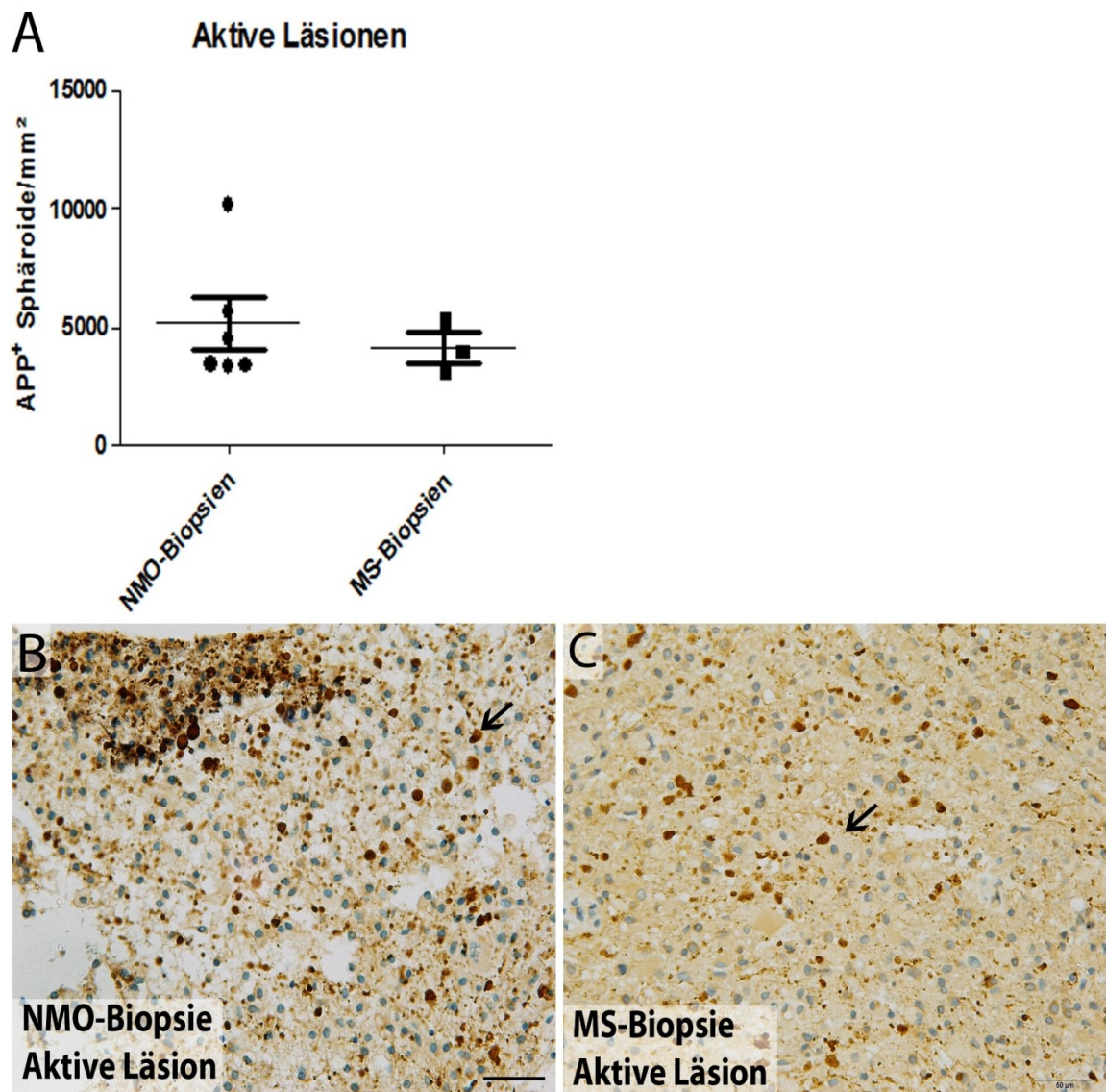


Abbildung 24: Akute Axonpathologie im aktiven Stadium von NMO- und MS-Biopsien (Vergleich). Das Ausmaß der akuten Axonschädigung in frühen NMO- und MS-Läsionen ist jeweils beträchtlich und zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Erkrankungen (A; B; C). Die Pfeile zeigen auf APP-positive Axonsphäroide (braun). 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μm .

Auch ein Vergleich der Dichte an APP-positiven Axonsphäroiden in aktiven Läsionen von NMO- und MS-Autopsien zeigte im Mann-Whitney-U-Test mit einem p-Wert von $p = 0,1429$ keinen statistisch signifikanten Unterschied (**Abbildung 25**).

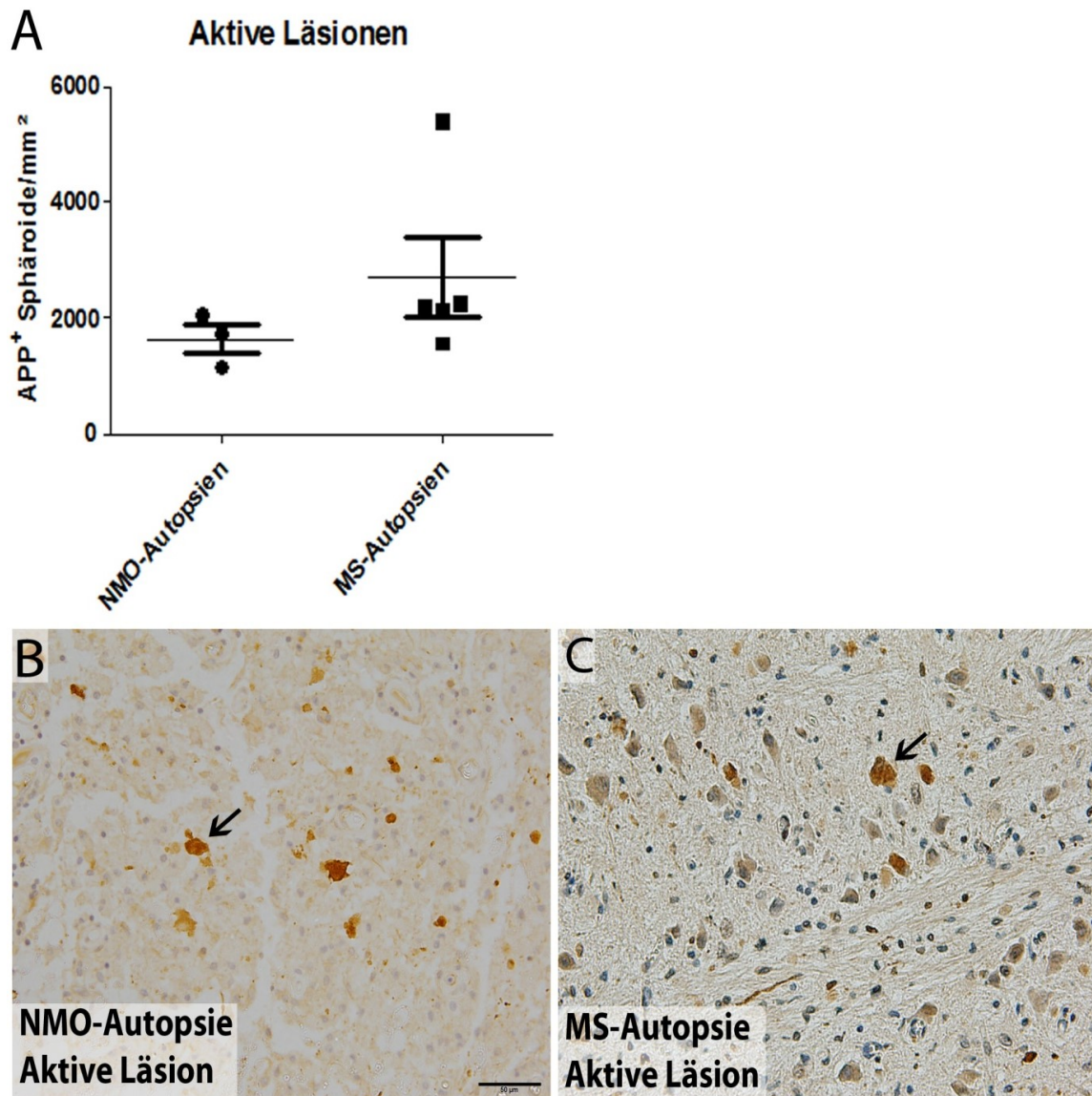


Abbildung 25: Akute Axonpathologie im aktiven Stadium von NMO- und MS-Autopsien (Vergleich). Das Ausmaß der akuten Axonschädigung in akuten Läsionen von NMO- und MS-Autopsien ist erheblich und zeigt keinen signifikanten Unterschied (A; B; C). Die Pfeile zeigen auf APP-positive Axonsphäroide. 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 µm.

Die Axonpathologie des inaktiven mikroglialen Stadiums der NMO und des inaktiven Stadiums der MS konnte nicht mit statistischen Tests verglichen werden, da die Stichprobengröße der inaktiven mikroglialen NMO-Läsionen infolge ihrer sehr geringen Prävalenz zu klein war ($n = 4$ für MS-Autopsien und $n = 2$ für NMO-Autopsien). Bei einer mittleren Dichte an APP-positiven Axonsphäroiden von 112 ± 136 Axonsphäroide/ mm^2 bei den NMO-Läsionen und $0,25 \pm 0,5$ Axonsphäroide/ mm^2 bei den MS-Läsionen ist die akute axonale Schädigung bei beiden Gruppen sehr gering (**Abbildung 26**). Lediglich in inaktiven mikroglialen Läsionen von NMO-

Autopsien ist die akute Axonpathologie etwas stärker als in inaktiven Läsionen von MS-Autopsien.

A Chronisch inaktive Läsionen

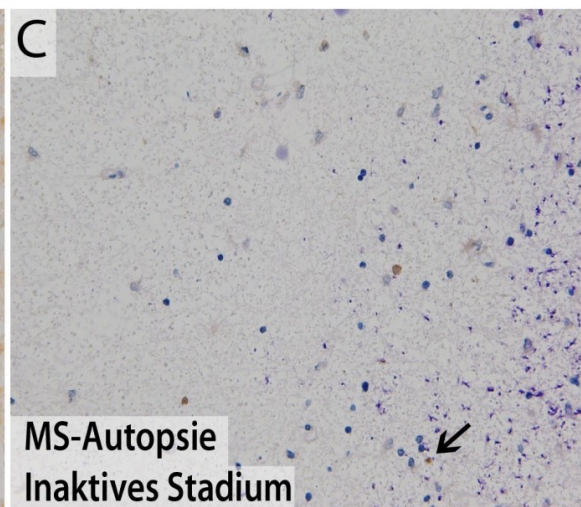
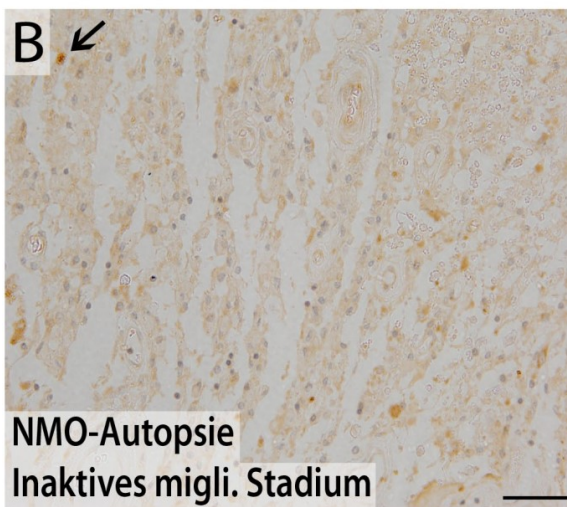
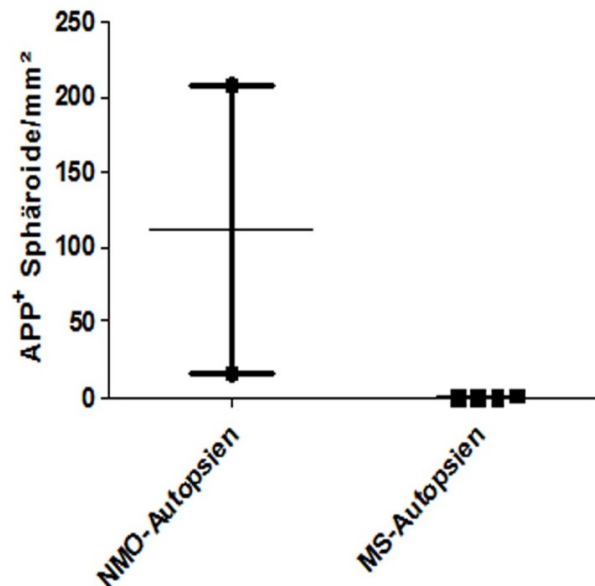


Abbildung 26: Akute Axonpathologie im chronisch-inaktiven Stadium von NMO- und MS-Autopsien (Vergleich). Das Ausmaß der akuten Axonschädigung in inaktiven mikroglialen Läsionen von NMO-Autopsien und inaktiven Läsionen von MS-Autopsien ist vergleichsweise gering. In inaktiven mikroglialen Läsionen von NMO-Autopsien ist die akute Axonpathologie etwas stärker ausgeprägt bei allerdings kleiner Anzahl an untersuchten Läsionen (A; B; C). Die Pfeile zeigen auf APP-positive Axonsphäroide. 200-fache Originalvergrößerung; Balkengröße 50 μ m.

4 Diskussion

Extensive axonale Schädigung, die durch akute Krankheitsattacken zu schwerer neurologischer Dysfunktion und gravierender dauerhafter Behinderung bei Patienten mit NMO führt, ist ein histologisches Schlüsselmerkmal der Erkrankung (Bukhari et al. 2012; Kowarik et al. 2014; Wingerchuk und Weinshenker 2014). Dennoch ist meines Wissens nach bisher noch keine tiefgehende Analyse der Axonpathologie bei der NMO erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fragen nach dem zeitlichen Verlauf axonaler Schädigung, nach ihren Mechanismen sowie nach Unterscheidungsmerkmalen des axonalen Schädigungsmusters zwischen NMO und MS betrachtet.

Insbesondere die Mechanismen axonaler Destruktion bei der NMO liegen noch im Dunkeln. 2010 publizierte Experimente von Marignier et al. zeigten Glutamat-Exzitotoxizität als möglichen Mechanismus der oligodendroglialen Schädigung auf. In der vorliegenden Arbeit ging es daher auch um die Frage, ob Glutamat-Rezeptorantagonisten den Axonschaden bei der NMO reduzieren und damit neuroprotektiv wirken können. Das gleiche wurde für P2X7-Rezeptorantagonisten, einen IL-1-RA, Apyrase und einen Caspase-3-Inhibitor untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die axonale Schädigung im fokalen NMO-Modell am Rattenhirn bereits sehr früh, d. h. innerhalb der ersten sechs Stunden nach Läsionsinduktion, auftritt und innerhalb der ersten Woche sehr stark zunimmt. Nach sieben Tagen erreicht die akute Axonschädigung ihre stärkste Ausprägung, nach zwei und vier Wochen ist mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden keine akute Axonpathologie mehr nachweisbar.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die parenchymale axonale Schädigung durch fokale und systemische Applikation von NMDA-Rezeptor-, AMPA/Kainat-Rezeptor- und P2X7-Rezeptorantagonisten signifikant reduziert wird. Die fokale Applikation von IL-1-RA, Caspase-3-Inhibitor und Apyrase zeigte keinen signifikanten Effekt auf die parenchymale Axonschädigung. Die systemische Applikation von NMDA-Rezeptor- und P2X7-Rezeptorantagonisten verminderte neben der parenchymalen axonalen Schädigung auch den perivaskulären Axonschaden in grauer Substanz signifikant.

Beim Vergleich der Axonschädigung bei NMO und MS konnte zwischen den einander entsprechenden Aktivitätsstadien der beiden Erkrankungen kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Axondestruktion festgestellt werden. Sowohl bei NMO als auch bei MS wurde jedoch ein

signifikanter Unterschied in der Dichte der geschädigten Axone innerhalb der verschiedenen Läsionsaktivitätsstadien der beiden Erkrankungen beobachtet.

4.1 Axonpathologie im fokalen NMO-Modell

4.1.1 Die Bedeutung des fokalen NMO-Modells

Das im tierexperimentellen Teil dieser Arbeit verwendete fokale NMO-Modell generiert Läsionen im Rattenhirn mit einer bemerkenswerten Ähnlichkeit mit humanen NMO-Läsionen, wie sie z. B. von Lucchinetti et al. (2002) sowie Roemer et al. (2007) beschrieben wurden. Dies zeigt sich insbesondere auch im rasch nach der Läsionsinduktion einsetzenden Astrozyten- und nachfolgenden Oligodendrozytenverlust. Auch die APP-positiven Axonsphäroide, die Komplement- und Immunglobulin-Ablagerungen und das frühe, aus polymorphnukleären Zellen bestehende entzündliche Infiltrat charakterisieren nicht nur humane, sondern auch unsere experimentellen NMO-Läsionen.

Kritisch bewertet werden muss in unserem Modell die untersucherabhängige Abgrenzung mechanisch bedingter APP-positiver Axonsphäroide in unmittelbarer Stichkanalnähe von rein krankheitsbedingter Axonschädigung, welche bei der Fragestellung dieser Arbeit im Vordergrund steht.

Auch die Injektionsstelle, die sich über dem Corpus callosum befinden sollte, war nicht immer an exakt identischer Stelle im Gehirn lokalisiert und damit keine konstante Untersuchungsbedingung.

Unter Vernachlässigung dieser eher wenig ins Gewicht fallenden Aspekte kann dennoch gesagt werden, dass die NMO-Läsionspathologie gut in unserem fokalen stereotaktischen Modell wiedergespiegelt wird. Das Modell kann damit zu validen Aussagen über verschiedene histopathologische Charakteristika und die Pathophysiologie der Erkrankung herangezogen werden.

4.1.2 Zeitverlauf axonaler Schädigung

Diese Arbeit zeigt, dass axonale Schädigung im fokalen NMO-Modell bereits sehr früh, d. h. innerhalb der ersten sechs Stunden nach Läsionsinduktion, auftritt und innerhalb der ersten

Woche sehr stark zunimmt. Nach sieben Tagen erreichte die akute Axonschädigung ihre stärkste Ausprägung, nach zwei Wochen war keine akute Axonpathologie mehr nachweisbar.

Diese frühe Axonschädigung erklärt möglicherweise die Klinik der NMO-Patienten, welche häufig bereits im frühen Erkrankungsstadium schwere, dauerhafte klinische Behinderungen als Korrelat extensiver axonaler Schädigung aufweisen (Wingerchuk et al. 2007b; Miyazawa et al. 2007; Fujihara 2006).

Die von Wrzos et al. 2014 publizierten Daten zur zeitlichen Entwicklung von Astrozytendepletion, Oligodendrozyten-, OPC- und Myelin-Verlust sowie weiterer histopathologischer Charakteristika der experimentellen NMO sind zum Zeitverlauf axonaler Schädigung in Beziehung zu setzen. Dies lässt folgende Rückschlüsse auf Pathophysiologie und Läsionsentstehung im NMO-Modell zu:

Im fokalen NMO-Modell war Astrozytenschädigung bereits 1 h nach Injektion der NMO-Antikörper sichtbar, es folgten Oligodendrozyten- und OPC-Verlust, dann axonale Transportstörungen und schließlich Myelinverlust (Wrzos et al. 2014). Fraglich ist, ob die Axonpathologie eine direkte Folge der Astrozytendepletion ist oder ob sie sich als Folge der Entzündungsreaktion oder der Schädigung oder des Verlusts von OPCs und Oligodendrozyten entwickelt. Zu dieser Frage geben die pharmakologischen Experimente dieser Arbeit Hinweise (s. u.). Der Myelinverlust allein scheint nicht ursächlich für die Axonschädigung sein, da diese zeitlich früher auftritt. Dass eine Myelinschädigung an der Axonschädigung mitbeteiligt ist, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Weil et al. 2016). Dies steht im Gegensatz zur MS, bei der primär entzündliche Demyelinisierung als zugrundeliegende Ursache axonalen Verlustes während früher Krankheitsstadien angenommen wird (Criste et al. 2014). Wrzos et al. (2014) beobachteten eine bereits eine Woche nach Läsionsbildung einsetzende Wiederbesiedlung mit Astrozyten, die ca. zehn Tage nach Läsionsinduktion annähernd abgeschlossen war. Die axonale Schädigung nimmt dennoch innerhalb der ersten Woche kontinuierlich zu und ist auch durch Restitution der Astrozytenpopulation nicht vollständig aufzuhalten.

Obwohl die akute Axonschädigung nach sieben Tagen die stärkste von uns gemessene Ausprägung erreichte, war nach zwei Wochen keine akute Axonpathologie in astrozytendepletierten Läsionsarealen mehr nachweisbar. Interessant bleibt die Frage nach der genauen zeitlichen Entwicklung der Axonpathologie in diesem Zeitintervall sowie nach der genauen Bestimmung ihres Maximums. Daher wären weiterführende Untersuchungen zu empfehlen, welche APP-positive

Axonsphäroide in astrozytendepletierten Läsionsarealen im Zeitraum zwischen sieben Tagen und zwei Wochen nach Läsionsinduktion quantifizieren.

Die Anzahl der untersuchten Tiere war für die einzelnen Zeitpunkte sehr variabel und reichte von zwei bis 41. Für die Zeitpunkte, die mit einer sehr kleinen Stichprobengröße untersucht wurden, sollten umfangreichere Untersuchungen angestrebt werden. Dies betrifft insbesondere alle Zeitpunkte, die kürzer als 24 h sind.

Innerhalb des Zeitintervalls der ersten Woche wurden ansonsten jedoch sehr kleine Zeitabstände gewählt. Dies erlaubt eine relativ genaue Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der Axonpathologie im fokalen NMO-Modell durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten.

Schädigungsanzeichen der Axone treten also früh auf und nehmen sehr schnell zu. Da NMO-Patienten zumeist eine inkomplette Remission aufweisen, welche im Unterschied zum Verlauf der MS die Hauptursache für eine dauerhafte Behinderung darstellt (Wingerchuk et al. 1999; Wingerchuk und Weinshenker 2003; Wingerchuk et al. 2007a; Wingerchuk et al. 2007b), ist bei der NMO eine frühe, aggressive Therapie nötig, um eine weitere exzessive Zunahme der Axonschädigung zu verhindern. Ein derartiger früher, optimaler Therapiebeginn wird in der Literatur bereits seit längerem gefordert (Nomura 2013). Dies impliziert ebenfalls die Notwendigkeit einer frühen korrekten Diagnosestellung.

4.1.3 Pharmakologische Beeinflussung axonaler Schädigung

4.1.3.1 Parenchymale Effekte durch Glutamat-Rezeptorantagonisten

Die pharmakologischen Daten zeigen, dass die Applikation sowohl der NMDA-Rezeptorantagonisten D-AP5 und MK-801 als auch der AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten NBQX und CNQX zu einer signifikanten Reduktion der Axonschädigung im Vergleich mit der vehikelbehandelten Kontrollgruppe führt.

Die Tatsache, dass die Inhibition der Glutamat-Rezeptoren mit einer verminderten Axonschädigung zusammenhängt, legt einen pathogenetischen Einfluss der in der Literatur beschriebenen Glutamatexzitotoxizität auf die Axonpathologie in NMO-Läsionen nahe, wie sie auch schon für MS beschrieben wurde (Pitt et al. 2000). Die erhöhten Glutamat Spiegel entstehen vermutlich als Folge einer verminderten Glutamat-Clearance durch die NMO-IgG-mediert zerstörten Astrozyten.

Es ist bekannt, dass AQP4 und der Glutamat-Transporter EAAT2 auf den Astrozyten, der wesentlich für die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt ist, als assoziierter Komplex in der Astrozytenmembran vorliegen. Die Bindung von Anti-AQP4-Antikörper an das AQP4 der Astrozyten bewirkt die Internalisierung von AQP4 mit nachfolgender Down-Regulierung von EAAT2. Dies führt über eine herabgesetzte Glutamatwiederaufnahme zur zytotoxischen extrazellulären Glutamatakkumulation (Hinson et al. 2008; Hinson et al. 2010; Jacob 2009). Durch die Zerstörung der Astrozyten wird zudem das in ihnen gespeicherte Glutamat (Martineau et al. 2013) schlagartig wieder freigesetzt, was die Exzitotoxizität nochmals amplifiziert. Diese kann über verschiedene Mechanismen zur Pathogenese der Axonschädigung in NMO beitragen:

Glutamaterge NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren, welche durch die hohen Glutamatspiegel verstärkt aktiviert werden, sind sowohl auf Neuronen und deren Axonen als auch auf Oligodendrozyten, Astrozyten sowie Makrophagen und Mikroglia exprimiert (Karadottir et al. 2005; Kukley et al. 2007; Misu et al. 2006; Stys und Lipton 2007). Durch die exzessiven Glutamatspiegel kommt es zu einer verstärkten Bindung an die NMDA- und AMPA-Rezeptoren der Axone, Neurone und Oligodendrozyten und dadurch zum verstärkten Ca^{2+} -Einstrom (Ogden und Taynelis 2011). Der Ca^{2+} -Einstrom und seine Akkumulation in der Zelle gelten als einer der Schlüsselmechanismen bei der Entstehung mitochondrialer Dysfunktion. Diese hat eine mangelnde axonale Energieversorgung zur Folge sowie die Aktivierung intraaxonaler Proteasen wie z. B. der Calpaine. Auch eine Degradation des Zytoskeletts durch Ca^{2+} -abhängige Caspasen kann aus übermäßiger Ca^{2+} -Akkumulation resultieren (Stirling und Stys 2010). Diese Prozesse können in Axonen, Neuronen oder anderen Zelltypen wie Oligodendrozyten, OPCs oder Astrozyten ablaufen.

Die glutamatergen Rezeptortypen sind in folgender Verteilung auf den verschiedenen Zellreihen exprimiert:

Auf Oligodendrozyten sind AMPA-, Kainat- (Sánchez-Gómez et al. 2011) und NMDA-Rezeptoren beschrieben (Karadottir et al. 2005).

Auch auf Astrozyten wurden AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren beobachtet (Kehoe et al. 2013). Newcombe et al. (2008) wiesen AMPA/Kainat-Rezeptoren speziell auf reaktiven Astrozyten in MS-Läsionen nach.

Aktivierte Mikroglia und Makrophagen exprimieren AMPA- und NMDA-Rezeptoren (Newcombe et al. 2008).

Auf Axonen wurden an glutamatergen Rezeptoren in der Literatur sowohl die Subgruppen AMPA/Kainat als auch der NMDA-Rezeptor beschrieben (Rossi et al. 2012; Ouardouz et al. 2009).

Aus dieser Datenlage ergibt sich die Frage, ob die glutamatabhängige Axonschädigung und die durch Glutamat-Rezeptorantagonisten vermittelte Axonprotektion durch einen direkten Effekt auf die Axone oder durch einen indirekten Effekt über Protektion von Oligodendrozyten, Astrozyten oder über Makrophagen und Mikroglia vermittelt werden.

Eine indirekte Verminderung der Axonschädigung wäre durch Bindung der Rezeptorantagonisten an glutamaterge Rezeptoren der **Oligodendrozyten** denkbar, welche dadurch vor den bekanntlich oligodendrozytotoxischen hohen Glutamatspiegeln geschützt würden. In der Literatur sind mehrfache Hinweise auf Oligodendrozytotoxizität erhöhter Glutamatspiegel zu finden (Murugan et al. 2013; Ness und Wood 2002). Ein solcher indirekter Mechanismus der Axonprotektion müsste dann in unseren pharmakologischen Experimenten durch einen protektiven Effekt auf Oligodendrozyten nachweisbar sein. Daher sind weiterführende Experimente zu empfehlen, bei welchen sowohl Oligodendrozyten als auch OPCs nach der Applikation von Glutamat-Rezeptorantagonisten im fokalen NMO-Modell quantifiziert werden sollten, um zwischen einem direkten axonalen und einem indirekten oligodendrozytenvermittelten Mechanismus der Axonprotektion zu unterscheiden.

Auch auf **Astrozyten** sind glutamaterge Rezeptoren, insbesondere NMDA- und Kainat-Rezeptoren, beschrieben worden (Dzamba et al. 2015; Matschke et al. 2015). Damit ist es möglich, dass sich die Glutamatoxizität ebenfalls auf die Astrozyten auswirkt und durch Glutamat-Rezeptorantagonisten reduziert werden kann. Dies könnte eine Abmilderung der Astrozytopathie bei der NMO zur Folge haben, welche neuroprotektive Effekte vermuten lässt. Ein solcher Mechanismus würde sich histopathologisch in einer verminderten Astrozytendepletion in den Läsionsstellen darstellen. Diesen Eindruck konnten wir bei unserer Auswertung in den GFAP-APP-Doppelmarkierungen nicht gewinnen. Es wäre aber zu empfehlen, die Astrozytendichte in mit Glutamat-Rezeptorantagonisten therapierten und nicht therapierten Läsionsstellen zu quantifizieren und zu vergleichen.

Auch eine indirekte Wirkung der Glutamat-Rezeptorantagonisten auf die Axondegeneration über eine Inhibition glutamaterger Rezeptoren auf **Makrophagen** und aktivierter **Mikroglia** ist in die Überlegungen zur Pathogenese der Axonschädigung mit einzubeziehen. Eine 2012 von Liu et al. durchgeführte Studie konnte zeigen, dass NMDA-Rezeptorantagonisten Makrophagenaktivität downregulieren können (Liu et al. 2012). Wäre dies der im Vordergrund stehende Mechanismus bei der Vermittlung der Axonprotektion, hätte dies jedoch generell ein verändertes histologisches Bild unserer pharmakologisch behandelten Läsionen zur Folge. Es wäre zu erwarten, dass nicht nur die Dichte an geschädigten Axonen, sondern auch die Läsionsgröße generell vermindert wäre und die Entzündung im Vergleich zu pharmakologisch unbehandelten Läsionen weniger stark ausgeprägt wäre. Dies schien bei meinen Auswertungen nicht der Fall zu sein. Dennoch sollte dies quantitativ untersucht werden. Daher wäre es in weiteren Untersuchungen sinnvoll, mit Glutamat-Rezeptorantagonisten behandelte Läsionen unseres fokalen NMO-Modells auszumessen und auf Unterschiede bzgl. der Läsionsgröße und der entzündlichen, makrophageninduzierten Veränderungen zu untersuchen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Makrophagen z. B. durch den *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) über proinflammatorische Mechanismen zur Glutamatergizität beitragen (Naruoka et al. 2013). Selbst wenn eine Inhibition der glutamatergen Rezeptoren auf Makrophagen daher keine unmittelbare Reduktion der Axonschädigung bewirkt, ist es dennoch möglich, dass die Auswirkungen der durch die Makrophagen potenzierten Glutamatergizität durch die Antagonisierung der Glutamat-Rezeptoren auf den anderen Zellreihen abgemildert wird.

Es bleibt noch der direkte Mechanismus der Axonprotektion als weitere Möglichkeit zu erwägen: **Axonale NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren** könnten direkt durch Rezeptorantagonisten inhibiert werden. Dadurch wird verhindert, dass durch die Bindung von Glutamat axonschädigende Prozesse wie ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst werden. Eine direkte Bindung von Glutamat-Agonisten an AMPA- und GluR5-Kainat-Rezeptoren zentraler myelinisierter Axone ist auch in der Literatur zu finden. Dort löst eine solche Bindung ebenso Signalkaskaden aus, welche über verstärkten intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom axonale Degeneration fördern können (Ouardouz et al. 2009). Da es, wie oben beschrieben, Argumente gegen einen oligodendrozyten- bzw. makrophagenvermittelten indirekten Mechanismus gibt, sollte die Evidenz für einen direkten, axonal vermittelten neuroprotektiven Effekt der Pharmaka weiter untersucht werden. Dazu würde sich eine Analyse der Axonschädigung in einem Knockout-Tiermodell eignen, welches gendefizient für axonale NMDA- bzw. AMPA/Kainat-Rezeptoren sein

sollte und in welchem fokale NMO-Läsionen generiert werden können. Ein solches Mausmodell wird in der Literatur bereits beschrieben (Kuhn et al. 2012; Hasan et al. 2013). Wäre in einem solchen Modell eine signifikante Reduktion der Axonschädigung zu beobachten, wäre anzunehmen, dass die Reduktion axonaler Degeneration durch NMDA- bzw. AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten über axonale glutamaterge Rezeptoren vermittelt wird.

Weiterführende Studien sollten zudem zum Ziel haben, das Ausmaß der Axonschädigung in grauer und weißer Substanz zu vergleichen, da in der grauen Substanz höhere Glutamatspiegel beschrieben werden (Lehre et al. 1995). Dies lässt, nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu urteilen, eine stärkere Axondestruktion in der grauen als in der weißen Substanz vermuten. Das Läsionsvolumen der grauen Substanz gilt als wesentlich Prognose-bedeutender als das Läsionsvolumen der weißen Substanz (Horakova et al. 2009). Daher wäre eine Therapiemethode, welche die hohen Glutamatspiegel in der grauen Substanz als Target hat, möglicherweise mit einem bedeutenden klinischen Benefit verbunden.

4.1.3.2 Parenchymale Effekte durch P2X7-Rezeptorantagonisten

Die Analyse der pharmakologischen Daten ergab des Weiteren, dass nach Applikation der P2X7-Rezeptorantagonisten oATP und BBG eine signifikante Reduktion der Axonschädigung im Vergleich mit der vehikelbehandelten Kontrollgruppe vorlag. Die Behandlung mit dem ATP-abbauenden Enzym Apyrase und mit einem IL-1-RA dagegen zeigte keinen signifikanten Effekt auf das Ausmaß der Axonschädigung im fokalen NMO-Modell.

ATP ist der zweite exzitatorische Neurotransmitter, welcher in ungewöhnlich hohen Konzentrationen über eine Bindung an die P2X7-Rezeptoren verschiedener Zelltypen zur exzitotoxischen Axonschädigung führen kann. P2X7-Rezeptoren werden sowohl auf Axonen als auch auf weiteren Zelltypen wie Oligodendrozyten, Astrozyten, Mikroglia und Makrophagen exprimiert.

Diese Exzitotoxizität durch ATP ist in Übereinstimmung mit vielen in der Literatur beschriebenen Studien. ATP wird verstärkt durch geschädigte Neurone und aktivierte Gliazellen freigesetzt und kann durch Ca^{2+} -Überladung seine exzitotoxische Wirkung auf Oligodendrozyten, Myelin, Neurone und Axone entfalten. Dies kann bis zum neuronalen Zelltod führen (Liu et al. 2010; Arbeloa et al. 2012; Domercq et al. 2010; Matute 2011). Anhaltende Aktivierung purinergischer P2X7-Rezeptoren *in vivo* durch hohe Konzentrationen an ATP verursacht Läsionen mit typischen Merkmalen von MS-Plaques: Dazu zählen Demyelinisierung, Oligodendrozytentod

und axonale Schädigung. Umgekehrt vermindert die Anwendung von P2X7-Rezeptorantagonisten nicht nur die ATP-Exzitotoxizität auf Oligodendrozyten, sondern sie zeigt auch neuroprotektive Effekte und vermindert neurologische Defizite in der EAE (Arbeloa et al. 2012; Oyanguren-Desez et al. 2011; Matute et al. 2007).

Es stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus die nachgewiesene ATP-Exzitotoxizität zur Axondestruktion führt. Dies kann theoretisch über jeden in den Krankheitsmechanismus involvierten Zelltyp ablaufen, der P2X7-Rezeptor exprimiert.

Zum einen führt die verlängerte Aktivierung der P2X7-Rezeptoren auf den **Oligodendrozyten** zu einer Akkumulation von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} (North 2002) im Zytosol und zu einer Caspase-3-Aktivierung bis hin zum Zelltod (Matute 2008; Matute et al. 2007). Eine indirekte Verminderung der Axonschädigung wäre durch Bindung der Rezeptorantagonisten an P2X7-Rezeptoren der Oligodendrozyten denkbar, welche dadurch vor den oligodendrozytotoxischen hohen ATP-Spiegeln geschützt würden und so ihre Funktion der Axonprotektion behielten. Ein solcher indirekter Mechanismus der Axonprotektion müsste dann in unseren pharmakologischen Experimenten durch einen protektiven Effekt auf Oligodendrozyten nachweisbar sein. Daher sind weiterführende Experimente zu empfehlen, bei welchen sowohl Oligodendrozyten als auch OPCs nach der Applikation von P2X7-Rezeptorantagonisten quantifiziert werden sollten.

Astrozyten gewährleisten die Glutamatwiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt nicht nur durch den Glutamattransporter EAAT2, sondern auch durch den Na^+ -abhängigen Glutamat/Aspartat-Transporter (GLAST). Der in NMO-Läsionen erhöhte ATP-Spiegel führt zur vermehrten Aktivierung der P2X7-Rezeptoren, welche auch auf Astrozyten exprimiert werden (Franke und Illes 2014). Dies hat eine verminderte Expression von GLAST und eine reduzierte Glutamat-Clearance zur Folge. Die Applikation von P2X7-Rezeptorantagonisten dagegen führt zu einer Erholung der astrozytären GLAST-Funktion und schützt dadurch Neurone vor glutamatinduzierter Exzitotoxizität. Theoretisch könnte die P2X7-rezeptorantagonistisch vermittelte Axonprotektion auch über diesen Mechanismus entfaltet werden (Liu et al. 2010). Dagegen spricht jedoch unsere Beobachtung, dass die Läsionsareale der pharmakologisch behandelten Gruppe, welche eine verminderte Axonschädigung aufwiesen, genauso stark astrozytendepletiert erschienen wie die nicht mit P2X7-Rezeptorantagonisten behandelten, stark axongeschädigten Läsionen.

Auch eine indirekte Wirkung der P2X7-Rezeptorantagonisten auf die Axondegeneration über eine Inhibition purinerge Rezeptoren auf **Mikrogliazellen** ist in die Überlegungen zur Entstehung der Axonschädigung einzubeziehen. Die ATP-Bindung an P2X7-Rezeptoren fördert die Mikroglia-Aktivierung, die über das proinflammatorische Zytokin IL-1 β Axondegeneration induzieren kann (Ni et al. 2013; Parajuli et al. 2013). Eine Antagonisierung dieser Rezeptorgruppe auf Mikroglia würde daher potenziell die P2X7-induzierte Neurodegeneration vermindern. Um diesen Signalweg von einer direkten inhibitorischen und protektiven Wirkung der Rezeptorantagonisten auf Axonen zu unterscheiden, wurde in einem weiteren Experiment ein IL-1-RA appliziert. Bei diesem Experiment zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Axonschädigung. Dieses Ergebnis spricht gegen einen hauptsächlich indirekten, mikrogliavermittelten Mechanismus der Axonprotektion.

Auf **Makrophagen** sind ebenfalls P2X7-Rezeptoren exprimiert (Gicquel et al. 2014), welche durch Antagonisierung potenziell den axonalen Schaden beeinflussen können. Um dies zu verifizieren, ist, analog zu den Glutamat-Rezeptorantagonisten, die vergleichende Untersuchung der Läsionsgröße und weiterer entzündlicher, makrophageninduzierter Veränderungen in pharmakologisch behandelten und unbehandelten Läsionen empfohlen.

Zum anderen kann Axonprotektion direkt über unmittelbare Inhibition **axonaler P2X7-Rezeptoren** vermittelt werden (Alloisio et al. 2008; Marcoli et al. 2008; Díaz-Hernandez et al. 2008). Dadurch wird verhindert, dass die Bindung von in hoher Konzentration vorhandenem ATP axonschädigende Prozesse wie z. B. einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom auslöst. Da wie oben beschrieben Zweifel an einem mikroglia- oder makrophagenvermittelten indirekten Mechanismus bestehen könnte, sollte die Evidenz für einen direkten, axonal vermittelten neuroprotektiven Effekt der Pharmaka weiter untersucht werden. Dazu würde sich eine Analyse der Axonschädigung in einem Knockout-Tiermodell eignen, welches gendefizient für axonale P2X7-Rezeptoren ist. Wäre in einem solchen Modell eine signifikante Reduktion der Axonschädigung zu beobachten, wäre anzunehmen, dass die Reduktion axonaler Degeneration durch ATP-Rezeptorantagonisten über axonale P2X7-Rezeptoren vermittelt wird.

Es gibt außerdem aktuelle Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen glutamatergen und purinergen Signalwegen. So wurde beobachtet, dass präsynaptische P2X7-Rezeptoren eine Rolle bei ATP-induzierter Glutamat-Freisetzung spielen (Marcoli et al. 2008). Im Gegenzug wurde auch beschrieben, dass NMDA-Rezeptoraktivierung ATP-Freisetzung aus kultivierten

Neuronen induzieren kann, die beispielsweise zu mikroglialer P2X7-Rezeptoraktivierung führen kann (Anrather et al. 2011). Somit kann sowohl glutamaterge als auch purinerge Stimulation, z. B. im exzitotoxischen Milieu, zur Aktivierung der jeweils anderen Signalkaskade führen. Dies kann die exzitotoxisch bedingte Axondegeneration weiter verstärken.

Bei all diesen Überlegungen bleibt dennoch zu bedenken, dass im menschlichen Organismus eine Vielzahl an weiteren pathologischen und pathophysiologischen Prozessen abläuft, welche in unserem Modell nicht komplett widerspiegelt werden können. Daher ist es möglich, dass die Axonschädigung bei NMO-Patienten durch weitere Mechanismen hervorgerufen und beeinflusst wird, welche sich nicht durch Glutamat- oder P2X7-Rezeptorantagonisten abschwächen lassen bzw. welche deren Wirkung relativieren. Um diese Überlegungen zu testen, braucht es weitere Experimente in NMO-Tiermodellen und zum gegebenen Zeitpunkt Patientenstudien.

4.1.3.3 Perivaskuläre Effekte durch Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten

Der Signalweg, welcher im fokalen NMO-Modell nach intravenöser Applikation der Glutamat- bzw. P2X7-Rezeptorantagonisten zur perivaskulären Axonprotektion führt, verläuft vermutlich identisch mit demjenigen, der die parenchymale Axonprotektion vermittelt. Fraglich bleibt, warum die perivaskuläre Axonschädigung sehr ausgeprägt ist und warum sie in der grauen Substanz durch systemische Applikation der glutamatergen und purinerger Rezeptorantagonisten signifikant reduziert werden kann.

Zum einen passt die perivaskuläre Axonschädigung gut in das pathogenetische Bild der NMO: Eine vermutlich T-Zell-medierte Schädigung der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht Anti-AQP4-Antikörpern den Zugang zum ZNS, insbesondere zu den Astrozytenfortsätzen, welche an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. Dies ist insbesondere an vulnerablen und permeableren Stellen wie der Area postrema möglich (Graber et al. 2008). Durch die Wirkung der NMO-Antikörper werden die Astrozyten nachhaltig geschädigt, was zu einer weiteren Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke führt. Dadurch können Entzündungszellen und -mediatoren, aber auch intravenös verabreichte Therapeutika an den Ort der Inflammation gelangen. Perivaskuläre Axone sind somit dem schädigenden Einfluss der Entzündungszellen und -mediatoren, der perivaskulären, initial geschädigten Astrozyten und deren freigesetzter Metabolite und Neurotransmitter schutzlos ausgesetzt. Dementsprechend stark fällt auch die perivaskuläre akute Axonpathologie aus. Dafür werden diese Axone jedoch auch besonders gut von den

systemisch applizierten Pharmaka erreicht, da sich die NMO-Antikörper und die intravenös applizierten Therapeutika denselben Weg ins ZNS bahnen.

Dies passt des Weiteren gut zum histologischen Bild der NMO, welches u. a. durch prominente perivaskuläre IgG- und IgM- und Komplementablagerung in für die NMO charakteristischen ring- oder rosettenartigen Mustern gekennzeichnet ist. Die betroffenen Blutgefäße sind dabei in späteren Stadien stark fibrosiert und hyalinisiert (Lucchinetti et al. 2002; Misu et al. 2006; Roemer et al. 2007).

Da die Stichprobengröße unserer Experimente, v. a. der systemisch applizierten Pharmaka, mit max. $n = 6$ nicht sehr groß war, sollten zur Konsolidierung unserer Ergebnisse Experimente mit einer höheren Anzahl an Tieren pro Gruppe durchgeführt werden.

Zu beantworten ist zudem die Frage, weshalb in unseren Experimenten die intravenöse Applikation der Glutamat- bzw. P2X7-Rezeptorantagonisten zur perivaskulären Axonprotektion in der grauen, jedoch nicht in der weißen Substanz führt. Hier ist zum einen anzuführen, dass die Stichprobengröße relativ gering war ($n = 7$ bei MK-801, $n = 6$ bei BBG, $n = 3$ bei Memantin) und es daher empfehlenswert scheint, Experimente mit einer umfassenderen Stichprobengröße durchzuführen.

Zum anderen stellt sich die Frage, welche Gründe es für eine tatsächlich fehlende perivaskuläre Axonprotektion durch systemische Gabe von Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten in der weißen Substanz geben könnte. Eine Hypothese wäre, dass der perivaskuläre Axonschaden in der weißen Substanz *per se* etwas stärker ausgeprägt ist als in der grauen Substanz. Dies konnten wir in der Auswertung unserer Daten nicht beobachten, auch hier scheinen jedoch weiterführende Analysen und Experimente mit einer umfassenderen Stichprobengröße sinnvoll. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass in der grauen Substanz eine unterschiedliche Dichte an Perikaryen die Exzitotoxizität anders beeinflusst als in der weißen Substanz. Folglich ist es möglich, dass hier eine andere Pathophysiologie der Axonschädigung im Vordergrund steht und daher andere Therapieoptionen zur Axonprotektion herangezogen werden sollten. Weitere mögliche Komponenten, welche einen unterschiedlichen Therapieerfolg der Pharmaka in der grauen und weißen Substanz erklären könnten und daher weiter untersucht werden sollten, sind die Rezeptordichte für die untersuchten Transmitter an den Axonen und weiteren Zellen der grauen und weißen Substanz, die Diffusionskapazität des Antikörpers versus Diffusionskapazität der

von uns verwendeten Pharmaka und deren Molekülgröße, sowie die Vulnerabilität der Axone in der grauen und weißen Substanz.

4.1.3.4 Parenchymale Effekte durch Caspase-3-Inhibitor

Die Behandlung mit dem Caspase-3-Inhibitor im fokalen NMO-Modell zeigte eine leichte Reduktion der Axonschädigung im Vergleich mit der vehikelbehandelten Kontrollgruppe. Der Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Literatur beschreibt zum einen, dass die glutamatinduzierte Apoptose von Neuronen selektiv durch einen Caspase-3-Inhibitor geblockt werden kann (Steinbach und Lutz 2007). Daher erschien uns die Applikation eines Caspase-3-Inhibitors im fokalen NMO-Modell sinnvoll, um die Auswirkung desselben auf die axonale Schädigung zu untersuchen.

Zum anderen gibt es aber auch Beobachtungen, welche gegen einen destruktiven Effekt von Caspase-3 auf Axone sprechen und die unzureichende Wirksamkeit der Caspase-3-Antagonisierung auf die Axonschädigung erklären würden. Sabater et al. beobachteten bereits 2009, dass die in NMO durch AQP4-antikörperinduzierte, komplementabhängige Zytotoxizität von Astrozyten nicht von einer Caspase-3/7-Aktivierung oder einem erhöhten Prozentsatz an apoptotischen Zellen begleitet wird (Sabater et al. 2009). Außerdem ist bekannt, dass Caspasen neben ihrer Bedeutung für die Apoptose auch in anderen physiologischen Prozessen vieler Zellen, u. a. von Neuronen, eine wichtige Funktion haben (Campbell und Okamoto 2013).

4.1.3.5 Zusammenfassung: Pharmakologische Behandlung axonaler Schädigung

Die vorliegende Arbeit ist die erste auf dem Gebiet der axonalen Schädigung bei NMO hinsichtlich Zeitverlauf und Therapie. Sie beantwortet zentrale Fragen zu Entstehungsmechanismen der NMO, welche bislang noch nicht untersucht worden sind, und schlägt neue Therapieansätze vor. Damit stellt sie einen Meilenstein bei der Erforschung der Axonpathologie in der NMO dar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Bedeutung der Exzitotoxizität von Glutamat und ATP über NMDA, AMPA/Kainat- und P2X7-Rezeptoren für die Pathogenese der im Krankheitsverlauf früh beobachteten und ausgeprägten axonalen Schädigung in NMO. Des Weiteren schlägt sie Glutamat- und P2X7-Rezeptorantagonisten als neue, *in vivo* wirkungsvolle Therapiemethode vor.

Dies ist insofern von großer Bedeutung, dass die Axonschädigung in NMO bisher noch nicht optimal therapiert werden konnte und die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, die v. a. auf die Effektormechanismen der NMO abzielen, empfohlen wird (Matà und Lolli 2011). Zudem korreliert die Axonschädigung direkt mit dem Ausmaß an klinischer Behinderung und hat daher das Potential, direkt den Krankheitsverlauf und die Prognose der NMO zu beeinflussen. Dies zeigt die dringende Notwendigkeit neuroprotektiver Therapiemethoden, welche mit unserer Arbeit erstmals auch für NMO aufgezeigt werden konnten. Für die MS, bei der neurodegenerative Prozesse eine große Rolle spielen (Stadelmann et al. 2011), wurden schon mehrfach neuroprotektive Therapieansätze vorschlagen, z. B. durch die Therapie mit NMDA-Rezeptorantagonisten wie Memantin, welche in klinischen Studien jedoch häufig keinen signifikanten oder einen untergeordneten Effekt zeigten (Lovera et al. 2010).

Eine frühe und sichere Diagnosestellung ist in diesem Zusammenhang besonders wichtig, da es sich bei der in dieser Arbeit vorgestellten Therapiemöglichkeit um die Protektion der Axone vor exzessiven Glutamat- und ATP-Spiegeln handelt. Es besteht also Handlungsbedarf, **bevor** ein Großteil der Axone untergegangen ist.

In der Zukunft ist die weiterführende Untersuchung der Pathogenese und Therapie axonaler Schädigung in der NMO empfehlenswert. Dazu sollten die in dieser Arbeit dargestellten Experimente mit größerem Stichprobenumfang zur Konsolidierung der Ergebnisse sowie mit Knockout-Tieren für NMDA-, AMPA/Kainat- und P2X7-Rezeptoren auf Axonen durchgeführt werden.

4.2 Axonpathologie in humanen NMO- und MS-Fällen

Verschiedene pathologische Charakteristika haben traditionell dazu geführt, NMO als destruktiver anzusehen als MS. So besteht bei der NMO im Gegensatz zur MS bereits nach dem ersten Schub ein hohes Risiko für eine dauerhafte klinische Behinderung (Wingerchuk et al. 2007b). Dies lässt vermuten, dass Axondestruktion bei NMO früher als bei MS einsetzt. Außerdem wird angenommen, dass axonale Schädigung bei NMO schwerer ist als bei MS (Miyazawa et al. 2007; Fujihara 2006).

In der Literatur sind meines Wissens bislang keine Studien zum Zeitverlauf, Ausmaß und Mechanismus axonaler Schädigung bei humaner NMO publiziert worden.

Die vorliegende Arbeit konnte folgende Ergebnisse erheben:

- (I) Sie zeigt, dass axonale Schädigung bei NMO-Patienten genauso wie bei unserem NMO-Tiermodell früh und stark ausgeprägt ist.
- (II) Im Verlauf der Läsionsentwicklung nimmt das Ausmaß des Axonschadens sowohl bei NMO als auch bei MS ab, sodass in den drei von mir für NMO und MS untersuchten Demyelinisierungsstadien jeweils ein signifikant unterschiedliches Ausmaß an akuter Axonschädigung zu verzeichnen ist.
- (III) Es konnte zudem kein Unterschied zwischen dem Grad des Axonschadens in einander entsprechenden Läsionsstadien humaner NMO und humaner MS festgestellt werden.

4.2.1 Frühe Axonschädigung bei NMO (I)

Es ist seit Längerem gut bekannt, dass in chronischen MS-Läsionen Axonverlust vorliegt, aber ob dies ein Phänomen akuter oder chronischer Läsionen ist, war bis vor einiger Zeit fraglich. Mit der Anwendung neuer neuropathologischer und bildgebender Techniken (Immunhistochemie mit Antikörpern gegen APP; MRT) konnte festgestellt werden, dass akute Axonschädigung bereits in frühen MS-Läsionen auftritt (Ferguson et al. 1997; Perry und Anthony 1999). Die eindeutige Abgrenzung der NMO von der MS und der Beweis für die eigenständige Krankheitsentität der NMO kam erst einige Jahre danach: 2005 mit der Entdeckung der Anti-AQP4-Antikörper. Das Ausmaß axonaler Schädigung in NMO-Läsionen wurde bislang noch nicht quantifiziert. Es liegt nahe, dass auch bei der NMO eine frühe akute Axonschädigung vorliegt. Dies konnte durch unsere Arbeit gezeigt werden und ist in Übereinstimmung mit anderen Studien zur NMO. So beschrieben Misu et al. 2013 sechs verschiedene Subtypen von aktiven NMO-Läsionen, von denen sich ein Subtyp durch läsionsbezogene Wallersche Degeneration der Axone auszeichnete. In sehr frühen entzündlichen NMO-Läsionen ist dagegen ein Myelin- und Axonerhalt beschrieben worden. Dies könnte beispielsweise dadurch erklärt werden, dass diese Läsionen so früh waren, dass die parenchymalen Astrozyten zwar einen AQP4-Verlust zeigten, jedoch noch in den Läsionen vorhanden waren. Wie in dieser Arbeit bereits dargestellt wurde, muss angenommen werden, dass der Astrozytenverlust u. a. durch die Glutamatergische Toxizität ein wesentlicher Faktor für die axonale Schädigung ist. Mit den bei Misu et al. beschriebenen noch erhaltenen Astrozyten sind folglich auch die Axone noch intakt.

Auch das klinische Bild der NMO ist mit einer früh auftretenden Axonschädigung vereinbar, denn im Gegensatz zur MS besteht bei der NMO bereits nach dem ersten Schub ein hohes Risiko für eine dauerhafte klinische Behinderung (Wingerchuk et al. 2007b). Dies kann auf eine mangelhafte Kompensation der schubförmigen Inflammation, aber auch auf eine besonders starke Axonpathologie im frühen Stadium der NMO hinweisen.

Zudem konnten Saadoun et al. 2010 im Tiermodell zeigen, dass die Injektion von humanem NMO-IgG und Komplement bereits nach 12 h NMO-typische Läsionen entstehen ließ, welche u. a. von einer starken Axonschädigung betroffen waren.

Die Hinweise in der Literatur, dass akute Axonschädigung ein früh auftretendes Phänomen in humaner NMO ist, decken sich sehr gut mit den tierexperimentellen Ergebnissen dieser Arbeit. Auch diese lassen erkennen, dass axonale Schädigung ein histopathologisches Kennzeichen früher Läsionsstadien ist.

Eine mögliche Erklärung für die frühe Axonschädigung liegt in der AQP4-IgG-vermittelten Astrozytendestruktion, welche in sehr frühen Stadien der Pathogenese beginnt. Es kommt durch die fehlenden astrozytären Funktionen schnell zur Akkumulation großer Mengen an Neurotransmittern wie Glutamat und ATP. Diese wirken in den hohen Konzentrationen toxisch auf Axone und Oligodendrozyten. So kommt es bereits früh zu Axonschädigung und -verlust.

Das Wissen um eine frühe Axonschädigung ist insofern von sehr großer Bedeutung, dass die Axonpathologie das stärkste histopathologische Korrelat chronischer neurologischer Behinderung darstellt (Losseff et al. 1996; Bjartmar et al. 2000). Daher ist es besonders wichtig, früh therapeutisch zu intervenieren, möglichst bevor die Axonschädigung das maximale Ausmaß erreicht hat. Die therapeutischen Verfahren sollten in die pathogenetischen Mechanismen eingreifen. Dies ist zum Beispiel bei der Verwendung von Glutamat- oder P2X7-Rezeptorantagonisten der Fall, da hohe Konzentrationen an Glutamat und ATP bereits im frühen Krankheitsstadium zur exzitotoxischen Schädigung der Axone führen können.

4.2.2 Verlauf der Axonschädigung in humaner NMO und MS (II)

Die zeitliche Entwicklung axonaler Schädigung ist in der MS bereits untersucht worden und stimmt mit den Daten dieser Arbeit überein. Pathologischen Studien zufolge ist akute axonale Schädigung in MS-Läsionen in frühen Läsions- und Krankheitsstadien am ausgeprägtesten und

nimmt über die Zeit ab (Kuhlmann et al. 2002). Chronisch-aktive Läsionen manifestieren einen erheblichen Axonverlust mit einer Reduktion der axonalen Dichte von bis zu 70 %. Dies wird als Folge der früh einsetzenden und anhaltenden Axonverletzung gedeutet (Bjartmar et al. 2000). Inaktive Läsionen dagegen lassen eine geringere Axonschädigung erkennen (Kornek et al. 2000).

Der zeitliche Verlauf der akuten Axonpathologie in humaner NMO ist dagegen bisher noch nicht quantifiziert worden. Dass auch er analog zur MS mit fortschreitender Läsionsentwicklung abnimmt, ist in Übereinstimmung mit dem klinischen Verlauf der NMO. Die Dauer der meisten NMO-Schübe liegt bei einigen Tagen. Nachdem die maximale klinische Beeinträchtigung erreicht wurde, findet innerhalb der folgenden Wochen und Monaten eine zumeist inkomplette Remission statt (Wingerchuk et al. 1999; Wingerchuk et al. 2003; Wingerchuk et al. 2007a). Ein sekundär progredienter Verlauf der NMO ist sehr selten (Wingerchuk et al. 2007b). Dies ist gut vereinbar mit der Beobachtung, dass die akute Axonschädigung mit abnehmender Läsionsaktivität zurückgeht. Dafür wird ein immer stärkerer Axonverlust beobachtet.

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass die inaktiven mikroglialen NMO-Läsionen, die eine sehr geringe Dichte an akut geschädigten Axonen aufweisen, sehr selten bei NMO-Patienten zu finden sind. Dies ist auch der Grund für geringe Stichprobengröße dieser Läsionsgruppe in der vorliegenden Arbeit. Bei der MS dagegen sind inaktive Läsionen deutlich häufiger. Es bleibt durch weiterführende Experimente die Frage zu beantworten, ob es wirklich weniger mikrogliale inaktive Läsionen und damit weniger Läsionen mit geringer akuter Axonschädigung in der NMO als inaktive Läsionen in der MS gibt, die ja ebenfalls nur sehr wenig akute Axonpathologie aufweisen. Diese Beobachtung, dass das inaktive mikrogliale Stadium der NMO selten vorkommt und damit die Stadien mit starker akuter Axonschädigung die Regel sind, könnte erklären, warum sich trotz vergleichbarer geringer akuter Axonschädigung in diesen beiden inaktiven Läsionsstadien beider Erkrankungen der klinische Verlauf der NMO schwerer darstellt.

4.2.3 Vergleich der Axonschädigung in humaner NMO und MS (III)

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied zwischen dem Grad des Axonschadens in einander entsprechenden histologischen Stadien humaner NMO und humaner MS festgestellt werden.

Dies erscheint zunächst erstaunlich, denn in der Literatur wurde die begründete Hypothese aufgestellt, die Axonschädigung bei NMO sei stärker als bei MS (Miyazawa et al. 2007; Fujihara 2006). Auch der klinische Verlauf der beiden Erkrankungen scheint darauf hinzuweisen: Nach dem ersten Schub ist das Risiko, eine dauerhafte klinische Beeinträchtigung davonzutragen, wesentlich höher als bei MS (Wingerchuk et al. 2007a). Dies könnte vermuten lassen, dass bei NMO in frühen Krankheitsstadien ein stärkerer Axonschaden vorliegt als bei vergleichbaren Stadien der MS. Dem zugrunde liegen könnten entweder eine stärker ausgeprägte initiale Schädigung der Axone oder eingeschränkte Reparaturmechanismen der Axonschädigung. Auch die Prognose bei NMO ist schlechter als bei MS, da sich bei der NMO der klinische Verlauf schneller verschlechtert (Marignier und Confavreux 2010). Da die axonale Schädigung als Korrelat der Krankheitsprogression bei NMO und MS gilt (Wang et al. 2013), scheint auch der schwerere klinische Verlauf der NMO auf eine stärkerer akute Axonpathologie bei NMO hinzuweisen. Außerdem ist ein wesentlicher Mechanismus der Axonschädigung bei MS die Demyelinisierung der Axone, welche in MS primär abläuft. Bei NMO dagegen ist Demyelinisierung sekundär als Folge der Astrozytendepletion zu beobachten (Takai et al. 2013). Damit sind bei der NMO zumindest zum Teil andere Mechanismen der Axondestruktion wirksam als bei der MS, was ebenfalls einen unterschiedlichen Zeitverlauf der Axonschädigung in den beiden Erkrankungen nahelegen könnte.

Zum anderen gibt es dennoch viele mögliche Ursachen für das im zeitlichen Verlauf ähnliche Ausmaß an Axondestruktion bei NMO und MS.

Was die Mechanismen der Axonschädigung in NMO und MS betrifft, ist zwar die Ätiologie der Demyelinisierung nicht gleich, aber es gibt auch gemeinsame pathogenetische Mechanismen. So wird z. B. für beide Krankheitsentitäten ein wesentlicher Einfluss der Glutamatexzitotoxizität angenommen (Pitt et al. 2000; Jacob 2009). Zudem wurden Mechanismen und Ursachen der axonalen Pathologie in NMO bisher noch nicht intensiv untersucht. Daher kann auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es gemeinsame Ursachen oder Wegstrecken bei der Entstehung der Axonschädigung gibt. Weitere Untersuchungen sollten vorgenommen werden, um die Mechanismen axonaler Degeneration in der NMO zu erforschen und die Frage zu beantworten, ob eine identische Endstrecke bei der Axonschädigung in NMO und MS z. B. als Folge der Demyelinisierung vorliegt.

Die oben genannte Evidenz in der Literatur für eine schwerere Axonschädigung bei NMO als bei MS wurde u. a. aus der Beobachtung abgeleitet, dass das Neurofilament-Heavy-Chain-Protein (NF-H), ein Biomarker für axonale Schädigung, im Liquor von 25 % der in der Studie untersuchten NMO-Patienten einen signifikant höheren Spiegel aufwies als im Liquor aller MS-Patienten (Miyazawa et al. 2007; Fujihara 2006). Allerdings stehen diese Daten im Gegensatz zu einer neueren Studie. Diese zeigte, dass bei einer Teilmenge an MS-Patienten mit einem ersten Demyelinisierungsereignis ein hoher Titer an phosphoryliertem Neurofilament-Heavy-Chain-Protein im Serum vorlag (Gresle et al. 2014). Der erhöhte Titer korrelierte zudem positiv mit der Schwere der Erkrankung. Die Studie ergab auch, dass der Titer über die Zeit fluktuieren kann, da er die zeitliche Dynamik axonaler Pathologie in den Erkrankungen widerspiegeln. Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung für die Ergebnisse von Miyazawa et al. und Fujikara et al., die zu der Schlussfolgerung führten, Axonschädigungen in NMO seien gravierender als in MS.

Dennoch muss einschränkend gesagt werden, dass obige Aussagen aus Analysen mit einer relativ geringen Stichprobengröße gewonnen wurden, welche durch die geringe Inzidenz der Erkrankung bedingt ist. Empfehlenswert wären Analysen der Axonpathologie von NMO- und MS-Läsionen, insbesondere der inaktiven Demyelinisierungsstadien, mit einer größeren Anzahl an Gewebeproben.

4.2.4 Zusammenfassung: Axonpathologie in humaner NMO und MS

Zusammenfassend liegen sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten in der Pathogenese der Axonschädigung bei NMO und MS vor.

Die pathogenetischen Gemeinsamkeiten, wie z. B. die axonschädigende Glutamatergische Zytotoxizität, können die frühe und zeitlich ähnlich verlaufende axonale Schädigung bei beiden Erkrankungen erklären. Zum anderen gibt es auch pathogenetische Unterschiede in der Axonpathologie in MS und NMO, wie die primäre bzw. sekundäre Entstehung der Demyelinisierung nahelegt. Das könnte z. B. eine Erklärung für die Unterschiede zwischen dem klinischen Verlauf beider Krankheitsbilder darstellen, der ja mit der Axonschädigung korreliert: Die schlechte Prognose und rasche Krankheitsprogression bei der NMO, aber auch das Phänomen, dass die Hauptursache für eine dauerhafte Behinderung bei der NMO in der Akkumulation einmal entstandener neurologischer Ausfälle liegt. Bei der MS hingegen gelten die permanenten

Funktionseinschränkungen als Folgen des später auftretenden sekundär progredienten Verlaufs (Wingerchuk et al. 1999; Wingerchuk und Weinshenker 2003; Wingerchuk et al. 2007a; Wingerchuk et al. 2007b).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmals der Zeitverlauf axonaler Schädigung sowie die Wirkung glutamaterger und purinerger Rezeptorantagonisten auf die akute Axonpathologie im fokalen NMO-Modell untersucht. Zudem wurde die akute Axondestruktion in den verschiedenen Aktivitätsstadien humaner NMO- und MS-Läsionen quantifiziert und verglichen.

Insgesamt weisen sowohl die tierexperimentellen als auch die humanen Daten auf eine früh beginnende Axonschädigung bei NMO hin, welche den in der Literatur geforderten frühen optimalen und aggressiven Therapiebeginn bei dieser Erkrankung unterstreichen.

Eine solche Therapie wäre z. B. mit NMDA-, AMPA/Kainat- und P2X7-Rezeptorantagonisten denkbar, welche in unserem fokalen NMO-Modell eine signifikante Reduktion der parenchymalen Axonschädigung zeigten. Insbesondere die systemische Applikationsform führte zu einer starken Reduktion der perivaskulären Axonschädigung in der grauen Substanz. Insgesamt stützen diese Ergebnisse das pathogenetische Konzept von Glutamat- und ATP-Exzitotoxizität bei NMO.

Wir konnten außerdem zeigen, dass es im Verlauf der Erkrankung bei humaner NMO genau wie bei MS mit abnehmender Läsionsaktivität zu einer Reduktion der akuten Axonschädigung kommt. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Axonschädigung der einander entsprechenden Aktivitätsstadien von NMO und MS stellte sich nicht dar.

Weitere Studien sollten den Effekt purinerger und glutamaterger Rezeptorantagonisten auf die Axonschädigung in weiteren NMO-Modellen und mit größeren Stichproben untersuchen sowie den optimalen Applikationszeitpunkt und das klinische Korrelat der Therapiemethode. Insgesamt könnte diese Arbeit die Basis für die Entwicklung einer neuen pharmakologischen Behandlungsmöglichkeit der NMO darstellen.

6 Anhang

Verwendete Lösungen und Reagenzien für die Gewebeasservation

Chloralhydrat 14 % in NaCl

Isopropanol (50 %, 70 %, 90 %, 100 %)

Glutaraldehyd 2,5 % (PBS)

Osmiumtetroxid 1 %

Paraffin

PBS

PFA 4 %

- 40 g PFA in 500 ml Aqua bidest. lösen, auf 60 °C erhitzen
- 1 M NaOH bis zur Auflösung der Trübung hinzugeben
- 100 ml PBS zugeben
- 400 ml H₂O bidest. zugeben

Xylol

Verwendete Materialien für die lichtmikroskopischen Präparate

PBS:

PBS (Dulbecco, Biochrom AG) 9,55 g

destilliertes Wasser 1000 ml

1 M Schwefelsäure:

96 % Schwefelsäure (Merck) 51,1 ml

destilliertes Wasser 448,9 ml

4 % PFA:

PFA (Merck, Deutschland) 40 g

1.0 M Natriumhydroxid 1 Tropfen

10-fach PBS 100 ml

destilliertes Wasser 900 ml

auf pH 7,3 einstellen

0.05 % Triton enthaltende PBS (PBST):

PBS 1000 ml

Triton X-100 (MP Biomedicals) 500 µl

HE-Färbung:

1 % Säurespülung:

30 % Salzsäure 2 ml

100 % Isopropylalkohol (Merck) 198 ml

1 % Eosin-Lösung:

Eosin-G Certistain© (Merck) 2 ml

70 % Isopropylalkohol 198 ml

(Filtern vor Benutzung)

LFB/PAS-Färbung:

LFB-Lösung:

1 g LFB wurde in 1000 ml 96%igem Alkohol gelöst und über Nacht bei 57 °C in den Wärmeschrank gestellt.

Lithiumkarbonat-Lösung:

0,5 g Lithiumkarbonat wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

Perjodsäure

Schiff-Reagenz

Salzsäure-Alkohol-Lösung:

0,25 ml rauchende Salzsäure wurden in 100 ml 70%iges Ethanol gegeben.

Bielschowsky-Silber-Färbung:

20 % Silbernitratlösung:

Silbernitrate (Roth) 10 g

destilliertes Wasser 50 ml

Entwicklerlösung:

37 % Formalin (Merck) 20 ml

Citronensäure (Merck) 0,5 g

65 % Salpetersäure (Merck), zwei Tropfen

destilliertes Wasser 100 ml

2 % Natriumthiosulfat:

Natriumthiosulfat Pentahydrat 10 g

destilliertes Wasser 500 ml

Immunohistochemie:

10 mM Citronensäurepuffer:

Citronensäure (Merck) 2,1 g

destilliertes Wasser 1000 ml

auf pH 6 einstellen

H₂O₂-Lösung:

Für die Blockade der endogenen Peroxidase wurden 5 ml 30%iges H₂O₂ in 45 ml PBS gelöst.

tris ethyldiamintetraacetic acid buffered saline:

Trizma-Base (Sigma) 1,21 g

0,1 M EDTA 1 ml

destilliertes Wasser 1000 ml

auf pH 9 einstellen

0.2 % casein block:

Tropix (Applied Biosystems) 2 g

PBS 1000 ml

Tween 20 1 ml

Tropix/PBS auf 50 °C erhitzen, bis es sich auflöst

1,0 M Tris/HCl Stammlösung:

Trizma-Base (Sigma) 121 g

30 % Salzsäure 400 ml

Natriumchlorid (Merck) 170 g

destilliertes Wasser auffüllen bis 1000 ml

auf pH 7,5 einstellen

TBS-Arbeitslösung (Waschpuffer für die Immunohistochemie):

Natriumchlorid (Merck) 9 g

1.0M Tris/HCl 50 ml

auf pH 7,5 einstellen

Fast-Blue-Arbeitslösung:

0,1 M Tris (pH 8,2) 49 ml

Naphtol-ASMX-Phosphat (Sigma) 1 ml

1,0 M Levimasol (Sigma) 50 µl

Fast-Red-TR-Salz (Sigma) 0,025 g

Filtern vor der Anwendung

Fast-Red-Arbeitslösung:

0,1 M Tris (pH 8,2) 49 ml

Naphtol-ASMX-Phosphat (Sigma) 1 ml

1,0 M Levimasol (Sigma) 50 µl

Fast Red TR-Salz (Sigma) 0,05 g

Filtern vor der Anwendung

DAB-Arbeitslösung:

DAB 25 mg

PBS 50 ml

30 % Hydrogenperoxidase (Merck) 30 µl

1 % Nickelammoniumsulfat-Lösung:

Nickelammoniumsulfat 0,1 g

destilliertes Wasser 10 ml

Hersteller der Chemikalien und Reagenzien

Essigsäure Merck KgaA, Darmstadt, Germany

Ammoniumchlorid Pharm Lyse, 10x conc., BD Biosciences, Heidelberg, Germany

Ammoniumhydroxide Merck KgaA, Darmstadt, Germany

brilliant blue G Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

Citronensäure Merck KgaA, Darmstadt, Germany

Chloralhydrat Merck KgaA, Darmstadt, Germany

DAB Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

D-AP5 Tocris bioscience, Biozol, Eching, Germany

DePeX VWR international, Darmstadt, Germany

Diethyläther Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

EDTA Roth, Karlsruhe, Germany

Eosin-G CertiStain Merck KgaA, Darmstadt, Germany

EtOH absolute Merck KgaA, Darmstadt, Germany

Formalin Merck KgaA, Darmstadt, Germany

Glutaraldehyd 2,5 % (PBS), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

H2O2 Merck KgaA, Darmstadt, Germany

HBSS Gibco, Karlsruhe, Germany

Isopropanol Merck KgaA, Darmstadt, Germany

Kupfersulfat Merck KgaA, Darmstadt, Germany

LFB BDH Laboratory supplies, VWR Int. Ltd., Poole, UK

Lithiumcarbonat Merck KgaA, Darmstadt, Germany

Nickelammoniumsulfat Merck KgaA, Darmstadt, Germany

Mayer's Hämalun Merck KgaA, Darmstadt, Germany

May-Grünwald -Lösung Merck KgaA, Darmstadt, Germany

Methanol Merck KgaA, Darmstadt, Germany

MK-801 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

Monastral-Blue-Kupfer(II)-phthalocyanintetrasulfonsäure-tetranatrium-Salz, Sigma-Aldrich
Chemie GmbH, Steinheim, Germany

NaCl Merck KGaA, Darmstadt, Germany

0,9 % NaCl Lösung B. Braun, Germany

Naphtylethylen Merck KGaA, Darmstadt, Germany

oATP Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

Paraffin, Paraplast Plus, Tyco Healthcare GmbH, Neustadt a.d. Donau

PBS, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

PFA 4 %, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Xylol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Hersteller der Geräte und Apparaturen

Analysis™ software, University of Wisconsin, Madison, WI

Zytospin-Zentrifuge Shandon Cytospin 4, Thermo Scientific, Dreieich, Germany

Objektträger Menzel, Braunschweig, Germany

Glasskapillaren B. Braun, Germany

GraphPad Software, San Diego, CA, USA

Inkubator Cellstar, Nunc GmbH, Wiesbaden, Germany

(Licht-)Mikroskop, BX41, Olympus, Europa GmbH, Hamburg, Germany

Mikrotom Leica, Wetzlar, Germany

Mikrowelle Bosch, Gerlingen-Schillerhohe, Germany

Neubauer (Zählkammer) Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Germany

Stereotaktie-Einrichtung Stoelting Co, IL, USA

Gewebeprozessor TP 1020, Leica, Wetzlar, Germany

7 Literaturverzeichnis

- Alloisio S, Cervetto C, Passalacqua M, Barbieri R, Maura G, Nobile M, Marcoli M (2008): Functional evidence for presynaptic P2X7 receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals. *FEBS Lett* 582, 3948–3953
- Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP (2003): The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4, 991-1001
- Anrather J, Gallo EF, Kawano T, Orio M, Abe T, Gooden C, Zhou P, Iadecola C (2011): Purinergic signaling induces cyclooxygenase-1-dependent prostanoid synthesis in microglia: roles in the outcome of excitotoxic brain injury. *PLoS One* 10, e25916
- Anthony DC, Miller KM, Fearn S, Townsend MJ, Opdenakker G, Wells GM, Clements JM, Chandler S, Gearing AJ, Perry VH (1998): Matrix metalloproteinase expression in an experimentally-induced DTH model of multiple sclerosis in the rat CNS. *J Neuroimmunol* 87, 62–72
- Anthony DC, Hughes P, Perry VH (2000): The evidence for primary axonal loss in multiple sclerosis. *Rev Neurol* 30, 1203–1208
- Arbeloa J, Perez-Samartin A, Gottlieb M, Matute C (2012): P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis* 45, 954–961
- Ascherio A, Munger K (2010): Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 271–277
- Bakker J, Metz L (2004): Devic's neuromyelitis optica treated with intravenous gamma globulin (IVIg). *Can J Neurol Sci* 31, 265–267
- Balcer LJ (2006): Clinical practice. Optic neuritis. *N Engl J Med* 354, 1273-1280
- Bergamaschi R, Uggetti C, Tonietti S (2003): A case of relapsing neuromyelitis optica treated with glatiramer acetate. *J Neurol* 250, 359-361
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A (2004): Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7, 613–620
- Bielschowsky M (1903): Die Silberimprägnation der Neurofibrillen. *Neurol Zentralbl* 21, 997-1006
- Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972): Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43, 429-435
- Bitsch A, da Costa C, Bunkowski S, Weber F, Rieckmann P, Brück W (1997): Identification of macrophage populations expressing tumor necrosis factor- α mRNA in acute multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 95, 373–377
- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123, 1174–1183

-
- Bjartmar C, Trapp BD (2001): Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 14, 271–278
- Bjartmar C, Trapp BD (2003): Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis. *Neurotox Res* 5, 157–164
- Bjartmar C, Kidd G, Mork S, Rudick R, Trapp BD (2000): Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 48, 893–901
- Bjartmar C, Kinkel RP, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD (2001): Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology* 57, 1248–1252
- Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD (2003): Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 206, 165–171
- Bonnet F, Mercie P, Morlat P (1999): Devic's neuromyelitis optica during pregnancy in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 8, 244–247
- Bottelbergs A, Verheijden S, Hulshagen L, Gutmann DH, Goebbels S, Nave KA, Kassmann C, Baes M (2010): Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes. *Glia* 58, 1532–1543
- Brassat D (2012): When does multiple sclerosis start? Three case reports and a review of the literature. *Rev Neurol* 168, 846–851
- Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH (2017): Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet* 389, 1336–1346
- Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38, 788–796
- Brück W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA, Lassmann H (1996): Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology* 195, 588–600
- Brück W, Popescu B, Lucchinetti CF, Markovic-Plese S, Gold R, Thal DR, Metz I (2012): Neuromyelitis optica lesions may inform multiple sclerosis heterogeneity debate. *Ann Neurol* 72, 385–394
- Bukhari W, Barnett MH, Prain K, Broadley SA (2012): Molecular Pathogenesis of Neuromyelitis Optica. *Int J Mol Sci* 13, 12970–12993
- Campbell DS, Okamoto H (2013): Local caspase activation interacts with Slit-Robo signaling to restrict axonal arborization. *J Cell Biol* 203, 657–672
- Charcot JM (1868): Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hop civ mil Empire Ottoman* 140, 554–555 and 141, 557–558 and 143, 556
- Chiquete E, Navarro-Bonnet J, Ayala-Armas R, Gutiérrez-Gutiérrez N, Solórzano-Meléndez A, Rodríguez-Tapia D, Gómez-Rincón M, Ruiz-Sandoval JL (2010): Neuromyelitis optica: a clinical update. *Rev Neurol* 51, 289–294

-
- Compston A (1988): The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51, 1249–1252
- Compston A (1999): Provision of treatment for Multiple Sclerosis. *Lancet* 353, 1710-1711
- Compston A (2004): Mechanisms of axon-glia injury of the optic nerve. *Eye (Lond)* 18, 1182–1187
- Cordonnier C, de Seze J, Breteau G, Ferriby D, Michelin E, Stojkovic T (2003): Prospective study of patients presenting with acute partial transverse myelopathy. *J Neurol* 250, 1447-1452
- Cottrell DA, Kremenchutzky M, Rice GP, Koopman WJ, Hader W, Baskerville J, Ebers GC (1999): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 122, 625-639
- Criste G, Trapp B, Dutta R (2014): Axonal loss in multiple sclerosis: causes and mechanisms. *Handb Clin Neurol* 122, 101–113
- Cruveilhier J: Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. Bailliere, Paris 1835
- Davie CA, Barker GJ, Webb S, Tofts PS, Thompson AJ, Harding AE, McDonald WI, Miller DH (1995): Persistent functional deficit in multiple sclerosis and autosomal dominant cerebellar ataxia is associated with axon loss. *Brain* 118, 1583–1592
- De Seze J, Stojkovic T, Ferriby D, Gauvrit JY, Montagne C, Mounier-Vehier F (2002): Devic's neuromyelitis optica: clinical, laboratory, MRI and outcome profile. *J Neurol Sci* 197, 57-61
- De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, Antel JP, Arnold DL (1998): Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 121, 1469–1477
- De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnautelis R, Tartaglia MC, Antel JP, Matthews PM, Arnold DL (2001): Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 58, 65–70
- De Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, 't Hart BA et al. (2002): Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169, 5415-5423
- Diaz-Hernandez M, del Puerto A, Diaz-Hernandez JI, Diez-Zaera M, Lucas JJ, Garrido JJ, Miras-Portugal MT (2008): Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 121, 3717–3728
- Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C (2010): P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia* 58, 730–740
- Dutta R, Trapp B (2007): Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology* 68, 22-31

-
- Dyment D, Ebers G, Sadovnick A (2004): Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3, 104–110
- Dzamba D, Honsa P, Valny M, Kriska J, Valihrach L, Novosadova V, Kubista M, Anderova M (2015): Quantitative Analysis of Glutamate Receptors in Glial Cells from the Cortex of GFAP/EGFP Mice Following Ischemic Injury: Focus on NMDA Receptors. *Cell Mol Neurobiol* 8, 1187–1202
- Ebers G (2008): Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7, 268–277
- Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM (2000): Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis. *Brain* 123, 1845–1849
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997): Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120, 393–399
- Filley CM, Sternberg PE, Norenberg MD (1984): Neuromyelitis optica in the elderly. *Arch Neurol* 41, 670–672
- Franke H, Illes P (2014): Nucleotide signaling in astrogliosis. *Neurosci Lett* 565, 14–22
- Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Zettl U, Rieckmann P (2008): Multiple-Sklerose-Register in Deutschland: Ausweitung des Projektes 2005/2006. *Dtsch Arztebl* 105, 113–119
- 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
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006): Multiple sclerosis - the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354, 942–955
- Fuente-Martin E, Garcia-Caceres C, Morselli E, Clegg DJ, Chowen JA, Finan B, Brinton RD, Tschop MH (2013): Estrogen, astrocytes and the neuroendocrine control of metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 14, 331–338
- Fujihara K (2006): Laboratory findings in optic-spinal multiple sclerosis. *Rinsho Shinkeigaku* 46, 866–868
- Gard AL, Burrell MR, Pfeiffer SE, Rudge JS, Williams, WC 2nd (1995): Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF and leukemia inhibitory factor-like protein. *Development* 121, 2187–2197
- Gartzen K, Limmroth V, Putzki N (2007): Relapsing neuromyelitis optica responsive to glatiramer acetate treatment. *Eur J Neurol* 14, e12-e13
- Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW (1993): Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 160, 139–144
- Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, Couillin I, Catros V, Boichot E, Lagente V (2014): Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41, 279–286

-
- Gimsa U, Peter SV, Lehmann K, Bechmann I, Nitsch R (2000): Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells. *Brain Pathol* 10, 365–377
- Giovannoni G, Cutter G, Lunemann J, Martin R, Munz C, Sriram S (2006): Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 5, 887–894
- Goebeler M, Roth J, Henseleit U, Sunderkotter C, Sorg C (1993): Expression and complex assembly of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 during differentiation of murine myelomonocytic cells. *J Leukoc Biol* 1, 11–18
- Graber DJ, Levy M, Kerr D, Wade WF (2008): Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4. *J Neuroinflammation* 5, 22
- Gresle MM, Liu Y, Dagley LF, Haartsen J, Pearson F, Purcell AW, Laverick L, Petzold A, Lucas RM, Van der Walt A et al. (2014): Serum phosphorylated neurofilament-heavy chain levels in multiple sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 11, 1209-1213
- Hacke W (Hrsg.): *Neurologie*. 14. Auflage; Springer, Heidelberg 2015
- Hafler D (2004): Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 113, 788–794
- Hao C, Zhou Y, Wang J, Peng M, Xie Y, Kang W, Sun L, Wang P, Wan C, He L et al. (2014): Role of NogoA in the regulation of hepatocellular carcinoma SMMC7721 cell apoptosis. *Mol Med Rep* 2, 1743–1748
- Harris ZM, Sloane JA: Mechanisms and Patterns of Axonal Loss in Multiple Sclerosis. In: Martins LM, Loh S (Hrsg.): *Neurodegeneration*. InTech 2012, <https://doi.org/10.5772/35703>
- Hasan MT, Hernández-González S, Dogbevia G, Treviño M, Bertocchi I, Gruart A, Delgado-García JM (2013): Role of motor cortex NMDA receptors in learning-dependent synaptic plasticity of behaving mice. *Nat Commun* 4, 2258
- Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2002): New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3, 291-301
- Henze T (2004): Symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 30, 393-400
- Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N (1993): MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol* 53, 197-204
- Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C (1993): Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40, 319-384
- Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, Howe CL, Pittock SJ, Lennon VA (2008): Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med* 205, 2473-2481
- Hinson SR, McKeon A, Lennon VA (2010): Neurological autoimmunity targeting aquaporin-4. *Neuroscience* 168, 1009–1018

-
- Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG (1997): The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 72, 871-878
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H (2000): The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 107, 161-166
- Horakova D, Dwyer MG, Havrdova E, Cox JL, Dolezal O, Bergsland N, Rimes B, Seidl Z, Vaneckova M, Zivadinov R (2009): Gray matter atrophy and disability progression in patients with early relapsing–remitting multiple sclerosis: a 5-year longitudinal study. *J Neurol Sci* 282, 112–119
- Huijbregts S, Kalkers N, Sonnevile L de, Groot V de, Polman C (2006): Cognitive impairment and decline in different MS subtypes. *J Neurol Sci* 245, 187–194
- Huynh JL, Casaccia P (2013): Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment. *Lancet Neurol* 12, 195-206
- Ito H, Yamasaki K, Kawano Y, Horiuchi A, Yun C, Nishimura Y, Kira J (1998): HLA-DP-associated susceptibility to the optico-spinal form of multiple sclerosis in the Japanese. *Tissue Antigens* 52, 179–182
- Jacob A (2009): Neuromyelitis optica - an update: 2007-2009. *Ann Indian Acad Neurol* 12, 231
- Jarius S, Wildemann B (2010): AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol* 6, 383–392
- Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P (2008): Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 131, 3072–3080
- Jeffery AR, Buncic JR (1996): Pediatric Devic’s neuromyelitis optica. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 33, 223–229
- Kakalacheva K, Lünemann JD (2011): Environmental triggers of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585, 3724–3729
- Kalman B, Lublin F (1999): The genetics of multiple sclerosis. A review. *Biomed Pharmacother* 53, 358–370
- Karadottir R, Cavalier P, Bergersen LH, Attwell D (2005): NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438, 1162–1166
- Keegan B, Noseworthy J (2002): Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53, 285–302
- Kehoe LA, Bernardinelli Y, Muller D (2013): GluN3A: an NMDA receptor subunit with exquisite properties and functions. *Neural Plast* 10, 1155
- Kesselring J (2013): Therapies in multiple sclerosis. *Praxis* 102, 1061–1067
- Kira J (2003): Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol* 2, 117–127
- Kira JI, Kanai T, Nishimura Y, Yamasaki K, Matsushita S, Kawano Y, Hasuo K, Tobimatsu S, Kobayashi T (1996): Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol* 40, 569-574

-
- Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL (1990): Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1561–1565
- Koopmans RA, Li DK, Grochowski E, Cutler PJ, Paty DW (1989): Benign versus chronic progressive multiple sclerosis: magnetic resonance imaging features. *Ann Neurol* 25, 74-81
- Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Lington C, Schmidbauer M, Lassmann H (2000): Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 157, 267–276
- Kornek B, Storch MK, Bauer J, Djamshidian A, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Zimprich F, Olsson T, Lington C et al. (2001): Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124, 1114–1124
- Kowarik MC, Soltys J, Bennett JL (2014): The treatment of neuromyelitis optica. *J Neuroophthalmol* 34, 70–82
- Kuhlmann T, Brück W (2000): Some aspects of histopathology in multiple sclerosis. *Rev Neurol* 30, 1208-1212
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck 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, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W (2008): Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131, 1749–1758
- Kuhn B, Ozden I, Lampi Y, Hasan MT, Wang SS (2012): An amplified promoter system for targeted expression of calcium indicator proteins in the cerebellar cortex. *Front Neural Circuits* 6, 49
- Kukley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D (2007): Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 10, 311-320
- Kvistad SA, Wergeland S, Torkildsen Ø, Myhr KM, Vedeler CA (2013): Neuromyelitis optica. *Tidsskr Nor Lægeforen* 133, 2057-2061
- Lana-Peixoto MA, Callegaro D (2012): The expanded spectrum of neuromyelitis optica: evidences for a new definition. *Arq Neuropsiquiatr* 70, 807-813
- Lassmann H (2003): Hypoxia-like tissue injury as a component of multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 206, 187–191
- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 115–121
- Lassmann H, Reindl M, Rauschka H, Berger J, Aboul-Enein F, Berger T, Zurbriggen A, Lutterotti A, Bruck W, Weber JR (2003): A new paraclinical CSF marker for hypoxia-like tissue damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 126, 1347–1357

-
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995): Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15, 1835–1853
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K (2004): A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364, 2106–2112
- 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
- Li H, Cuzner ML, Newcombe J (1996): Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22, 207-215
- Lightman S, McDonald W, Bird A, Francis D, Hoskins A, Batchelor J, Halliday A (1987): Retinal venous sheathing in optic neuritis. Its significance for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain* 110, 405–414
- Lim ET, Sellebjerg F, Jensen CV, Altmann DR, Grant D, Keir G, Thompson EJ, Giovannoni G (2005): Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 11, 532–536
- Liu F, Chen T, Chen R (2012): Mechanisms of ketamine-induced immunosuppression. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 50, 172–177
- Liu YP, Yang CS, Chen MC, Sun SH, Tzeng SF (2010): Ca²⁺-dependent reduction of glutamate aspartate transporter GLAST expression in astrocytes by P2X₇ receptor-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling. *J Neurochem* 113, 213-227
- LoPachin RM, Lehning EJ (1997): Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol* 143, 233–244
- Losseff NA, Wang L, Lai HM, Yoo DS, Gawne-Cain ML, McDonald WI, Miller DH, Thompson AJ (1996): Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis. A serial MRI study. *Brain* 119, 2009-2019
- Lovera JF, Frohman E, Brown TR, Bandari D, Nguyen L, Yadav V, Stuve O, Karman J, Bogardus K, Heimburger G et al. (2010): Memantine for cognitive impairment in multiple sclerosis: a randomized placebo-controlled trial. *Mult Scler* 16, 715-723
- Lubetzki C, Stankoff B (2014): Demyelination in multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 122, 89–99
- Lublin FD (2014): New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol* 72, 1-5
- 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, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707–717

-
- Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, Trebst C, Weinschenker B, Wingerchuk D, Parisi JE et al. (2002): A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125, 1450–1461
- Lutton JD, Winston R, Rodman TC (2004): Multiple sclerosis: ethiological mechanisms and future directions. *Exp Biol Med* 229, 12-20
- Mahad DJ, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull DM (2008): Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 131, 1722-1735
- Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, Lax N, White K, Hanson PS, Lassmann H, Turnbull DM (2009): Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* 132, 1161–1174
- Mai W, Hu X, Lu Z, Peng F, Wang Y (2011): Cerebrospinal fluid levels of soluble amyloid precursor protein and beta-amyloid 42 in patients with multiple sclerosis, neuromyelitis optica and clinically isolated syndrome. *J Int Med Res* 39, 2402–2413
- Marburg O (1906): Die sogenannte akute multiple Sklerose. *Jahrb Psychiatr Neurol* 27, 213-312
- Marcoli M, Cervetto C, Paluzzi P, Guarnieri S, Alloisio S, Thellung S, Nobile M, Maura G (2008): P2X7 pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release. *J Neurochem* 105, 2330–2342
- Marcus JF, Waubant EL (2013): Updates on Clinically Isolated Syndrome and Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. *Neurohospitalist* 3, 65–80
- Marignier R, Confavreux C (2010): Devic's neuromyelitis optica and related neurological disorders. *Presse Med* 39, 371–380
- Marignier R, Nicolle A, Watrin C, Touret M, Cavagna S, Varrin-Doyer M, Cavillon G, Rogemond V, Confavreux C, Honnorat J et al. (2010): Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 133, 2578-2591
- Martineau M, Shi T, Puyal J, Knolhoff AM, Dulong J, Gasnier B, Klingauf J, Sweedler JV, Jahn R, Mothet JP (2013): Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J Neurosci* 33, 3413–3423
- Matà S, Lolli F (2011): Neuromyelitis optica: an update. *J Neurol Sci* 303, 13-21
- Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, Al-Hayani A, Davies SN, Rasband MN, Olsson T et al. (2007): Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 204, 2363–2372
- Matschke V, Theiss C, Hollmann M, Schulze-Bahr E, Lang F, Seebohm G, Strutz-Seebohm N (2015): NDRG2 phosphorylation provides negative feedback for SGK1-dependent regulation of a kainate receptor in astrocytes. *Front Cell Neurosci* 9, 387
- Matthews PM (2009): Brain imaging of multiple sclerosis: the next 10 years. *Neuroimaging Clin N Am* 19, 101-112

-
- Matute C (2008): P2X7 receptors in oligodendrocytes: a novel target for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 38, 123-128
- Matute C (2011): Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. *J Anat* 219, 53–64
- Matute C, Torre I, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodriguez-Antiguedad A, Sanchez-Gomez M et al. (2007): P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 27, 9525–9533
- McKeon A, Lennon VA, Lotze T, Tenenbaum S, Ness JM, Rensel M (2008): CNS aquaporin-4 autoimmunity in children. *Neurology* 71, 93-100
- Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H (2001): Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 159, 809–815
- Meinl E, Derfuss T, Krumbholz M, Pröbstel A, Hohlfeld R (2011): Humoral autoimmunity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 306, 180–182
- Mews I, Bergmann M, Bunkowski S, Gullotta F, Bruck W (1998): Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions. *Mult Scler* 4, 55–62
- Miller D, Chard D, Ciccarelli O (2012): Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol* 11, 157–169
- Miller DH, Leary SM (2007): Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 6, 903–912
- Misu T, Fujihara K, Nakashima I, Miyazawa I, Okita N, Takase S, Itoyama Y (2002): Pure optic-spinal form of multiple sclerosis in Japan. *Brain* 125, 2460-2468
- Misu T, Fujihara K, Nakamura M, Murakami K, Endo M, Konno H, Itoyama Y (2006): Loss of aquaporin-4 in active perivascular lesions in neuromyelitis optica: a case report. *Tohoku J Exp Med* 3, 269-275
- 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
- Misu T, Hoftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, Nakashima I, Konno H, Bradl M, Garzuly F et al. (2013): Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 125, 815–827
- Miyazawa I, Nakashima I, Petzold A, Fujihara K, Sato S, Itoyama Y (2007): High CSF neurofilament heavy chain levels in neuromyelitis optica. *Neurology* 1, 865-867
- Mok CC, To CH, Mak A (2008): Immunoablative cyclophosphamide for refractory lupus-related neuromyelitis optica. *J Rheumatol* 35, 172–174
- Mulisch M, Welsch U (Hrsg.): *Romeis – Mikroskopische Technik*. 18. Aufl.; Springer Spektrum, Heidelberg 2010

-
- Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood HE, Thorpe J, Miller D, Compston DAS (1994): The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 44, 11-15
- Murray PD, Pavelko KD, Leibowitz J, Lin X, Rodriguez M (1998): CD4(+) and CD8(+) T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. *J Virol* 72, 7320–7329
- Murugan M, Ling E, Kaur C (2013): Dysregulated glutamate uptake by astrocytes causes oligodendroglia death in hypoxic periventricular white matter damage. *Mol Cell Neurosci* 56, 342–354
- Nakahara J, Aiso S, Suzuki N (2010): Autoimmune versus oligodendroglia pathology: the pathogenesis of multiple sclerosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58, 325–333
- Nakashima I, Fujihara K, Takase S, Itoyama Y (1999): Decrease in multiple sclerosis with acute transverse myelitis in Japan. *Tohoku J Exp Med* 188, 89–94
- Naruoka T, Nakahara T, Tsuda Y, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Nishihira J, Ishii K (2013): ISO-1, a macrophage migration inhibitory factor antagonist, prevents N-methyl-D-aspartate-induced retinal damage. *Eur J Pharmacol* 718, 138–144
- Ness JK, Wood TL (2002): Insulin-like growth factor I, but not neurotrophin-3, sustains Akt activation and provides long-term protection of immature oligodendrocytes from glutamate-mediated apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 20, 476–488
- Neumann H (2003): Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Curr Opin Neurol* 16, 267–273
- Newcombe J, Uddin A, Dove R, Patel B, Turcki L, Nishizawa Y, Smith T (2008): Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 1, 52-61
- Newman EA (1986): High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* 233, 453–454
- Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH (2001): T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain* 124, 2203–2214
- Ni J, Wang P, Zhang J, Chen W, Gu L (2013): Silencing of the P2X(7) receptor enhances amyloid-beta phagocytosis by microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 434, 363–369
- Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück W, Bishop D, Misgeld T, Kerschenshneider M (2011): A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med* 17, 495-499
- Nomura K (2013): Treatment of neuromyelitis optica. *Nihon Rinsho* 71, 829-838
- North RA (2002): Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-1067
- Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF (1992): Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 17, 877-885

-
- Noseworthy JH (1999): Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399, A40-A47
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M (2000): Medical progress: multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952
- Nylander A, Hafler DA (2012): Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 122, 1180–1188
- Ochi H (2010): Treatment and clinical management of patients with neuromyelitis optica and anti-aquaporin 4 antibody. *Brain Nerve* 62, 945-952
- Ogden KK, Traynelis SF (2011): New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 12, 726-733
- Okada K, Tsuji S, Tanaka K (2007): Intermittent intravenous immunoglobulin successfully prevents relapses of neuromyelitis optica. *Intern Med* 46, 1671–1672
- Oksenberg JR (2013): Decoding multiple sclerosis: an update on genomics and future directions. *Expert Rev Neurother* 13, 11–19
- Oliet, Stephane H R, Piet R, Poulain DA, Theodosis DT (2004): Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Glia* 47, 258–267
- Ouardouz M, Coderre E, Zamponi GW, Hameed S, Yin X, Trapp BD, Stys PK (2009): Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: II. AMPA and GluR5 receptors. *Ann Neurol* 65, 160–166
- Oyanguren-Desez O, Rodriguez-Antiguedad A, Villoslada P, Domercq M, Alberdi E, Matute C (2011): Gain-of-function of P2X7 receptor gene variants in multiple sclerosis. *Cell Calcium* 50, 468–472
- Padmawar P, Yao X, Bloch O, Manley GT, Verkman AS (2005): K⁺ waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K⁺-sensing fluorescent indicator. *Nat Methods* 2, 825-827
- Palace J, Leite MI, Nairne A (2010): Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol* 67, 1016–1017
- Papadopoulos MC, Verkman AS (2013): Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 14, 265-277
- Papeix C, Vidal JS, de Seze J (2007): Immunosuppressive therapy is more effective than interferon in neuromyelitis optica. *Mult Scler* 13, 256–259
- Parajuli B, Sonobe Y, Horiuchi H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A (2013): Oligomeric amyloid beta induces IL-1beta processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis* 4, e975
- Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF (1988): MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology* 38, 180–185

-
- Paulus W, Roggendorf W, Kirchner T (1992): Ki-M1P as a marker for microglia in brain macrophages in routinely processed human tissues. *Acta Neuropathol* 84, 538-544
- Perry VH, Anthony DC (1999): Axon damage and repair in multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 1641–1647
- Petzold A, Eikelenboom MJ, Keir G, Grant D, Lazeron RH, Polman CH, Uitdehaag BM, Thompson EJ, Giovannoni G (2005): Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 206–211
- Pierson ER, Stromnes IM, Goverman JM (2014): B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system. *J Immunol* 192, 929–939
- Pitt D, Werner P, Raine CS (2000): Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6, 67–70
- Popescu BF, Lucchinetti CF (2012): Pathology of Demyelinating Diseases. *Annu Rev Pathol* 7, 185–217
- Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, Hoffman B, Morgan BP (2001): Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 646–657
- Radzun HJ, Hansmann ML, Heidebrecht HJ, Bödewadt-Radzun S, Wacker HH, Kreipe H, Lumbeck H, Hernandez C, Kuhn C, Parwaresch MR (1991): Detection of a monocyte/macrophage differentiation antigen in routinely processed paraffin-embedded tissues by monoclonal antibody Ki-M1P. *Lab Invest* 65, 306-315
- Ramagopalan S, Dymant D, Ebers G (2008): Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 31, 645–652
- Ratelade J, Zhang H, Saadoun S, Bennett JL, Papadopoulos MC, Verkman AS (2012): Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss. *Acta Neuropathol* 123, 861-872
- Redford EJ, Kapoor R, Smith KJ (1997): Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain* 120, 2149–2157
- Reindl M, Khantane S, Ehling R, Schanda K, Lutterotti A, Brinkhoff C, Oertle T, Schwab ME, Deisenhammer F, Berger T et al. (2003): Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. *J Neuroimmunol* 145, 139-147
- Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, Mandler RN, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM et al. (2007): Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1194–1205
- Rossi B, Ogden D, Llano I, Tan YP, Marty A, Collin T (2012): Current and calcium responses to local activation of axonal NMDA receptors in developing cerebellar molecular layer interneurons. *PLoS One* 7, e39983
- Roth J, Goebeler M, Wrocklage V, van den Bos C, Sorg C (1994): Expression of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in monocytes is regulated by a calcium-induced suppressor mechanism. *Biochem J* 301, 655-660

-
- Saadoun S, Papadopoulos MC, Watanabe H, Yan D, Manley GT, Verkman AS (2005): Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci* 118, 5691-5698
- Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC (2010): Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 133, 349–361
- Sabater L, Giralt A, Boronat A, Hankiewicz K, Blanco Y, Llufríu S, Alberch J, Graus F, Saiz A (2009): Cytotoxic effect of neuromyelitis optica antibody (NMO-IgG) to astrocytes: an in vitro study. *J Neuroimmunol* 215, 31–35
- Sanchez-Gomez MV, Alberdi E, Perez-Navarro E, Alberch J, Matute C (2011): Bax and calpain mediate excitotoxic oligodendrocyte death induced by activation of both AMPA and kainate receptors. *J Neurosci* 31, 2996–3006
- Sato DK, Lana-Peixoto MA, Fujihara K, de Seze J (2013): Clinical Spectrum and Treatment of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Evolution and Current Status. *Brain Pathol* 23, 647-660
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH (1995): D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3948–3952
- Sellner J, Lüthi N, Bühler R, Gebhardt A, Findling O, Greeve I, Mattle HP (2008): Acute partial transverse myelitis: risk factors for conversion to multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 15, 398-405
- Sellner J, Boggild M, Clanet M, Hintzen RQ, Illes Z, Montalban X (2010): EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. *Eur J Neurol* 17, 1019-1032
- Shibasaki H, McDonald WI, Kuroiwa Y (1981): Racial modification of clinical picture of multiple sclerosis: comparison between British and Japanese patients. *J Neurol Sci* 49, 253–271
- Shindler KS, Ventura E, Dutt M, Rostami A (2008): Inflammatory demyelination induces axonal injury and retinal ganglion cell apoptosis in experimental optic neuritis. *Exp Eye Res* 87, 208–213
- Shintaku M, Hirano A, Llena JF (1988): Increased diameter of demyelinated axons in chronic multiple sclerosis of the spinal cord. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 505–510
- Shimizu J, Hatanaka Y, Hasegawa M (2010): IFN β -1b may severely exacerbate Japanese optic-spinal MS in neuromyelitis optica spectrum. *Neurology* 75, 1423–1427
- Stadelmann C (2011): Multiple sclerosis as a neurodegenerative disease: pathology, mechanisms and therapeutic implications. *Curr Opin Neurol* 24, 224–229
- Stadelmann C, Brück W (2005): Lessons from the neuropathology of atypical forms of multiple sclerosis. *J Neurosci* 25, 737-747
- Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Brück W, Hohlfeld R, Lassmann H (2002): BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 125, 75-85

-
- Stadelmann C, Wegner C, Brück W (2011): Inflammation, demyelination, and degeneration - Recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta* 1812, 275–282
- Steinbach S, Lutz J (2007): Glutamate induces apoptosis in cultured spiral ganglion explants. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 14–19
- Stirling DP, Stys PK (2010): Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation. *Trends Mol Med* 16, 160-170
- Stys PK, Lipton SA (2007): White matter NMDA receptors: an unexpected new therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* 28, 561-566
- Takai Y, Misu T, Takahashi T, Nakashima I, Fujihara K (2013): NMO spectrum disorders and anti AQP4 antibody. *Brain Nerve* 65, 333–343
- Trapp BD, Stys PK (2009): Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 8, 280-291
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338, 278–285
- Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R (1999): Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 12, 295–302
- Trebst C, Jarius S, Berthele A, Paul F, Schippling S, Wildemann B, Borisow N, Kleiter I, Aktas O, Kümpfel T; Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS) (2014): Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). *J Neurol* 261, 1-16
- Wang H, Wang C, Qiu W, Lu Z, Hu X, Wang K (2013): Cerebrospinal fluid light and heavy neurofilaments in neuromyelitis optica. *Neurochem Int* 63, 805–808
- Weil MT, Möbius W, Winkler A, Ruhwedel T, Wrzos C, Romanelli E, Bennett JL, Enz L, Goebels N, Nave KA et al. (2016): Loss of Myelin Basic Protein Function Triggers Myelin Breakdown in Models of Demyelinating Diseases. *Cell Rep* 16, 314-322
- Weinstein DE, Shelanski ML, Liem RK (1991): Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic process in response to neurons. *J Cell Biol* 112, 1205-1213
- Werner P, Pitt D, Raine CS (2001): Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 50, 169-180
- Wilkins A, Majed H, Layfield R, Compston A, Chandran S (2003): Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23, 4967–4974
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG (2003): Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology* 60, 848-853

-
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG (2008): Neuromyelitis optica. *Curr Treat Options Neurol* 10, 55-66
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG (2014): Neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Handb Clin Neurol* 122, 581–599
- Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG (1999): The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53, 1107
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG (2006): Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66, 1485-1489
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG (2007a): The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 6, 805-815
- Wingerchuk DM, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA, Weinshenker BG (2007b): A secondary progressive clinical course is uncommon in neuromyelitis optica. *Neurology* 68, 603-605
- Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K (2010): Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis* 2011, 164608
- Wolburg, H (1995): Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch* 36, 239-258
- 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, 523–538
- Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Bruck W, Hartung H, Stadelmann C, Hemmer B (2006): Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 19057–19062
- Zonta M, Sebelin A, Gobbo S, Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G (2003): Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J Physiol* 553, 407–414

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler, die mich bei der Fertigstellung meiner Arbeit stets überaus freundlich und engagiert mit kompetenten Ratschlägen unterstützt hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück und Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler für die Anregung zu dieser Arbeit sowie darüber hinaus für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Neuropathologie des Universitätsklinikums Göttingen und für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit in dieser Abteilung.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Claudia Wrzos und Frau Dr. Anne Winkler für die Hilfestellungen bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit.

Auch geht mein Dank an das gesamte MTA-Team der Neuropathologie, vor allem an Frau Brigitte Maruschak, die mich geduldig in die Kunst der histologischen Färbemethoden einführte.
