

Aus der Klinik für Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN DER AXONALEN DEGENERATION
IM TIERMODELL DER MULTIPLEN SKLEROSE**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Johannes Ruhe

aus

Münster

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. H. K. Kroemer
Referentin:	Prof. Dr. K. Hein
Ko-Referent/in:	PD Dr. I. Metz
Drittreferent/in:	Prof. Dr. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 19.12.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "In-vivo-Untersuchungen der axonalen Degeneration im Tiermodell der Multiplen Sklerose" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	10
1.1	Multiple Sklerose.....	10
1.1.1	Krankheitsbild.....	10
1.1.2	Ätiologie.....	11
1.1.3	Pathophysiologie	12
1.1.4	Diagnostik.....	14
1.1.5	Therapie	15
1.2	Tiermodell der Multiplen Sklerose.....	17
1.2.1	MOG-induzierte EAE.....	17
1.2.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	19
1.2.3	<i>In-vivo</i> -Abbildungen von Axonen des Optischen Nerven.....	20
1.3	Axonale Pathologie in der Multiplen Sklerose.....	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Materialien zur Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen.....	25
2.1.1	Reagenzien	25
2.1.2	Lösungen und Puffer	27
2.1.3	Mikroorganismen	28
2.1.4	Antikörper	28
2.1.5	Kits	28
2.1.6	Equipment	29
2.1.7	Versuchstiere	30
2.1.8	Immunogen	30
2.1.9	Viraler Vektor und Fluoreszenz-Farbstoff	31
2.2	Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen.....	32
2.2.1	Versuchsaufbau.....	32
2.2.2	<i>In-vivo</i> -Mikroskopie.....	32
2.2.2.1	Intravitreale Injektion des viralen Vektors	32
2.2.2.2	Induktion der MOG-EAE	33
2.2.2.3	Beurteilung des Krankheitsverlaufs und Abbruchkriterien	34
2.2.2.4	Präparation des Optischen Nerven	35
2.2.2.5	Aufnahme der Axone und Nachbearbeitung der Bilder.....	38
2.2.2.6	Auswertung der <i>In-vivo</i> -Mikroskopie.....	40
2.2.3	Histopathologie	45

2.2.3.1	Perfusion der Ratten, Gewebeentnahme und Fixation der Nerven	45
2.2.3.2	Herstellung der Paraffinschnitte.....	46
2.2.3.3	Immunhistochemische Färbungen	46
2.2.3.4	<i>LFB</i> -Färbung	47
2.2.3.5	Bielschowsky-Silberfärbung.....	47
2.2.3.6	ED1-, β -APP- und <i>CD3</i> -Färbung	48
2.2.3.7	Auswertung der ED1-Färbung	48
2.2.3.8	Auswertung der β -APP-Färbung	49
2.2.3.9	Auswertung der <i>CD3</i> -Färbung.....	49
2.2.3.10	Auswertung der Bielschowsky-Silberfärbung.....	50
2.2.3.11	Auswertung der <i>LFB</i> -Färbung	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Übersicht über die Ergebnisse	52
3.2	Ergebnisse der In-vivo-Mikroskopie.....	55
3.2.1	Axonauszählung	55
3.2.2	Axondegeneration	61
3.2.2.1	Beispielaufnahmen der Axondegeneration.....	61
3.2.2.2	Axonale Integrität	64
3.3	Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen.....	69
3.3.1	Makrophageninfiltration	69
3.3.2	Infiltration von T-Lymphozyten.....	70
3.3.3	Akuter axonaler Schaden	72
3.3.4	Chronischer axonaler Schaden	74
3.3.5	Grad der axonalen Demyelinisierung	76
3.4	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	78
4	Diskussion	80
4.1	Diskussion der Methoden.....	80
4.1.1	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen des Optischen Nerven	80
4.1.2	Fluoreszenzmikroskopische Live-Aufnahmen	81
4.1.3	Forschungsdesign – Möglichkeiten und Probleme	82
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	84
4.2.1	Ausschluss von Traumata als Auslöser der Neurodegeneration	84
4.2.2	Quantifizierung der Axone	86
4.2.3	Ablauf der Neurodegeneration in der EAE.....	87
4.2.4	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Axondegeneration.....	89
4.3	Ausblick.....	90
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	94

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb 2.1: Plasmidkarte AAV-1/2 mit dem Fluoreszenzfarbstoff mCherry 22

Abb 2.2: Operationsequipment 27

Abb 2.3: Präparation des Optischen Nerven. 28

Abb 2.4: Versuchstier unter dem Mikroskop 30

Abb 2.5: *In-vivo*-Mikroskopie 30

Abb 2.6: Schematischer Verlauf eines Axons 30

Abb 2.7: Beispielbilder – Verschiedene Erkrankungsstadien 33

Abb 2.8: Beispielbilder – Axone im Zeitverlauf 34

Abb 2.9: Beispielbilder – Photobleichung 35

Abb 2.10: Beispielbilder – Degeneration im Zeitverlauf 36

Abb 2.11: Skizze der Okularzählplatte 41

Abb 3.1: Axondegeneration 53

Abb 3.2: Scheinbare Axondegeneration 54

Abb 3.3: Konstante Axonschwellungen 55

Abb 3.4: Anzahl der Axonfragmente 56

Abb 3.5: Länge pro Axonfragment 56

Abb 3.6: Gesamtlänge der Axonfragmente 56

Abb 3.7: Axonale Integritätsrate. 59

Abb 3.8: Beispielbilder – ED1-Färbung 60

Abb 3.9: Makrophageninfiltration 61

Abb 3.10: Beispielbild – *CD3*-Färbung 62

Abb 3.11: Anzahl T-Lymphozyten 62

Abb 3.12: Beispielbild – β -*APP*-Färbung 63

Abb 3.13: Ausmaß der akuten Axonschädigung 64

Abb 3.14: Beispielbilder – Bielschowsky-Silberfärbung 65

Abb 3.15: Chronischer axonaler Schaden. 66

Abb 3.16: Beispielbilder – *LFB*-Färbung 67

Abb 3.17: Grad der axonalen Demyelinisierung 68

TABELLENVERZEICHNIS

Tab 1.1: Stufentherapie der Multiplen Sklerose.	7
Tab 2.1: Reagenzien für die <i>In-vivo</i> -Mikroskopie	16
Tab 2.2: Reagenzien für die immunhistochemischen Färbungen	17
Tab 2.3: Lösungen und Puffer	18
Tab 2.4: Mikroorganismen	19
Tab 2.5: Primärantikörper	19
Tab 2.6: Sekundärantikörper	19
Tab 2.7: Kits	19
Tab 2.8: Equipment	20
Tab 2.9: Bewertungsskala der klinischen Symptome	25
Tab 2.10: Fluoreszenzmikroskopischer <i>Score</i>	32
Tab 2.11: ED1- <i>Score</i>	40
Tab 3.1: Übersicht über die Ergebnisse	45
Tab 3.2: Axonanzählung – Kontrolltiere	47
Tab 3.3: Axonanzählung – Tag 8 <i>p. i.</i>	48
Tab 3.4: Axonanzählung – Tag 10 <i>p. i.</i>	49
Tab 3.5: Axonanzählung – Tag 12 <i>p. i.</i>	50
Tab 3.6: Axonanzählung – Tag 14 <i>p. i.</i>	51
Tab 3.7: Anzahl der Axonfragmente	56
Tab 3.8: Länge pro Axonfragment	57
Tab 3.9: Gesamtlänge der Axonfragmente	57
Tab 3.10: Axonale Integritätsrate	58
Tab 3.11: β -APP-Färbung – Differenz zwischen rechtem und linkem Nerven	64
Tab 3.12: Bielschowsky-Silberfärbung – Differenz zwischen rechtem und linkem Nerven	66
Tab 3.13: LFB-Färbung – Differenz zwischen rechtem und linkem Nerven	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
β -APP ₊	beta-amyloid-precursor-protein-positiv
BSA	<i>N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLSO	<i>Confocal Laser Scanning Ophthalmoscopy</i>
DAB	Diaminobenzidin
dsRed	<i>Red Fluorescent Protein</i>
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EtOH	Ethanol
f./ff.	folgend/folgende
Kap	Kapitel
LFB	<i>Luxol Fast Blue</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
n. m.	nicht möglich
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
p. i.	<i>post injectionem</i> ; nach der Injektion
RGC	Retinale Ganglienzelle
Tab	Tabelle
TCR	<i>T-Cell-Receptor</i>
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
ZNS	Zentrales Nervensystem

EINHEITEN UND DIAGRAMMLEGENDE

(v/v)	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
kg, g, mg, µg	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM	Molar, Millimolar
	Median
	Mittelwert
	25-75 %
	Bereich ohne Ausreißer
	Ausreißer
	Extremwert

1 EINLEITUNG

1.1 MULTIPLE SKLEROSE

1.1.1 KRANKHEITSBILD

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems. In ihrem Verlauf werden bestimmte Nervenstrukturen zerstört, insbesondere die Markscheiden, daneben aber auch Axone und Neurone. Als Synonym dient der Begriff *Encephalomyelitis disseminata*, in den romanischen Sprachen wird die von dem Neurologen JEAN-MARTIN CHARCOT geprägte Bezeichnung *Sclérose en Plaques* verwendet (MUMENTHALER und MATTLE 2011). Dieser verfasste bereits 1868 eine erste ausführliche Beschreibung des Krankheitsbildes. CHARCOT verwies auf die klassische, nach ihm benannte Trias, bestehend aus Nystagmus, Intentionstremor und skandierender Sprache. Die MS ist in einer Gruppe von unterschiedlichen demyelinisierenden Erkrankungen in Europa und Nordamerika die häufigste Myelinopathie und nach der Epilepsie die zweithäufigste neurologische Erkrankung junger erwachsener Menschen (MUMENTHALER und MATTLE 2002). Da die Erkrankung hauptsächlich berufstätige und gesellschaftlich aktive Menschen betrifft, ist sie von erheblicher arbeits- und sozialmedizinischer Bedeutung (HOFFMANN et al. 2009). Frauen sind etwa zweimal häufiger betroffen als Männer. Flächendeckende, bevölkerungsbezogene Angaben zur Prävalenz der MS liegen in Deutschland bislang nicht vor, laut Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung (GKV) sind aktuell jedoch fast 200.000 GKV-Versicherte mit MS diagnostiziert worden (PETERSEN et al. 2014).

Da verschiedene topische Areale des zentralen Nervensystems (ZNS) beteiligt sind und der Krankheitsverlauf eine variable Dynamik aufweist, sind die klinischen Symptome sehr verschiedenartig (MUMENTHALER und MATTLE 2006). Zu den typischen Symptomen gehören vor allem spastische Paresen sowie Sensibilitäts- und Blasenstörungen. In einem Drittel der Fälle manifestiert sich die MS in Form einer Optikusneuritis (MASUHR und NEUMANN 2007). Die Er-

krankung imponiert initial meist durch schubförmige neurologische Ausfälle, die im weiteren Erkrankungsverlauf oftmals persistieren und schließlich zu einer progredienten körperlichen Beeinträchtigung führen. In zwei Drittel der Fälle manifestiert sich die MS zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (SCHÖNFELDER und PÖHLAU 2016). Da das adulte ZNS dem Verlust von axonalen und neuronalen Strukturen nicht durch Zellteilung entgegenwirken kann, resultieren häufig bleibende Behinderungen.

Zu früheren Zeiten führten Lähmungen und Verluste der renalen und respiratorischen Homöostase nicht selten zum Tod, dank des medizinischen Fortschritts ist die Lebenserwartung von MS-Patienten heutzutage jedoch nur wenig reduziert – im Durchschnitt um sechs Jahre (MUMENTHALER und MATTLE 2011). Therapeutisch erfuhr die Schubprophylaxe mittels Immunmodulation und -suppression in den vergangenen Jahren eine deutliche Entwicklung. Bei den hauptsächlich durch die Neurodegeneration bedingten chronisch-progredienten Verläufen bleibt ein zufriedenstellender therapeutischer Ansatz gegenwärtig noch aus. Hier liegt der Fokus auf der Erforschung neuroprotektiver Behandlungen zur Prophylaxe bleibender Behinderungen.

1.1.2 ÄTIOLOGIE

Über die Jahre wurden zahlreiche Hypothesen über die Entstehung der MS aufgestellt, wovon jedoch letztlich keine bewiesen werden konnte. Der Auslöser wird im pathogenetischen Dreieck vermutet. Dieses umfasst das Genom, Umwelteinflüsse und das Immunsystem. Auch Viren werden immer wieder als ätiologische Faktoren diskutiert.

Die Beteiligung genetischer Faktoren ist allgemein anerkannt. Die Konkordanzrate bzgl. der Entstehung der MS unter monozygoten Zwillingen beträgt 30 %. Dagegen konnte eine Übereinstimmung der Erkrankung bei heterozygoten Zwillingen in gerade mal 3 % und bei Geschwistern in 2 % der Fälle nachgewiesen werden (SADOVNICK und EBERS 1995; OKSENBERG und BARCELLOS 2000).

Zudem konnten Nachforschungen zum Einfluss des humanen Leukozytenantigen-Systems eine Verbindung des *Major-Histocompatibility-Complex*-Klasse-II-Allels HLA-DR2 mit der Entstehung der MS zeigen (MADSEN et al. 1999). Daher wird vermutet, dass Genprodukte, die die

Reaktionsweise des Immunsystems kontrollieren, eine Bedeutung für die Entstehung der Erkrankung haben.

Auch Umweltfaktoren scheinen einen Einfluss auf die Erkrankungshäufigkeit zu nehmen. In der äquatorialen Zone ist das Erkrankungsrisiko signifikant geringer als in den nördlichen und südlichen Breitengraden. Die Prävalenz ist in Nord- und Mitteleuropa, Russland, Südkanada und den nördlichen USA, Neuseeland und Südwestaustralien am höchsten (MUMENTHALER und MATTLE 2002). Ob diese geographische Verteilung mit der Exposition bestimmter Infektionen oder mit den Bedingungen der Ernährungs- und Lebensweise zusammenhängt, ist nicht endgültig geklärt (HACKE und POECK 2006). Migrationsstudien konnten zeigen, dass eine Umsiedlung von Menschen aus einer Hochrisiko- in eine Niedrigrisikoregion zu einer Aneignung des Risikos der neuen Region führte. In umgekehrten Fällen tendierten die Menschen jedoch dazu, ihr geringes Risiko beizubehalten (GALE und MARTYN 1995).

Andere Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Infektion unterschiedlicher Viren mit der Entstehung einer MS hin. Eine frühe Infektion mit dem Humanen Herpesvirus 6 (CHALLONER et al. 1995; SOLDAN et al. 1997), dem Epstein-Barr-Virus (ASCHERIO und MUNCH 2000) oder dem Masernvirus (BURGOON et al. 1999) ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert. Ein überzeugender Nachweis eines spezifischen Erregers erfolgte bisher noch nicht. Gegen die Möglichkeit einer direkten Übertragung eines spezifischen Erregers sprechen Studien an Adoptiv- und Stiefkindern von MS-Erkrankten. Hier konnte keine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden (KATSNELSON 2010; DYMENT et al. 2006).

1.1.3 PATHOPHYSIOLOGIE

Derzeit ist noch nicht gesichert, ob es sich bei der Multiplen Sklerose um eine heterogene Erkrankung mit einer komplexen Pathogenese handelt oder ob die Komplexität der Pathogenese eine einheitliche Erkrankung lediglich als heterogen erscheinen lässt. Die Multiple Sklerose ist auf neuropathologischer Ebene durch fokale entzündlich-entmarkende Läsionen im zentralen Nervensystem gekennzeichnet. In den ersten Jahren des Krankheitsverlaufs sind v. a. die autoimmun-entzündlichen Prozesse für die klinischen Erscheinungsformen und Schübe verantwortlich, später stehen die degenerativen Vorgänge mit Axon- und Neuronenuntergang im Vordergrund (MUMENTHALER und MATTLE 2006). Bereits in den frühen Krank-

heitsstadien werden akute axonale Schädigungen beobachtet, die sowohl mit der Entzündungsreaktion als auch mit der klinischen Behinderung korrelieren (KORNEK et al. 2000). Es kommt zu Verlustströmen, da eine schnelle saltatorische Erregungsleitung ohne die Myelinscheide nicht mehr möglich ist. Vermutlich wird die erste demyelinisierende Episode durch eine Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten in der Peripherie initiiert. Der genaue Auslöser der Aktivierung konnte bislang noch nicht sicher nachgewiesen werden. Es wird jedoch eine Präsentation von aus dem ZNS stammenden Antigenen durch Makrophagen sowie eine Kreuzreaktivität mit viralen oder bakteriellen Proteinen (Molekulare Mimikry) diskutiert (DE VOS et al. 2002; WUCHERPFENNIG und STROMINGER 1995). Anschließend wandern die aktivierten, myelinreaktiven T-Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS (HICKEY 1991). Die Transmigration wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle wie das ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*), seinen Liganden das VLA-4 (*Very Late Antigen-4*), das ICAM-3 (*Intracellular Adhesion Molecule-3*), seinen Bindungspartner LFA-1 (*Leukocyt Function Antigen-1*) sowie das VCAM-1 (*Vascular Adhesion Molecule-1*) und durch diverse Oberflächenproteine vermittelt (DOERCK et al. 2010; MALIK et al. 2008; SIMKA 2009). Im ZNS werden die T-Lymphozyten von antigenpräsentierenden Zellen über den TRC-MHC-Komplex (*T-Cell-Receptor-Major Histocompatibility Complex*) erneut aktiviert, woraufhin diese Entzündungsmediatoren sezernieren. Die MS-Antigene hierbei sind sehr vielfältig und noch nicht gänzlich erforscht. Ein gut untersuchtes Antigen ist dagegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG). Durch die Aktivierung der T-Lymphozyten wird eine Entzündungskaskade ausgelöst, an der sowohl Lymphozyten und Zellen des Makrophagen-Monozyten-Systems als auch Antikörper und Zytokine als Teil der humoralen Immunantwort beteiligt sind. CD4⁺-T-Helferzellen sezernieren Zytokine wie das Interferon- γ (INF- γ), das Interleukin-2 (IL-2) und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), der apoptotisch auf Oligodendrozyten wirkt (D'SOUZA et al. 1996). Makrophagen setzen toxische Substanzen frei und phagozytieren Myelinbestandteile, wogegen CD8⁺-T-Lymphozyten direkt zum Zelltod von Neuronen und Oligodendrozyten beitragen. Auch die Antikörper-Komplement-vermittelte Demyelinisierung und die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität sind vermutlich entscheidende Bestandteile der Entzündungsreaktion (STORCH et al. 1998a). Ebenfalls könnten nicht-immunologische Faktoren wie Sauerstoffradikale, Glutamat und Stickoxide an der Zerstörung des Myelins und der Oligodendrozyten beteiligt sein (SMITH et al. 1999). Die durch den Entzündungsprozess entstehenden Verände-

rungen werden von einer Astrozytenproliferation begleitet, mit nachfolgender Verhärtung (Sklerose) des Gewebes.

1.1.4 DIAGNOSTIK

Die MS zeigt in ihrer Symptomatik und ihrem Krankheitsverlauf eine außerordentliche Variabilität und kann beinahe jede andere Erkrankung imitieren, die das ZNS betrifft (FISCHER 2008). Infolgedessen ist es teilweise aufwendig, sicher nachzuweisen, dass ein Mensch mit neurologischen Symptomen an einer MS erkrankt ist. Es gibt derzeit noch keinen Test, mit dem alleine die Diagnose MS gestellt werden kann. Vielmehr stützt sich die Diagnostik auf eine sorgfältige klinisch-neurologische Untersuchung unter Zuhilfenahme von Zusatzuntersuchungen, z. B. einem kranialen und spinalen MRT, einer Liquordiagnostik sowie visuell evozierten Potentialen. Dabei gilt es alle Daten zu berücksichtigen, um andere mögliche Ursachen für die Symptome auszuschließen.

Durch die unspezifische und häufig passagere Symptomatik resultiert, dass zwischen dem Auftreten erster Symptome und der endgültigen Stellung der Diagnose nicht selten Jahre vergehen. In diesen Zeiträumen können teils irreparable Schäden am Nervensystem des Patienten entstehen, die durch den frühzeitigen Beginn einer geeigneten Therapie zu verhindern wären. Ziel von Ärzten und Wissenschaftlern ist es daher, diese Zeit möglichst zu verkürzen. Die Diagnosekriterien werden daher laufend dem technischen Fortschritt in Form neuer Untersuchungstechniken und Erkenntnissen aus der Wissenschaft angepasst.

Die MS war bis in die 1960er Jahre eine klinische Ausschlussdiagnose. SCHUMACHER und ROSE stützten ihre Kriterien vor allem auf anamnestisch und klinisch-neurologisch erhobene Befunde, wobei bereits von SCHUMACHER der auch heute noch gültige Nachweis einer zeitlichen und räumlichen Dissemination gefordert wurde (SCHUMACHER et al. 1965; ROSE et al. 1976). POSER bezog anschließend zusätzlich Befunde des Liquors mit ein (POSER et al. 1983). Seit 2001 orientieren sich Neurologen bei der Diagnose einer MS an den sog. McDONALD-Kriterien (McDONALD et al. 2001), die klinische und paraklinische Befunde integrieren. 2010 wurden diese ein zweites Mal geändert (POLMAN et al. 2011) und gelten bis heute als Standard bei der Diagnosestellung. Durch die aktuell gültigen Diagnosekriterien ist es möglich, die Diagnose bereits nach dem ersten Schub zu stellen (FISCHER 2008). Voraussetzung ist jedoch

der Nachweis einer zeitlichen und räumlichen Dissemination durch die MRT. Um eine räumliche Dissemination zu belegen, bedarf es eindeutig definierter Bedingungen bzgl. der Lokalisation und der Anzahl von Hirnläsionen. Die Diagnose kann anschließend mittels visuell- und somatosensorisch evozierter Potentiale sowie einer Zellvermehrung (Pleozytose) von Lympho- und Monozyten, einer autochthonen Antikörperproduktion und oligoklonaler Banden in der Liquoruntersuchung untermauert werden.

1.1.5 THERAPIE

Die Multiple Sklerose ist trotz des Wissens um die Erkrankung und des medizinischen und technischen Fortschritts gegenwärtig nicht heilbar. Das Ziel der Behandlung liegt in der Gewährleistung der besten erreichbaren Lebensqualität der Patienten. Die drei Säulen der Therapie bestehen aus Schub-, Langzeit- und symptomatischer Therapie. In der Regel umfasst das Therapiekonzept eine Kombination dieser drei Komponenten.

Akute Schübe werden zumeist mit Glukokortikoiden intravenös behandelt (GOODIN et al. 2002). Sie führen durch ihre antiinflammatorische, immunsuppressive und antiödematöse Wirkung zu einer beschleunigten Reduktion der Schubsymptomatik (BEER und KESSELRING 1991). Glukokortikoide haben jedoch, laut einer Studie, keinen Einfluss auf die Langzeitprognose. Nach sechs bis zwölf Monaten ließen sich keine Effekte mehr nachweisen (FREQUIN et al. 1994), langfristig fand sich zudem keine Verringerung der funktionellen Defizite (FREQUIN et al. 1994; ANDERSSON und GOODKIN 1996). Eine weitere Studie zeigte, dass der Effekt einer oralen Gabe von Prednison nicht besser als die Gabe eines Placebos war, die intravenöse Behandlung mit den Steroiden hingegen zu einer kurzzeitigen Besserung der Symptomatik für drei bis sechs Monate führte (BECK et al. 1992). Es wird vermutet, dass Glukokortikoide zudem die Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)- und Interferon- γ (INF- γ)-vermittelte Apoptose der Oligodendrozyten hemmen (MELCANGI et al. 2000).

Im Bereich der Langzeittherapie und Schubprophylaxe werden vor allem immunmodulatorische und -supprimierende Substanzen eingesetzt. Die ersten für MS zugelassenen Medikamente waren die rekombinanten Interferon- β (BAYAS und GOLD 2003; RIECKMANN 2006; KLEINSCHNITZ et al. 2007). Diese verlangsamten nachweislich das Fortschreiten der Erkrankung und

vermindern sowohl die Frequenz der Schübe als auch deren Schweregrad. Darüber hinaus gibt es mit Glatirameracetat, Dimethylfumarat und Teriflunomid weitere Medikamente in der Therapie der milden/moderaten Verlaufsform. Mittels Natalizumab, Mitoxantron, Fingolimod oder Alemtuzumab können aggressive Verlaufsformen behandelt werden (PUTZKI et al. 2010; RIECKMANN 2009).

Die Stufentherapie der MS ist in der nachfolgenden **TAB 1.1** aufgeführt und entspricht der aktuellen DGN/KKNMS-Leitlinie (Deutsche Gesellschaft für Neurologie/Kompetenznetz Multiple Sklerose) zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose (Stand: Januar 2012; Gültigkeit der Leitlinie nach Überprüfung durch das Leitliniensekretariat verlängert bis zum 29.09.2017).

INDIKATION		RRMS <i>(relapsing-remitting ms)</i>			SPMS <i>(secondary progressive ms)</i>	
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-) aktive Verlaufsform	1. Wahl: Alemtuzumab Fingolimod Natalizumab	2. Wahl: Mitoxantron	3. Wahl: Experimentelle Verfahren	Mit aufgesetzten Schüben:	Ohne aufgesetzte Schübe:
	Milde /Moderate Verlaufsform	Dimethylfumarat Glatirameracetat Interferon-β 1a Interferon-β 1b PEG-INF-β 1a (<i>Polyethylenglycol-Interferon</i>) Teriflunomid			Interferon-β 1a Interferon-β 1b Mitoxantron	Mitoxantron
Schubtherapie	1. Wahl:	Methylprednisolonpuls				
	2. Wahl:	Plasmaseparation				

TAB 1.1: STUFENTHERAPIE DER MULTIPLER SKLEROSE

Die symptomatische Therapie richtet sich nach den individuellen Beschwerden der Patienten. An erster Stelle steht die krankengymnastische Behandlung, aber auch ergotherapeutische, logopädische, psychotherapeutische, medikamentöse und operative Ansätze gewinnen zu-

nehmend an Bedeutung (RIETBERG et al. 2005; KESSELRING und BEER 2005). Sekundäre Erkrankungen, die vor allem bei immunsupprimierten Patienten gehäuft auftreten wie Harnwegsinfekte, Bronchopneumonien, akute Nierenschädigungen, aber auch Lungenembolien, Thrombosen, Osteoporose, Dekubitalgeschwüre oder Gelenkkontrakturen bedürfen einer sorgfältigen prophylaktischen Behandlung.

1.2 TIERMODELL DER MULTIPLLEN SKLEROSE

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von menschlichem Hirngewebe während der aktiven Phasen der Erkrankung werden viele der vorliegenden Kenntnisse über den apoptotischen neuronalen Zelltod und die Axondegeneration bei MS aus Studien an Tiermodellen gewonnen. Durch gezielte Abwandlung von Versuchen kann die Wirkung unterschiedlicher Faktoren auf die Entstehung der Erkrankung erforscht werden – bspw. die Wirkung verschiedener Gene und Proteine im Rahmen des Immunsystems. Auch neue Therapeutika werden zunächst an Tieren getestet. Das wichtigste Tiermodell der Multiplen Sklerose ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) (CROXFORD et al. 2011).

1.2.1 MOG-INDUZIERTE EAE

Die EAE ist heutzutage das gängige Tiermodell der MS und imitiert viele der klinischen, neuropathologischen und immunologischen Merkmale der menschlichen Krankheit (HOHLFELD und WEKERLE 2001). Die Anfänge der EAE gehen bereits bis ins Jahr 1925 zurück, als KORITSCHONER und SCHWEINBURG eine Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe induzierten.

Durch die Injektion verschiedener Proteine, die Bestandteil des im ZNS vorhandenen Myelins sind, wird bei den Labortieren eine der menschlichen Multiplen Sklerose ähnliche Erkrankung ausgelöst. Zu diesen Proteinen zählen das basische Myelinprotein, das Proteolipid-Protein und das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG). Der durch das Molekulare Mimikry ausgelöste Autoimmunprozess führt zum Abbau der nervalen Myelinschicht. Die folgenden Erregungsleitungsstörungen zeigen sich in einer Reihe von wichtigen Symptomen, die denen der Multiplen Sklerose ähneln. Zu diesen Symptomen gehören u. a. aufsteigende Lähmungs-

erscheinungen, Sensibilitätsstörungen und Sehnervenentzündungen (MIX et al. 2010; CROXFORD et al. 2011).

MOG ist eines der wichtigsten Antigene in der Krankheitsentstehung der demyelinisierenden Enzephalomyelitis (LININGTON et al. 1993). Es ist auf den markbildenden Zellen des ZNS membranständig und kann daher sowohl von aktivierten T-Lymphozyten als auch von entmarkenden Antikörpern identifiziert werden. Diese kombinierte Immunantwort findet sich auch im histopathogenetischen Krankheitsbild von MS-Patienten wieder (LININGTON et al. 1993; STORCH et al. 1998a).

Allerdings reproduzieren die verfügbaren EAE-Modelle nicht jeden Aspekt der MS-Pathologie. Die Beteiligung von $CD8^+$ -zytotoxischen T-Zellen ist unterrepräsentiert, zudem sind keine Modelle verfügbar, die die primär progressive MS imitieren. Aus praktischen Gründen – z. B. aufgrund der einfachen Reproduzierbarkeit der Versuche – wird die EAE hauptsächlich in weitgehend homogenen Tieren studiert. Die genetische Heterogenität ist mitentscheidend für den Verlauf der MS. Um dieser gerecht zu werden, müssen unterschiedliche Modelle der EAE parallel untersucht werden (GOLD et al. 2006).

Um Neurodegeneration unter autoimmun-entzündlichen Bedingungen zu studieren, bietet das Rattenmodell der MOG-induzierten EAE jedoch entscheidende Vorteile. Es umfasst sowohl die enzephalitogene T-Zell-Aktivierung als auch die demyelinisierende humorale Immunantwort, die beide bei MS-Patienten vorhanden sind (STORCH et al. 1998b; STEFFERL et al. 1999). Zudem ist der axonale Schaden in der MOG-EAE qualitativ und quantitativ vergleichbar mit Ergebnissen von analysierten Hirnbiopsien verstorbener MS-Patienten (KORNEK et al. 2000). Etwa zwei Wochen nach der Immunisierung mit MOG entwickeln ca. 90 % der weiblichen *Brown Norway*-Ratten eine akute Optikusneuritis (STORCH et al. 1998b). 50 % der an einer Optikusneuritis erkrankten Menschen entwickeln im Verlauf eine manifeste MS. Bei der MOG-induzierten Optikusneuritis in *Brown Norway*-Ratten wird die entzündliche Infiltration und Demyelinisierung des Sehnerven von einer schweren axonalen Degeneration und einem fortlaufenden apoptotischen Zelltod retinaler Ganglienzellen (RGC) begleitet. Diese entstehen bereits vor der klinischen Manifestation (MEYER et al. 2001; HOBOM et al. 2004). Neben der Blindheit manifestieren sich bei den Versuchsratten in der MOG-EAE weitere klinische Symptome wie Paresen oder Ataxie – ebenfalls typische Erscheinungen der menschlichen MS.

Schlussendlich lässt sich feststellen, dass der Großteil unseres derzeitigen Wissens zu den Hauptmechanismen von Gehirnentzündungen durch Studien der EAE erschlossen wurde. Ohne dieses Wissen wäre das Verständnis der Pathogenese der MS – und folglich die Entwicklung neuer Therapieansätze – praktisch nicht durchführbar (GOLD et al. 2006).

1.2.2 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Unterform der Lichtmikroskopie. Sie wurde bei der Firma Carl Zeiss von AUGUST KÖHLER und HENRY SIEDENTOPF entwickelt (PERK 2012) und erstmals 1908 als Lumineszenzmikroskopie der Öffentlichkeit vorgestellt. Seit dem Ende der 1960er Jahre werden Fluoreszenzmikroskope in der Regel als Auflichtmikroskope gebaut. Hierbei werden die jeweiligen Objekte durch ein sammelndes optisches System (Objektiv) beleuchtet (PERK 2012). Die Auflicht- oder Fluoreszenzmikroskopie ist in der Forschung bis heute ein unverzichtbares Werkzeug. Mit Hilfe spezifischer Färbungen lassen sich bestimmte Strukturen in den Zellen identifizieren, die weit unter der Auflösungsgrenze von einfachen Lichtmikroskopen liegen.

Wenn ein elektronisch angeregtes System zurück in einen niedrigeren Energiezustand wechselt, erfolgt eine spontane Emission von Licht. Dieses Licht wird als Fluoreszenz bezeichnet. Trifft elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Anregungswellenlänge auf ein Molekül, kommt es zur Absorption von Photonen und zur Anhebung negativ geladener Elementarteilchen in ein energetisch höheres Orbital. Diesen Vorgang nennt man Anregung (VOLGGER und LICHTSCHEIDL 2008). Der Zustand mit der niedrigsten Energie ist in der Regel der stabilste, und somit geben die Moleküle nach der Energiezufuhr die überschüssige Energie in unterschiedlicher Form wieder ab (NIEDERMAYR 2010) – bspw. als Wärme oder auch als chemische und elektromagnetische Energie (entspr. dem Fluoreszenzlicht). Die angeregten Elektronen nehmen nach kurzer Zeit (10^{-8} sec bis 10^{-5} sec) wieder ihren Ausgangszustand ein. Das emittierte Licht besitzt eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht und somit eine geringere Energie (LIN-JÜLICH O. J.). Das abgestrahlte und schwache Fluoreszenzlicht im Strahlengang des Mikroskops kann mit speziellen Filtern vom hellen Anregungslicht getrennt werden. Somit werden nur noch die fluoreszierenden Objekte (Fluorochrome) betrachtet.

Die derzeit gängige Mikroskopie-Methode ist die Hellfeldmikroskopie (GERLACH 1985). Hier werden die Präparate durch Lichtabsorption bzw. gebeugtes Licht differenziert dargestellt. Das Gesichtsfeld erscheint hell, die Objektstrukturen farbig. Im Gegensatz hierzu wird in der Fluoreszenzmikroskopie der gesamte Bilduntergrund dunkel abgebildet, während die fluoreszierenden Strukturen aufleuchten (LIN-JÜLICH o. J.). Die Frage nach dem Vorhandensein einer fluoreszierenden Substanz kann nur mit Ja oder Nein beantwortet werden, was in der medizinischen Diagnostik einen erheblichen Vorteil gegenüber der Hellfeldmikroskopie darstellt. Neben der hohen Nachweisempfindlichkeit und Sensitivität gibt es jedoch auch eine Reihe von Nachteilen. Die Bestrahlung eines Fluorophors mit dem Anregungslicht führt zum Verlust der Fluoreszenz, da die Fluorophor-Moleküle durch die Belichtung zerstört werden. Dieses Phänomen nennt sich Photobleichung (SONG et al. 1995). Das Ausmaß der Photobleichung hängt von der Intensität und Energie des Anregungslichts, von der molekularen Struktur des Fluorophors und von dessen chemischer Umgebung ab. Daneben existieren Strukturen, die bei Anregung von sich aus fluoreszieren ohne zuvor speziell mit einem Farbstoff fluorochromiert worden zu sein (genannt Primär- od. Autofluoreszenzen). Diese Effekte können zu Artefakten und Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen und müssen bestmöglich minimiert werden, bspw. durch eine geringe Belichtungszeit und/oder -energie.

1.2.3 IN-VIVO-ABBILDUNG VON AXONEN DES OPTISCHEN NERVEN

Der Optische Nerv ist der zweite Hirnnerv und stellt eine Verlaufsstrecke gebündelter Nervenfasern von der Retina des Auges bis zur Sehnervenkreuzung (*Chiasma opticum*) dar. Er enthält die Axone der retinalen Ganglienzellen und transportiert die Signale der Netzhaut an die Nervenzellen im lateralen Kniehöcker (*Corpus geniculatum laterale*), von wo aus die Informationen an die primäre Sehrinde weitergeleitet werden. Der Sehnerv lässt sich in drei Teile gliedern – ein Teil ist im Augapfel gelegen (intrabulbär), ein Teil innerhalb der Augenhöhle (intraorbital) und ein Teil im Schädel (intrakraniell). Die einzelnen Nervenfasern sind von einer Myelinschicht aus Gliazellen (Oligodendrozyten) umhüllt. Diese Hülle erhöht die Nervenleitgeschwindigkeit der Nervenfasern (saltatorische Erregungsleitung). Im Zentrum des Sehnerven verlaufen die großen arteriellen und venösen Blutgefäße, die den Nerven und die inneren Netzhautschichten versorgen. Das Nervengewebe ist umgeben von der harten Hirnhaut (*Du-*

ra mater), die nahtlos in die Retina übergeht (AXENFELD et al. 1980). Erkrankungen des Sehnerven, wie die Optikusneuritis, führen zu Gesichtsfeldausfällen des betroffenen Auges. Da der Sehnerv und die Netzhaut Teile des Gehirns sind, findet nach einer Schädigung keine Regeneration durch Zellteilung statt.

Als *in-vivo* (lat. für im Lebendigen) werden in der Wissenschaft Vorgänge beschrieben, die in lebenden Organismen ablaufen. Im Gegensatz dazu stehen die *in-vitro*-Untersuchungen (lat. für im Glas), die in künstlicher Umgebung stattfinden – bspw. im Reagenzglas oder ganz allgemein außerhalb lebender Organismen. In der wissenschaftlichen Praxis dienen die *In-vivo*-Studien häufig der Überprüfung von *In-vitro*-Ergebnissen (HEININGER 1993), denn nicht alle Forschungsergebnisse, die unter Laborbedingungen *in-vitro* erforscht werden, lassen sich unter den komplexen Bedingungen im lebenden Organismus bestätigen. In fixiertem Nervengewebe verhindern Fixationsartefakte die genaue Darstellung der degenerativen Morphologie, zeitliche Veränderungen können nur sehr limitiert veranschaulicht werden.

Durch die *In-vivo*-Mikroskopie des Sehnerven ist es möglich, Neurodegeneration am lebenden Tier über mehrere Stunden zu verfolgen und Prozesse zu beobachten, die sich an einzelnen Axonen abspielen. Der Optische Nerv ist dazu prädestiniert, die Physiologie und Pathologie des Zentralen Nervensystems zu studieren. Demnach sind *In-vivo*-Aufnahmen von Axonen des Optischen Nerven die Methode der Wahl, um die Mechanismen der axonalen Degeneration zu studieren (KOCH et al. 2011).

1.3 AXONALE PATHOLOGIE IN DER MULTIPLLEN SKLEROSE

Wenn Neurologen die Kennzeichen der MS beschreiben wollen, beziehen sie sich in der Regel auf JEAN-MARTIN CHARCOT (CHARCOT 1869). Dieser fand bereits im 19. Jahrhundert Veränderungen in Plaques von MS-Patienten. Am Außenrand von Rückenmarksläsionen beschrieb er demyelinisierte Axone mit vergrößertem Durchmesser. Im Inneren einer Plaque fand er zudem lange Axonschwellungen und beschrieb teilweise zerstörte Axone, sodass er eine Axondegeneration zumindest nicht ausschließen wollte (CHARCOT 1880). Während dieser Zeit erstellte der deutsche Pathologe CARL FROMMANN eine detaillierte Beschreibung der pathologischen Veränderungen an Axonen in MS-Läsionen. Innerhalb der Läsionen käme es nicht nur zu Defekten in der Markscheide, sondern auch zu Zertrennungen der Axone. Ein Persistieren

oder Nicht-persistieren von Axonen könne demnach nicht als definitives Kriterium für die Diagnosestellung genutzt werden (FROMMANN 1878). Nach der Durchsicht vorangegangener Studienergebnisse notierte TRACY J. PUTNAM 1936, die damaligen Pathologen seien sich darin einig, dass Axone in den MS-Plaques nur selten intakt, häufig sogar völlig zerstört sein und dass die Axondegeneration in der Regel einen sekundären Prozess darstelle. Anfang des 20. Jahrhunderts war nicht nur das Vorhandensein axonaler Degeneration in den MS-Läsionen etabliert, auch Veränderungen während des axonalen Untergangs zu den unterschiedlichen Erkrankungsstadien wurden bereits beschrieben: Axonschwellungen, wechselhaft Engstellen und Erweiterungen sowie Durchtrennungen in aktiven, demyelinisierenden Läsionen und eine Abnahme der axonalen Durchmesser in chronischen Plaques. Es war eine allgemein akzeptierte Meinung, dass der Hauptteil des axonalen Schadens in den frühen Krankheitsstadien entsteht (KORNEK und LASSMANN 1999). Bis auf die morphologischen Veränderungen, war der Verlust von Axonen in MS-Läsionen um die Jahrhundertwende ein kontrovers diskutiertes Thema. Die meisten Forscher stimmten darin überein, dass einige Axone in den frühen Krankheitsstadien definitiv untergehen würden. Zudem würde die axonale Degeneration mit der Dauer der Erkrankung voranschreiten und zu ausgeprägtem Axonverlust in alten Plaques führen – mit gelegentlicher Entwicklung einer schweren Atrophie (KORNEK und LASSMANN 1999). Einige Autoren behaupteten, die Axone würden trotz der morphologischen Veränderungen nahezu komplett erhalten bleiben (HESS 1888; UHTHOFF 1889). JOSEPH BABINSKI lieferte 1885 einen ersten Ansatz bzgl. der Ätiologie von axonalen Schäden, als er die enge Assoziation zwischen dem Umfang der Entzündung und dem Grad des Axonverlustes beschrieb. Darauf folgend wiesen MAX FRAENKEL und ALFONS JAKOB 1913 auf die Assoziation zwischen akuten axonalen Veränderungen und der Makrophageninfiltration hin. Die Frage nach einer axonalen Regeneration war schon vor über 100 Jahren strittig. Teilweise wurde spekuliert, ob die Entstehung neuer Axone der Auslöser für klinische Remissionen sei und ob die degenerativen Schwellungen nicht vielmehr regenerative Phänomene sein. Eine signifikante Regeneration wurde jedoch nie allgemein akzeptiert. Neuere Studien auf diesem Gebiet trugen eine weitere Dimension zum Verständnis dieses Problems bei, indem sie exakte quantitative Daten von axonalen Schäden (FERGUSON et al. 1997; TRAPP et al. 1998) und eine direkte Korrelation mit Veränderungen von MRT-Parametern erstellten (BRUCK et al. 1997; VAN WALDERVEEN et al. 1995). Die zur Degeneration von Axonen führenden Mechanismen sind nach wie vor nicht

gänzlich entschlüsselt. Daher werden geeignete Tiermodelle verwendet, um die Pathophysiologie des axonalen Schadens zu studieren und um protektive Strategien zu testen (KORNEK und LASSMANN 1999).

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Axonale Degeneration ist ein zentrales pathologisches Kennzeichen vieler neurologischer Erkrankungen und geht häufig dem neuronalen Zelltod und den ersten klinischen Manifestationen voraus (COLEMAN 2005). Um die MS zu verstehen ist es daher unabdingbar, die axonale Degeneration genauer zu untersuchen. In diesen Versuchen wurde die *In-vivo*-Mikroskopie des Optischen Nerven – wie sie an Lewis Ratten in einem traumatischen Modell bereits angewandt wurde – in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose etabliert.

Die bisher zur Verfügung stehenden Therapien bei MS richten sich gegen die Entzündung, können den Verlust von Neuronen und Axonen jedoch nur unzureichend beeinflussen. Eine Therapie, die spezifisch hier ansetzt, ist nicht bekannt. Sie wäre aber von weittragender Bedeutung, da hiermit das Ausmaß der Behinderung bei MS-Patienten begrenzt werden könnte. Für die Entwicklung neuroprotektiver Therapien ist ein detailliertes Verständnis der zu neuronalem Zelltod führenden Mechanismen nötig, sowohl in der MS als auch in seinem Tiermodell EAE.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit liegt in der Quantifizierung der akuten Axondegeneration im Tiermodell der MS. Darüber hinaus möchten wir die fluoreszenzmikroskopisch-morphologischen Veränderungen an den degenerierenden Axonen genauer untersuchen. Hierzu sollen die Versuche zunächst zeigen, ob es generell möglich ist, Axone des Optischen Nerven im Rahmen der EAE an lebenden Ratten über einen Zeitraum von sechs Stunden fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Gelingt dies, sollen die morphologischen, neurodegenerativen Veränderungen an den einzelnen Axonen dargestellt und quantifiziert werden. Ferner sollen mögliche Unterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der MOG-EAE ermittelt werden. Da der Ablauf der Neurodegeneration nach wie vor nicht sicher geklärt ist, möchten wir die zeitlichen Abläufe sowie die Ausprägung des Axonzerfalls im Rahmen der EAE genauer untersuchen. Hierzu sollen die Resultate aus den fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen und den histopathologischen Färbungen mit einfließen. Sofern es überdies

gelingen sollte, einzelne, zunächst intakte Axone am Beginn ihres Degenerationsprozesses darzustellen, soll außerdem die Änderung ihrer axonalen Integrität über eine Zeitdauer von mehreren Stunden gemessen werden. Schlussendlich stellt sich die Frage, inwieweit allein die Präparation des Optischen Nerven zu einer Axondegeneration beiträgt. Hierfür werden scheinimmunisierte Kontrolltiere untersucht. Über immunhistologische Färbungen sollen zudem die Infiltration von Makrophagen und T-Lymphozyten, der akute und chronische axonale Schaden und das Ausmaß der Demyelinisierung, sowohl der operativ freigelegten als auch der gegenüberliegenden Nerven, immunhistochemisch untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALEN ZUR DURCHFÜHRUNG DER TIEREXPERIMENTELLEN UNTERSUCHUNGEN

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Sigma (Seelze, D.), Merck (Darmstadt, D.) oder Roth (Karlsruhe, D.) bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Plastik-Verbrauchsmaterialien, Zellstofftupfer etc. wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Braun (Melsungen, D.), Eppendorf (Hamburg, D.) oder Roth (Karlsruhe, D.) bezogen.

2.1.1 REAGENZIEN

CHEMIKALIE	BEZUGSQUELLE
Isofluran	Abbot GmbH & Co. KG, Mannheim, D.
SDS	Merck KGaA, Darmstadt, D.
MOG	CHRISTINE STADELMANN, Göttingen, D.
Freud's Adjuvant, <i>Incomplete</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D.
Ringer-Injektionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D.
NaCl (Natriumchlorid)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D.
HCl (Salzsäure)	Merck KGaA, Darmstadt, D. Sigma-Aldrich
NaOH (Natriummonoxid)	Chemie GmbH, Steinheim, D.
Glucose/Sterofundin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D.
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, D.

TAB 2.1: REAGENZIEN FÜR DIE *IN-VIVO*-MIKROSKOPIE

CHEMIKALIE	BEZUGSQUELLE
Ammoniak 32 %	Merck KGaA, Darmstadt, D. Sigma-Aldrich
BSA	Chemie GmbH, Steinheim, D. Merck KGaA,
Citratpuffer (Citronsäure)	Darmstadt, D.
Einschlussmittel Roti® Histokitt II	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Essigsäure/Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Ethanol (reinst)	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Ethanol (vergällt)	Chemie-Vertrieb, Hannover, D.
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Hämalaun	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Lithiumcarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D.
Perjodsäurelösung 1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D.
<i>Sepharose Fast Flow</i>	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Salpetersäure 65 %	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Salzsäure, rauchend 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D.
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
<i>Solvent Blue 38</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D.
Natriumthiosulfat 2 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D.
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Pferdeserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

TAB 2.2: REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN

2.1.2 LÖSUNGEN UND PUFFER

LÖSUNG/PUFFER	ENTHALTENE CHEMIKALIEN
<i>PBS (Phosphate-Buffered Saline)</i>	138 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 2 mM Potassiumphosphat
PFA (Paraformaldehyd) 4 %	PFA gelöst in PBS, <i>pH</i> 7,4
Ketamin/Xylazin-Lösung	Ketamin (95 mg kg ⁻¹ Körpergewicht) Xylazin (7 mg kg ⁻¹ Körpergewicht)
<i>LFB-Lösung</i> (<i>Luxol Fast Blue-Lösung</i>)	1g <i>LFB</i> (=solvent blue 38) 1000 ml EtOH (Ethanol) 96 % (v/v) 0,5 ml Eisessig
Entwickler für Bielschowsky-Silberfärbung	10 ml Formalin 50 ml Aqua dest. 1,3 mM Citronensäure 2 Tropfen 65 % Salpetersäure
Silbernitrat 20 %	10 g Silbernitrat in 50 ml Aqua dest.
Citratpuffer	0,2 %, <i>pH</i> 6,0
Pferdeserum/ <i>PBS</i> /BSA-Lösung	10 % Pferdeserum 2 % BSA in <i>PBS</i>
<i>PBS</i> /Wasserstoffperoxid-Lösung	45 ml <i>PBS</i> 5 ml 30 % Wasserstoffperoxid

TAB 2.3: LÖSUNGEN UND PUFFER

2.1.3 MIKROORGANISMEN

MIKROORGANISMUS	BEZUGSQUELLE
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Hitze-inaktiviert (H37 RA)	Difco Laboratories, Detroit, USA

TAB 2.4: MIKROORGANISMEN

2.1.4 ANTIKÖRPER

ANTI KÖRPER	SPEZIES	VERDÜNNUNG	BEZUGSQUELLE
α - β -APP IgG	Maus	1:1000	Millipore, Billerica, USA Biozol
α -CD3	Maus	1:500	Diagnostica, Eching, D.
α -ED1 (Anti Ratte, CD68)	Maus	1:500	Serotec, Oxford, UK

TAB 2.5: PRIMÄRANTI KÖRPER

ANTI KÖRPER	KONJUGAT	SPEZIES	VERDÜNNUNG	BEZUGSQUELLE
α -Maus	Biotin	Pferd	1:200	Vector, Burlingame, CA, USA

TAB 2.6: SEKUNDÄRANTI KÖRPER

2.1.5 KITS

KIT	BEZUGSQUELLE
Diaminobenzidin-Kit (DAB)	Vector, Burlingame, CA, USA
Vectastain ABC-Kit	Vector, Burlingame, CA, USA

TAB 2.7: KITS

2.1.6 EQUIPMENT

MATERIAL	BEZUGSQUELLE
Bohrer	Proxxon, Föhren, D.
Netzgerät für Bohrer (<i>Micromot NG 2/S</i>)	Proxxon, Föhren, D.
Hamilton Spritze (<i>model 701 RN, 26s gauge/51 mm</i>)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Spritze (1 ml) für i. p. Anästhesie (<i>Omnian 40 30G x ½ in</i>)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D.
Rattenkopfhalter (<i>RA-6N rat head holding adaptor,</i> fixiert auf einem Plastikbrett)	Narishige
5 Operationshaken	Sonderanfertigung
Skalpell (<i>size 10</i>)	Bard-Parker, Caledonia
Pinzette (<i>Dumont no. 5 mirror finish forceps</i>)	Fine Science Tools, Heidelberg, D.
Federschere für Nervenpräparation (<i>Cohan-Vannas</i> <i>spring scissors – 6 mm blades</i>)	Fine Science Tools, Heidelberg, D.
Thermokoagulator	Aaron Medical Industries, St. Petersburg, Russland
Heizpad (<i>Homeothermic Warming System,</i> <i>Serial # SB0621</i>)	Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
Pulsoxymeter (Model 2500A VET)	Nonin Medical, INC. Plymouth, MN USA
Stereomikroskop (f170) Fluoreszenzmikroskop (<i>Examiner.Z1</i>) Objektivwärmer (<i>tempcontrol</i> <i>mini</i>) Rattenpositionierer (<i>Typ SCAN 100x100 – 2</i> <i>mm</i>) Personal Computer (<i>Z800 Workstation</i>)	Carl Zeiss, Jena, D. Carl Zeiss, Jena, D.
<i>Software</i> für Bilderaufnahmen (<i>Zen 2011</i>)	Pecon GmbH, Langenhagen, D.
Schlauchpumpe	Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, D.
	HP Company, Palo Alto, USA
	Carl Zeiss, Jena, D.
	IDEX Health & Science,
	Wertheim, D.

Mikroskop für die Retinapräparation (Stemi 2000)	Carl Zeiss, Jena, D.
Schlittenmikrotom (SM2000 R)	Leica, Solms, D.
Waage (BL 210 S)	Sartorius, Göttingen, D.
AxioVision SE64 Rel.4.8	Carl Zeiss, Jena, D.
Corel Draw	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
ImageJ	http://imagej.nih.gov/ij/download.html
Wasserbad	Karlheinz Dosch, Heidelberg, D.
Wasserimmersionsobjektiv (W Plan-APOCHOMAT)	Carl Zeiss, Jena, D.
Kamera (AxioCam MRm)	Carl Zeiss, Jena, D.
Objektivzählplatte (PI 10x/18; 44 41 32)	Carl Zeiss, Jena, D.

TAB 2.8: EQUIPMENT

2.1.7 VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden acht bis zehn Wochen alte weibliche Ratten der Rasse *Brown-Norway* aus der Zucht der Charles River GmbH in Sulzfeld verwendet. Die Tiere wurden unter kontrollierten und artgerechten Umweltbedingungen unter Ausschluss von Pathogenen gehalten und täglich von Tierpflegern vor Ort versorgt. Die Ausnahmegenehmigung zur Durchführung von Eingriffen an Wirbeltieren wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) erteilt. Relevante Gesetze und institutionelle Richtlinien wurden befolgt. Die Nummer des Tierversuchsantrags (TVA-Nummer) lautet: G11.474.

2.1.8 IMMUNOGEN

Zur Induktion der EAE wurde das rekombinante Ratten-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein_{Igd} (rrMOG_{Igd}) verwendet, welches von CHRISTINE STADELMANN (Abt. Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde. Es entspricht der N-terminalen Aminosäuresequenz von rrMOG_{Igd} (Aminosäure 1-125). Die Expression des Proteins fand in

Escheria coli statt und wurde mit Hilfe einer Metallchelatchromatographie aufgereinigt (WEISERT et al. 1998). Hierbei wurde das Produkt zur Homogenität durch den Einsatz des Komplexbildners *Sepharose Fast Flow* in 8 M Harnstoff gereinigt, wobei ein kontinuierlicher *pH*-Gradient verwendet wurde (AMOR et al. 1994). Anschließend wurde das Protein in 6 M Harnstoff gelöst, gegen 0,01 % Natriumacetat dialysiert und schließlich bei einer Temperatur von - 80 °C gelagert (SCHEUMANN 2010).

Zur Immunisierung erfolgte eine Emulgierung von 100 µg rrMOG_{Igd} in *PBS*. Abschließend wurde die Emulsion mit komplettem Freud's Adjuvant (inkomplettes Freud's Adjuvant + 200 µg Hitze-inaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis*) der gleichen Menge vermischt (SCHEUMANN 2010).

2.1.9 VIRALER VEKTOR UND FLUORESZENZ-FARBSTOFF

Als viraler Vektor für die Expression der Fluoreszenz-Proteine wurde der Serotyp 1/2 eines Adeno-assoziierten Virus (AAV-1/2) verwendet, da dieses nahezu ausschließlich selektiv retinale Ganglienzellen transduziert. Das Virus wurde freundlicherweise von UWE MICHEL (Abt. Neurologie der UMG) zur Verfügung gestellt. Die Plasmidkarte des Virus mit dem Fluoreszenzfarbstoff mCherry ist nachfolgend dargestellt:

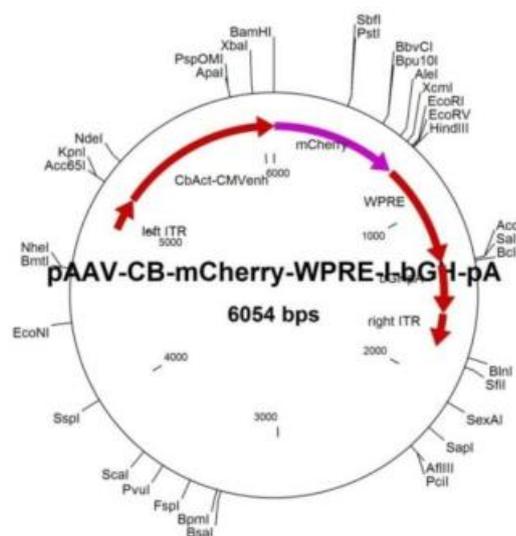


ABB 2.1: PLASMIDKARTE AAV-1/2 MIT DEM FLUORESZENZFARBSTOFF MCHERRY

2.2 DURCHFÜHRUNG DER TIEREXPERIMENTELLEN UNTERSUCHUNGEN

2.2.1 VERSUCHSAUFBAU

Zur Untersuchung von neurodegenerativen Prozessen wurde eine Versuchsreihe mit 25 *Brown Norway*-Ratten geplant. Die Tiere wurden zufällig einer von fünf Gruppen zugeteilt, wobei jede Gruppe einem unterschiedlichen Zeitpunkt der EAE entsprach. Demnach wurde jeweils eine Gruppe am Tag 8, 10, 12 und 14 nach Induktion der MOG-EAE (*p. i.; post injectionem*) untersucht. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine Scheinimmunisierung und prägten keine Symptome der EAE aus. Jeder Ratte wurde eine Nummer zugeteilt, die keinen Rückschluss auf den Untersuchungszeitpunkt erlaubte. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte blind und objektiv. Es wurde nur der linke der beiden Optischen Nerven operativ freipräpariert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Von diesen Optischen Nerven wurden jeweils sieben fluoreszenzmikroskopische Bilder aufgenommen – ein Bild unmittelbar nach der Beendigung der Operation und anschließend ein Bild stündlich für sechs aufeinanderfolgende Stunden. Anschließend wurden die Optischen Nerven beider Augen für die Durchführung histopathologischer Untersuchungen entnommen. Mit Hilfe spezieller Färbetechniken konnte das Ausmaß der Demyelinisierung, der Makrophagen- und T-Lymphozyteninfiltration sowie des akuten und chronischen axonalen Schadens ermittelt und objektiviert werden. Die unterschiedliche Ausprägung der EAE bei verschiedenen Tieren ist eine entscheidende Variable in der Beurteilung des Grades der Axondegeneration. Um diesem Umstand gerecht zu werden, wurden der linke und der rechte Nerv separat untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Der genaue Ablauf der Untersuchungen wird im Folgenden beschrieben.

2.2.2 IN-VIVO-MIKROSKOPIE

2.2.2.1 INTRAVITREALE INJEKTION DES VIRALEN VEKTORS

Die Axone wurden durch die intravitreale Injektion eines viralen Vektors markiert, der nachfolgend zu einer Expression von Fluoreszenzproteinen in den RGC führte. Die Zeit bis zur viralen Transduktion der RGC betrug ca. zwei Wochen. Nach Ablauf dieser Zeit konnten die Axo-

ne fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Auf der Basis bisheriger Erfahrungen ist die transgene Expression durch das AAV mindestens ein Jahr anhaltend (KOCH et al. 2011). Die Ratten wurden zwecks Anästhesie und Ruhigstellung, durchgängig mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran anästhesiert – sowohl unmittelbar vor als auch während der Injektion des viralen Vektors. Eine Hamilton Spritze wurde 2 mm hinter den unteren temporalen Limbus eingeführt und innerhalb des Glaskörpers zum oberen nasalen Quadranten der Retina vorgeschoben. Anschließend wurden 4 µl der AAV-Lösung langsam injiziert. Die Spritze wurde nach der Verwendung mit SDS, EtOH 70 % (v/v) und Aqua dest. von Resten des Virus gereinigt und desinfiziert. Die intravitreale Injektion der Vektoren stellte einen kleinen Eingriff ohne systemische Auswirkungen dar, es entstand kein sichtbarer Schaden an den behandelten Augen.

2.2.2.2 INDUKTION DER MOG-EAE

Nachdem die Tiere mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran anästhesiert wurden, konnten 200 µl der rrMOG_{1gD}-Lösung in das proximale Ende des Rattenschwanzes injiziert werden. Die Kontrolltiere erhielten dagegen eine Scheinimmunisierung. Der Eingriff dauerte ca. 30 sec pro Tier, die Ratten erwachten nach etwa einer Minute und zeigten keine Auffälligkeiten. Es handelte sich insgesamt um eine geringe Belastung für die Tiere. Im Verlauf der folgenden Tage entwickelte sich gelegentlich ein Ulcus am Schwanz, das in den meisten Fällen folgenlos ausheilte.

2.2.2.3 BEURTEILUNG DES KRANKHEITSVERLAUFS UND AUSSCHLUSSKRITERIEN

Die Versuchstiere wurden zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs täglich gewogen und nach klinischen Zeichen der EAE bewertet. Diese werden in der nachfolgenden **TAB 2.9** beschrieben.

PUNKTE	SYMPTOME
0	keine Symptome
0,5	Parese am distalen Schwanz
1	Paralyse des gesamten Schwanzes
1,5	Parese des gesamten Schwanzes und milde Form der Hinterbeinparese
2	unilaterale, schwere Hinterbeinparese
2,5	bilaterale, schwere Hinterbeinparese
3	komplette, bilaterale Hinterbeinparalyse
3,5	komplette, bilaterale Hinterbeinparalyse und Parese eines Vorderbeines
4	komplette Paralyse (Tetraplegie) oder Tod im Rahmen der EAE

TAB 2.9: BEWERTUNGSSKALA DER KLINISCHEN SYMPTOME

Die ersten Symptome traten zwischen Tag 9 und 12 nach der MOG-Immunisierung auf, wobei es neben Paresen zu Ataxie kommen konnte. Sofern die Tiere einen Gewichtsverlust erlitten, erhielten sie eine subkutane Glucose/Sterofundin-Injektion. Zu den Ausschlusskriterien zählten ein Gewichtsverlust von 20 % gegenüber dem maximal zuvor gemessenen Gewicht und/oder das Erreichen von 3,5 Punkten im o.g. *Score* und/oder eine schwere Ataxie – jeweils anhaltend für mind. 48 Stunden. Demzufolge verblieb kein Tier mit Lähmungen der Vorderbeine im Experiment. Die Lähmung der Hinterbeine konnte erfahrungsgemäß durch die Platzierung von Futter in Bodennähe gut kompensiert werden. Relevant bzgl. des Allgemeinzustandes der Ratten war vor allem der Gewichtsverlust, den auch Tiere mit vergleichsweise schwach ausgeprägten Paresen erlitten. Ebenfalls aus der Auswertung genommen wurden Tiere, die vor Beendigung der *Live*-Aufnahmen verstarben. Gründe hierfür waren u. a. Komplikationen während der Anästhesie oder der Präparation der Nerven. Auch eine mangelhafte Bildqualität führte zum Ausschluss aus den Experimenten.

2.2.2.4 PRÄPARATION DES OPTISCHEN NERVEN

Das Versuchstier wurde durch eine intraperitoneale Injektion einer Ketamin/Xylazin-Lösung tief anästhesiert und für 15 min in einen dunkel gehaltenen Käfig gelegt. Anschließend wurde eine nicht-invasive Puls- und Sauerstoffmessung angeschlossen und die Tiefe der Narkose mittels Schmerz-Test klinisch überwacht. Um die Narkose aufrecht zu erhalten wurde jede Stunde ein Drittel der o. g. Ketamin/Xylazin-Lösung mit NaCl im Verhältnis 1:5 vermischt und intraperitoneal verabreicht. Bei mangelnder Narkosetiefe – anhand Klinik, Puls- oder Sauerstoffmessung – wurde frühzeitig nachanästhesiert. Anschließend konnte die Ratte in den Kopfhalter eingespannt werden. Eine Wärmeverrichtung maß über einen rektalen Zugang kontinuierlich die Körpertemperatur und hielt das Tier auf konstant 37 °C. Für gelegentliche Spülungen des Operationsgebiets wurde eine Ringerlösung in einem Wasserbad ebenfalls auf 37 °C gehalten.

Zu Beginn der Operation wurde das Kopffell zwischen den Augen mit Hilfe einer kleinen Haarschere entfernt und das Gebiet mit einer 70 % Ethanol-Lösung desinfiziert. Mit einem Skalpell wurde ein 2,5 cm langer rostrokaudaler Hautschnitt mittig der beiden Augen durchgeführt, der 1 cm rostral einer gedachten Linie zwischen den Augen ansetzte. Um einen besseren Blick auf das Operationsgebiet zu ermöglichen, wurde das Tier um ca. 30° zur rechten Seite gekippt. Durch Zug an vier Haken wurde die Haut zu beiden Seiten auseinandergezogen, um das Operationsgebiet offenzuhalten. Das Bindegewebe wurde anschließend mit einem Thermokoagulator entlang des kranialen Randes der Orbita zertrennt, bis die Tränendrüse sichtbar wurde. Diese wurde als Vorbereitung für den nachfolgenden Schritt mit Zellstofftupfern bedeckt. Um ausreichend Platz für das Objektiv des Fluoreszenzmikroskops zu schaffen, wurde mit einem Bohrer der vorstehende Teil des kranialen Orbitalandes abgeschliffen. Die Zellstofftupfer wurden entfernt und das Operationsgebiet mehrfach mit Ringerlösung gespült. Der *Nervus-* und die *Vena supraorbitales*, die an der kaudalen Spitze der Tränendrüse verlaufen, wurden mit dem Thermokoagulator zertrennt. Die Tränendrüse konnte dann mit einer Pinzette nach kaudal gezogen und mit dem Thermokoagulator horizontal mittig durchtrennt werden. Um den *Musculus rectus superior* freizulegen, wurde der darüberliegende *Musculus levator palpebrae superioris* mit Hilfe zweier Pinzetten stumpf zertrennt. Anschließend wurde der *Musculus rectus superior* gefasst und so weit nach oben gezogen, bis

dieser sich von seinem sehnigen Ursprung löste. Daraufhin wurde der Muskel an der lateralen Seite der Ratte platziert, wodurch sich der Bulbus nach unten drehte. Um den Bulbus in dieser Position zu fixieren, wurde ein fünfter Haken in unmittelbarer Nähe des Ansatzes des *Musculus rectus superior* angebracht. Die vier weiteren Haken wurden nun entfernt. Alle folgenden Schritte mussten mit besonderer Sorgfalt durchgeführt werden, da eine Verletzung des Optischen Nerven den sofortigen Abbruch des Experiments zur Folge gehabt hätte. Der Nerv ist in Binde- und Fettgewebe eingebettet. Mit zwei stumpfen Pinzetten wurde dieses vorsichtig und Schicht für Schicht entfernt. Dann wurde mit einer kleinen Federschere ein Längsschnitt in die den Nerven umgebende *Dura mater*, parallel zu der *Arteria-* und *Vena ophthalmica*, geschnitten. Hierbei durften die Blutgefäße keinesfalls verletzt werden, da eine retinale Ischämie zur Degeneration der Axone hätte beitragen können. Um den Nerven an dieser Stelle vollends freizulegen, wurde die *Dura mater* daraufhin, zusammen mit den ophthalmischen Blutgefäßen, zu beiden Seiten des Nerven verlagert. Nach dem Durchspülen mit der Ringerlösung aus dem Wasserbad, wurde der Trägertisch samt narkotisierter Ratte in der Halte- und Wärmeverrichtung unter dem Objektiv des Fluoreszenzmikroskops befestigt. Schließlich konnten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe eines speziellen Wasserimmersionsobjektives durchgeführt werden (s. **ABB 2.4**, S. 30).



ABB 2.2: OPERATIONSEQUIPMENT

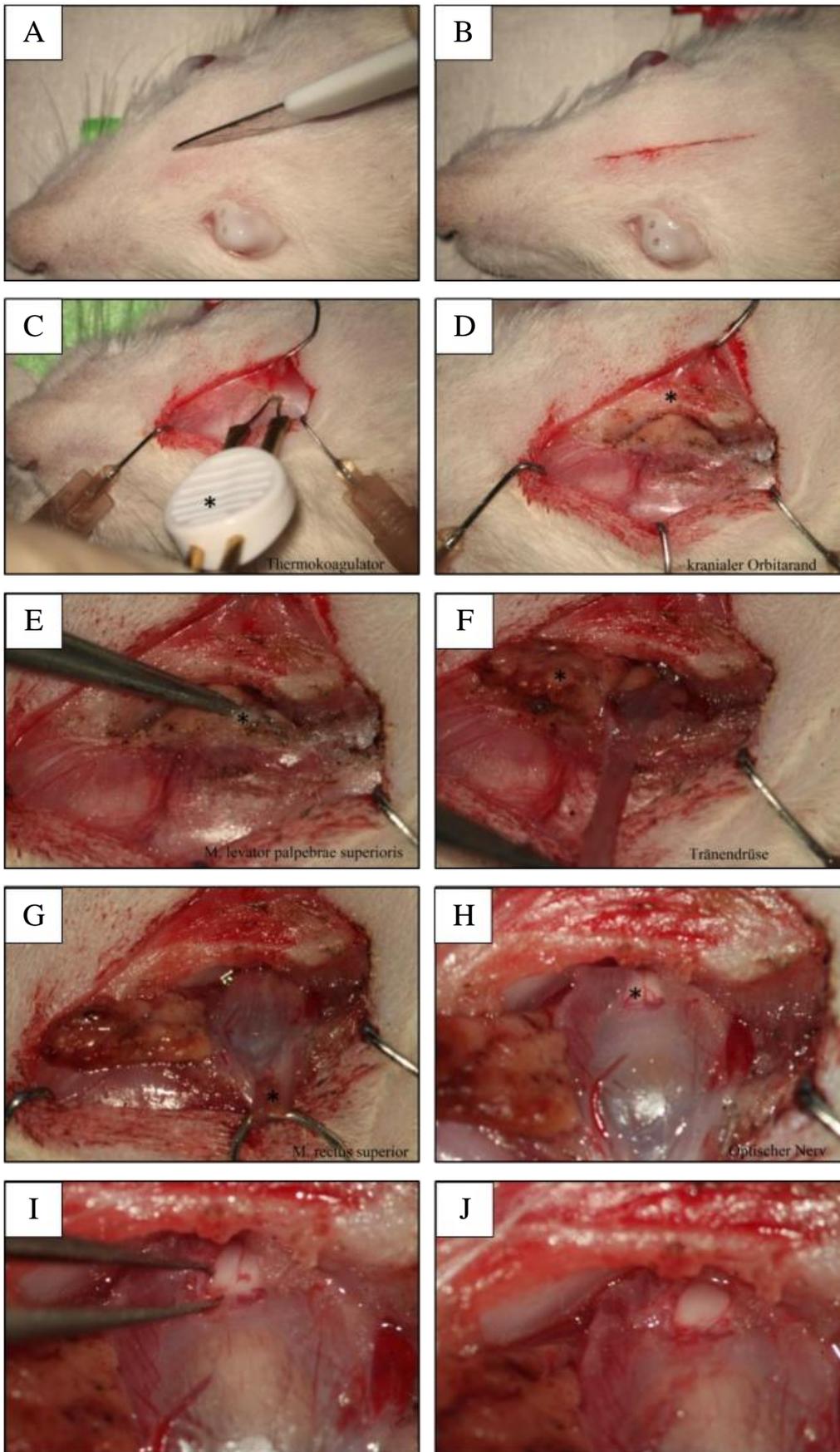


ABB 2.3: PRÄPARATION DES OPTISCHEN NERVEN

2.2.2.5 AUFNAHME DER AXONE UND NACHBEARBEITUNG DER BILDER

Durch die *In-vivo*-Mikroskopie des Sehnerven ist es möglich, Neurodegeneration am lebenden Tier über mehrere Stunden zu verfolgen und Prozesse zu beobachten, die sich währenddessen an einzelnen Axonen abspielen. Um die Ergebnisse der Aufnahmen später vergleichen zu können, wurde stets der gleiche Bereich der Optischen Nerven belichtet. Dieser befand sich unmittelbar am Eintritt des Nerven in den *Bulbus oculi*. Die Bilder wurden mit der Mikroskopie-Software ZEN der Firma Carl Zeiss aufgenommen. Um den Verlauf der Axone in den konvex gekrümmten Nerven darstellen zu können, wurden Schichtbilder von 50 bis 150 einzelnen Bildern in einem Abstand von 1 μm zueinander aufgenommen (s. **ABB 2.6**, S. 30). Hierzu wurden via *Z-Stacks* die Ober- und Untergrenze (*X- und Y-Stacks*) des Nerven ermittelt. Nach der Aufnahme wurden Störfaktoren aus dem Hintergrund im Histogramm über den Button „*Best fit*“ minimiert.

Der Verlauf einzelner Axone innerhalb des Optischen Nerven ist sehr variabel. Dies ist schematisch auf der **ABB 2.6** (S. 30) dargestellt. Um jedoch die Anzahl und die Veränderungen beurteilen zu können – bspw. eine beginnende Degeneration von Axonen – mussten die in unterschiedlichen Ebenen verlaufenden Axone auf einer zweidimensionalen Ebene dargestellt werden. Dies gelang durch einen ZVI-Export der Carl Zeiss *Image*-Bilddateien (.czi) mit der Software ZEN und der anschließenden Bildbearbeitung mit der Software AxioVision. Die jeweils sieben 2D-Bilder jedes Nerven wurden anschließend als JPEG exportiert und zur weiteren Analyse in das Grafikprogramm Coral Draw eingepflegt. Über Anwendung des *Plugins* NeuronJ der Bildverarbeitungs-Software ImageJ wurden die einzelnen Axone schließlich gezählt und -gemessen.

Die **ABB 2.2**, **ABB 2.3** sowie die nachfolgenden **ABB 2.4**, **ABB 2.5** und **ABB 2.6** wurden freundlicherweise von JAN KOCH (Abt. Neurologie der UMG) zur Verfügung gestellt. Die Abbildungen zeigen Bilder von Lewis-Ratten als Versuchstiere. Für diese Arbeit wurde das gleiche Verfahren angewandt, es wurden jedoch *Brown Norway*-Ratten verwendet.

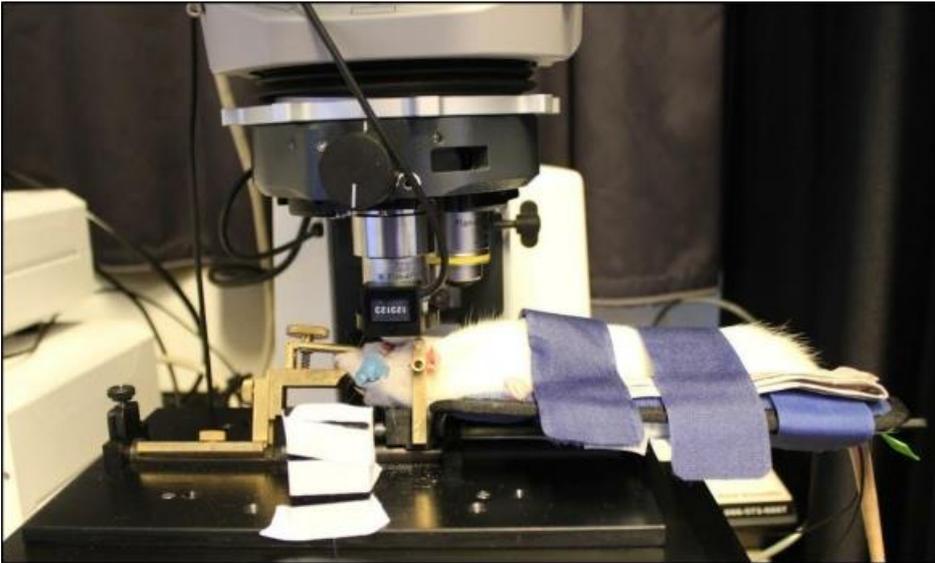


ABB 2.4: VERSUCHSTIER UNTER DEM MIKROSKOP

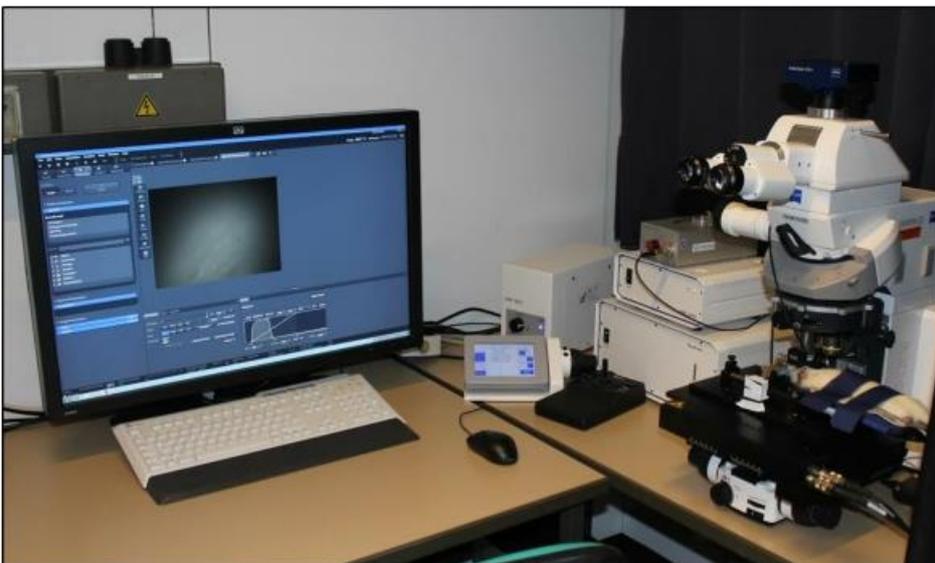


ABB 2.5: *IN-VIVO*-MIKROSKOPIE

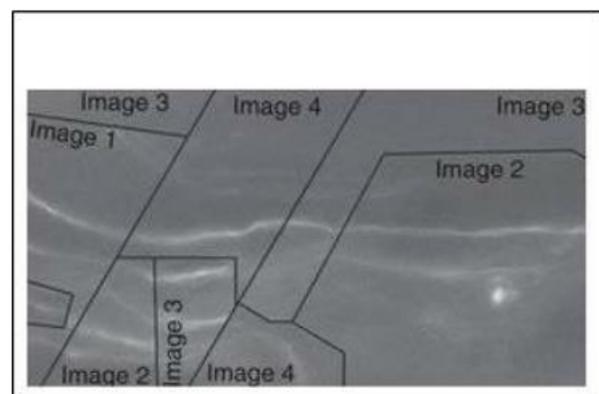
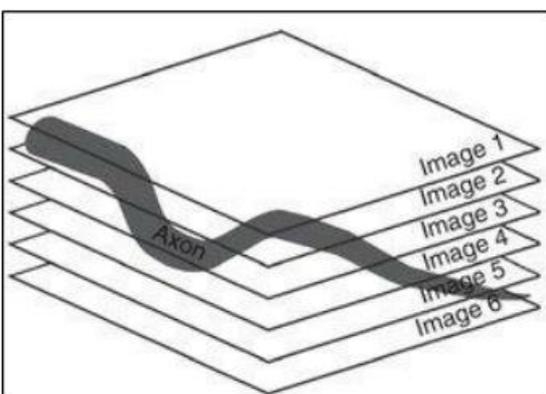


ABB 2.6: SCHEMATISCHER VERLAUF EINES AXONS

2.2.2.6 AUSWERTUNG DER *IN-VIVO*-MIKROSKOPIE

Der erste Teil der Auswertung bezieht sich auf die Anzahl sowohl der intakten als auch der bereits degenerierten Axone zum Zeitpunkt Null (unmittelbar nach der operativen Freilegung der Optischen Nerven). Ausschließlich diese Axone wurden im weiteren Verlauf auf degenerative Veränderungen hin untersucht. Axone, die sich erst im Verlauf darstellen ließen, wurden in der Statistik nicht berücksichtigt.

Die Axone wurden zu Beginn der Aufnahmen in die Untergruppen „intakte Axone gut darstellbar“, „intakte Axone teilweise darstellbar“, „degenerierte Axone gut darstellbar“ und „degenerierte Axone teilweise darstellbar“ aufgeteilt. Aufgrund des Effekts der Photobleichung (s. **KAP 1.2.2**, S. 10 f.) wurde die Anzahl der Anregungs- und Emissionszyklen auf sieben begrenzt. Nach jeder der sechs Stunden (Zeitpunkte Eins bis Sechs) wurde überprüft, inwieweit die zum Zeitpunkt Null noch intakten Axone „gut darstellbar“, „teilweise darstellbar“ oder „nicht mehr darstellbar“ waren. Zunächst intakte Axone, die im Verlauf Degenerationserscheinungen zeigten, wurden der Gruppe „Degeneration beginnt“ zugeordnet.

Die zum Zeitpunkt Null bereits degenerierten bzw. noch degenerierenden Axone wurden, äquivalent zu den intakten Axonen, zu jeder Stunde in „gut darstellbar“, „teilweise darstellbar“ und „nicht mehr darstellbar“ eingruppiert (s. **KAP 3.2.1**, S. 46 ff.).

Versuche, bei denen aufgrund mangelhafter Bildqualität vor Abschluss der Aufnahmen keine Axone mehr darstellbar waren, wurden aus der Wertung gestrichen.

Da es aufgrund der zum Teil sehr großen Anzahl an sichtbaren Axonen häufig nicht möglich war sämtliche Axone eindeutig voneinander abzugrenzen (s. bspw. Bild C der **ABB 2.7**, S. 33), musste der Anteil der bereits degenerierten Axone abgeschätzt werden. Hierfür wurde der nachfolgende fluoreszenzmikroskopische *Score* verwendet. Der *Score* bezieht sich ausschließlich auf die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zum Zeitpunkt Null.

PUNKTE	ANTEIL DER DEGENERATION
0	Keine Degeneration: Eindeutig nur intakte Axone; ggf. einige Strukturen, die eher keine degenerierten Axone darstellen
1	< 10 % Degeneration: Degeneration an einzelnen Axonen und in sehr geringem Umfang
2	10-50 % Degeneration: Anzahl der degenerierten Axone kann nicht sicher bestimmt werden; intakte Axone sind eindeutig in der Mehrzahl
3	> 50-90 % Degeneration: Der Großteil der Axone ist degeneriert; einige Axone sind noch eindeutig morphologisch intakt
4	> 90 % Degeneration: V. a. Axonfragmente und Degenerationsabbauprodukte; intakte Strukturen sind allenfalls teilweise zu erkennen

TAB 2.10: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHER SCORE

Die **ABB 2.7** zeigt vier unterschiedliche Optische Nerven, die einen von A bis D ansteigendes Ausmaß der Axondegeneration aufweisen. Die Axone auf dem Bild A erscheinen völlig intakt, auf dem Bild B findet sich eine mäßige Degeneration, Bild C zeigt deutliche Zerfallszeichen mit teilweise intakten Axonen und Bild D nahezu ausschließlich Axonrümmmer.

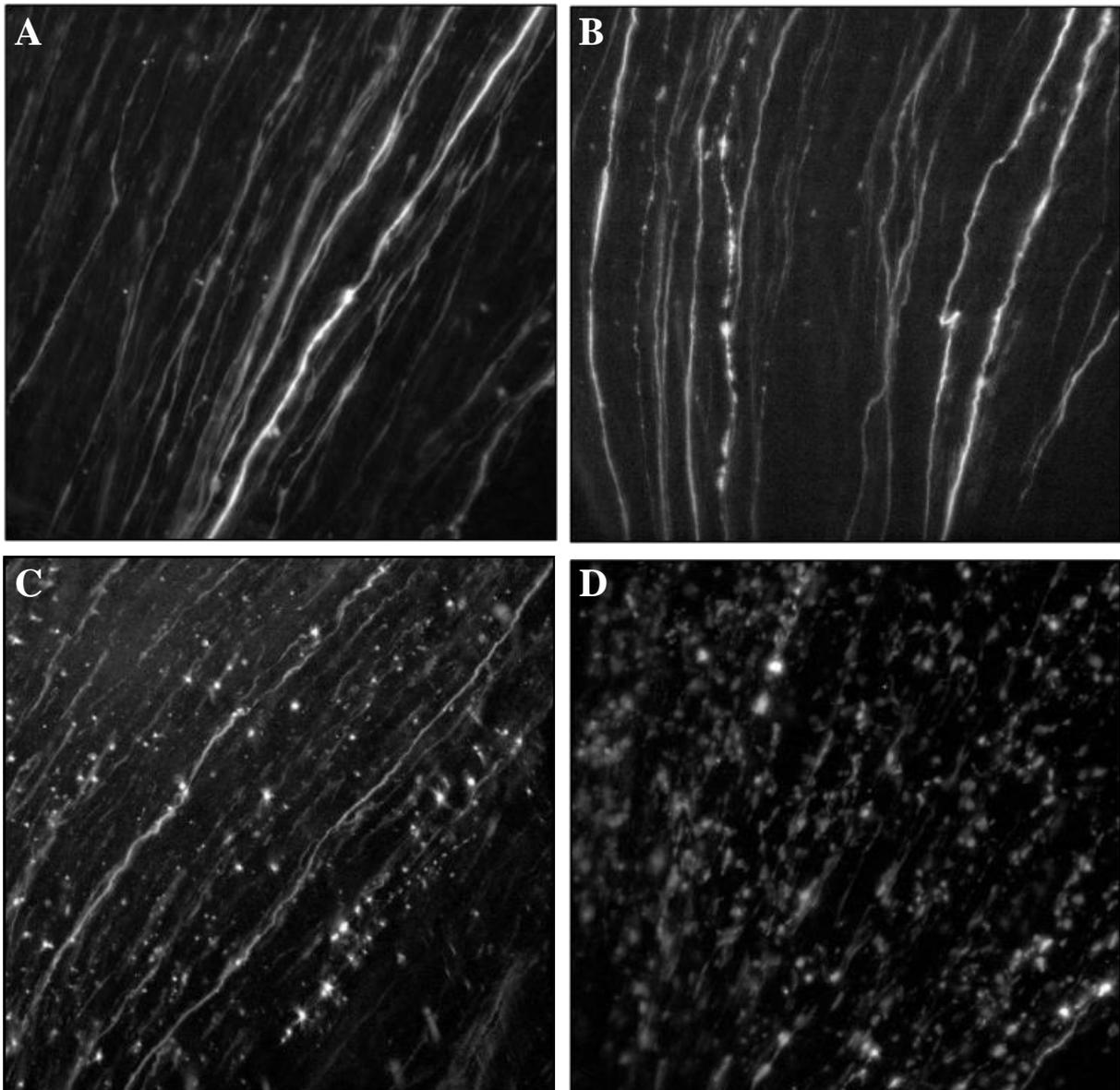


ABB 2.7: BEISPIELBILDER – VERSCHIEDENE ERKRANKUNGSSTADIEN

Die nachfolgenden Beispielbilder der **ABB 2.8** (S. 34) zeigen die Veränderungen von Axonen eines Optischen Nerven im Zeitverlauf von sechs Stunden. Das Bild A entspricht dem Zeitpunkt Null, alle weiteren Bilder wurden jeweils stündlich aufeinanderfolgend aufgenommen.

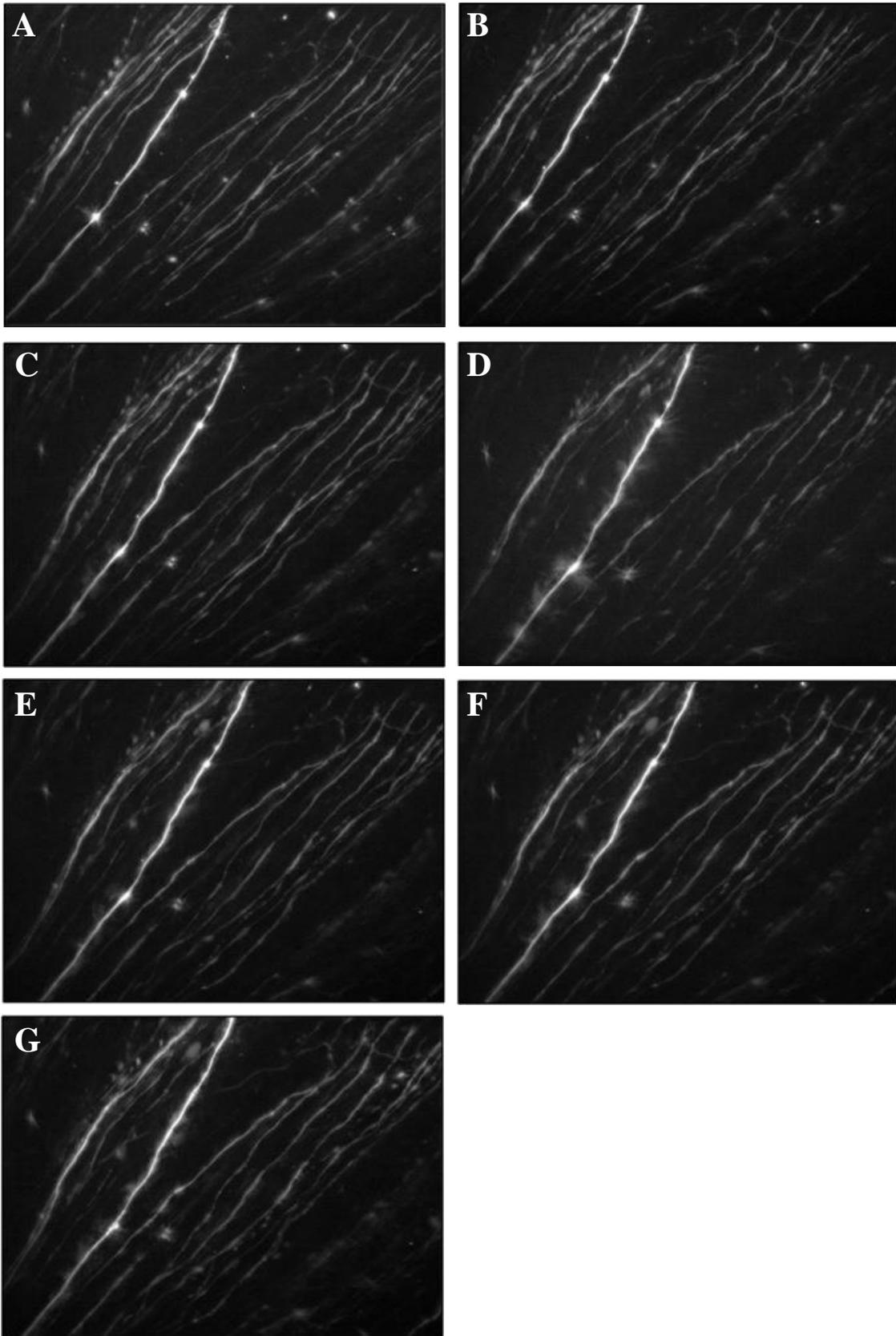


ABB 2.8: BEISPIELBILDER – AXONE IM ZEITVERLAUF

Die **ABB 2.9** zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Axonen eines Optischen Nerven im Abstand von jeweils einer Stunde. Die wiederholte Belichtung führte zu einer zunehmenden Zerstörung der Fluorophor-Moleküle – die Bildqualität verschlechterte sich infolgedessen mit jeder Aufnahme. Eine deutlich ausgeprägte Photobleichung führte zum Ausschluss aus dem Experiment (s. **KAP 2.2.2.3**, S. 25)

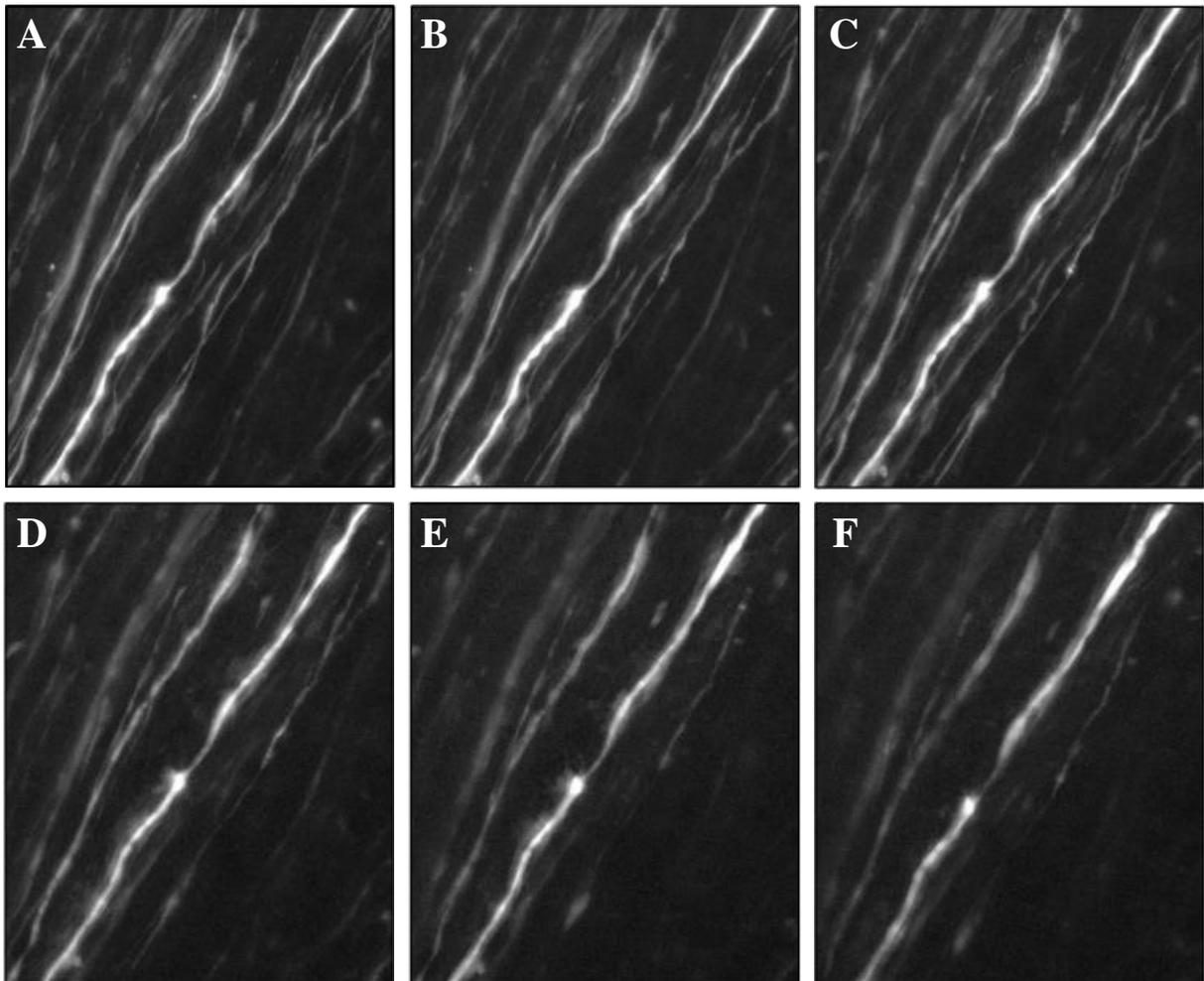


ABB 2.9: BEISPIELBILDER – PHOTBLEICHUNG

Ein weiterer Teil der Auswertung betraf die Ausmessung derjenigen Axone, die sich zunächst in einem morphologisch intakten Zustand befanden und über die Dauer der Aufnahmen zunehmend degenerierten. Mit der *Software* ImageJ konnte die die Länge der betreffenden Axone ausgemessen werden. Die Auswertung der Degeneration betrifft die Anzahl und Länge der einzelnen Fragmente sowie die Gesamtlänge der noch darstellbaren Axonanteile.

Die **ABB 2.10** zeigt ein Axon, das während der Aufnahmen zunehmend degenerierte. Die Bilder A bis C zeigen Originalaufnahmen, auf den Bildern a bis c ist das degenerierende Axon farblich hervorgehoben. Während das Axon auf dem Bild A (a) noch völlig unversehrt erscheint, zeigt es sich auf den nachfolgenden Aufnahmen zunehmend degeneriert.

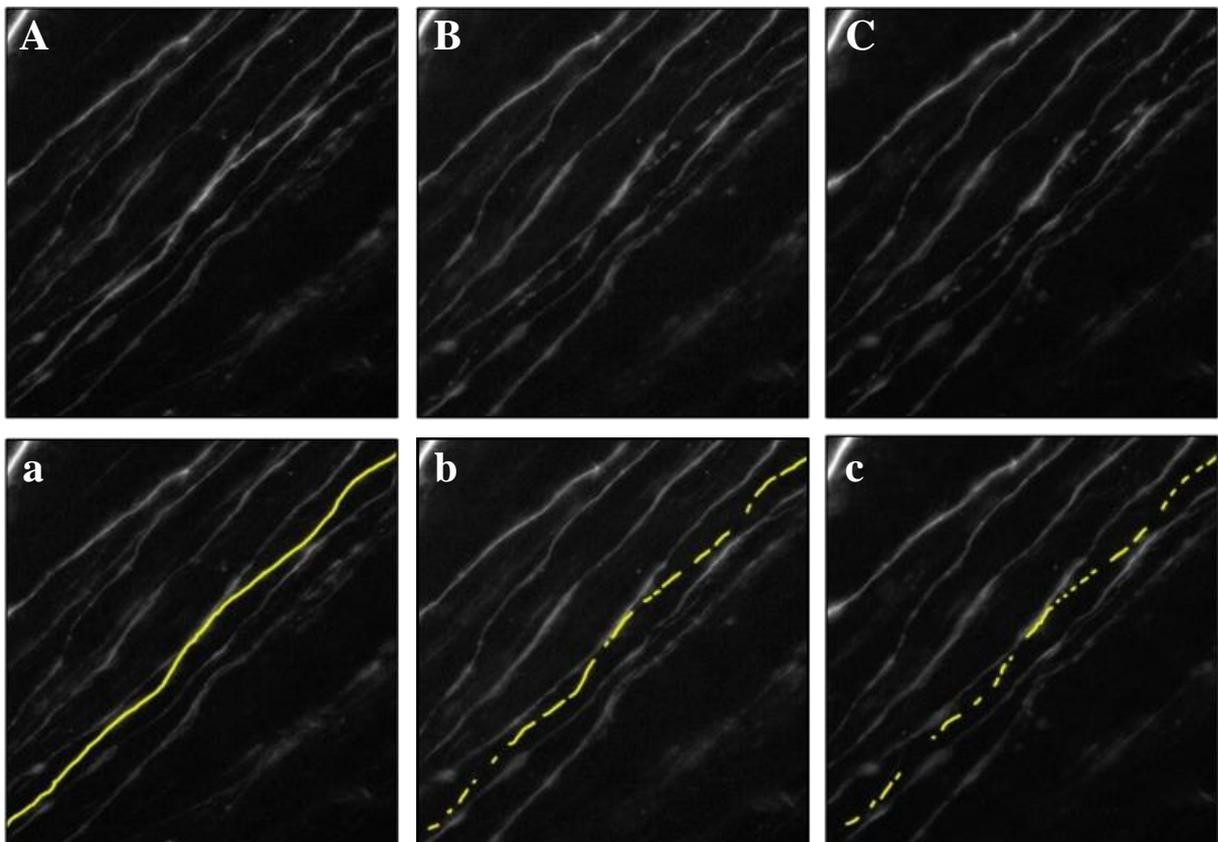


ABB 2.10: BEISPIELBILDER – DEGENERATION IM ZEITVERLAUF

2.2.3 HISTOPATHOLOGIE

2.2.3.1 PERFUSION DER RATTEN, GEWEBEENTNAHME UND FIXATION DER NERVEN

Nach Beendigung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Ratten mit einer inhalativen Überdosis CO₂ im narkotisierten Zustand getötet. Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurde der Thorax mit einer Schere eröffnet und die linke Herzkammer sowie der rechte Vorhof perforiert. Durch die Öffnung im linken Ventrikel wurde eine Sonde über den linken Vorhof in die *Aorta ascendens* vorgeschoben. Um das Tier weitgehend vom Blut zu befreien,

wurden die Blutgefäße für 10 min mit *PBS* durchspült. Anschließend wurde das Tier, ebenfalls über die Zeitdauer von 10 min, mit einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung perfundiert. Nach Entnahme beider Optischer Nerven wurden diese für 24 Stunden in einer 4 % PFA-Lösung fixiert. Schließlich wurden die Nerven zur längerfristigen Aufbewahrung in *PBS* gelagert.

2.2.3.2 HERSTELLUNG DER PARAFFINSCHNITTE

Nach Durchtrennung der Optischen Nerven in jeweils etwa drei gleich große Teile, erfolgte die vertikale Einbettung der Anschnitte in Paraffin. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden im Anschluss mit einem Mikrotom in 1 µm schmale Schnitte (Ausnahme: 0,5 µm für die Biel-schowsky-Silberfärbung) verarbeitet und auf Objektträger aufgetragen. Zur Trocknung und Fixierung wurden diese für zwei Stunden im Brutschrank bei 60 °C gelagert (SCHEUMANN 2010). Auf jedem Objektträger fanden sich somit neun Anschnitte jedes Optischen Nerven, wobei stets drei Anschnitte zu einem der drei Teile des Nerven gehörten und folglich ein ähnliches Färbeverhalten wie die anderen zwei Schnitte aufwiesen.

2.2.3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

Das Prinzip von immunhistochemischen Färbungen beruht auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer ausreichend starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Hierbei handelt es sich in den meisten Fällen um Oberflächenproteine bestimmter Zellen. Der Antikörper ist wiederum an ein Detektionssystem gekoppelt, an dessen Ende die Oberflächenstrukturen farblich markiert werden.

Vor jedem Färbvorgang wurden die Anschnitte in einer Alkoholreihe mit absteigender Konzentration entparaffiniert (zweimal für jeweils 10 min in Xylol 100 % (v/v), zweimal für 3 min in 100 % Ethanol (v/v) und einmal für 3 min in 96 % Ethanol (v/v)). Nach der Färbung erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (EtOH 50 % (v/v) bis EtOH 100 % (v/v)) bis hin zum Xylol. Abschließend wurden die gefärbten Anschnitte mit einem nicht-wasserlöslichen Eindeckelmedium bedeckt und lichtmikroskopisch ausgewertet (SCHEUMANN 2010).

2.2.3.4 LFB-FÄRBUNG

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte in einer LFB-Lösung (*Luxol Fast Blue*-Lösung) bei 60 °C für 12 bis 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte durch aufeinanderfolgendes Eintunken in EtOH 90 % (v/v), 0,05 % Lithiumcarbonat, EtOH 70 % (v/v) und Aqua dest. von Dunkelblau bis Hellblau differenziert. Anschließend wurde das Gewebe für fünf Minuten in 1 % Perjodsäure inkubiert und erneut fünf Minuten lang in Leitungswasser gebläut. Nach kurzzeitigem Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die Anschnitte zur Inkubation eine halbe Minute lang mit Schiffs Reagenz behandelt und erneut für fünf Minuten in Leitungswasser gebläut. Zur Darstellung der Zellkerne folgte die Färbung über sieben Minuten mit Hämatoxylin nach MAYER (Hämalaun). Nach kurzzeitiger Ablagerung in destilliertem Wasser konnten die Anschnitte schließlich entwässert, eingedeckelt und ausgewertet werden (SCHEUMANN 2010).

2.2.3.5 BIELSCHOWSKY-SILBERFÄRBUNG

Auf die Entparaffinierung folgte eine Inkubation über 20 min in 20 % Silbernitrat und das Stoppen dieser Reaktion in destilliertem Wasser. Während dieses Vorgangs wurde Ammoniak tropfenweise hinzugegeben, bis der Niederschlag nicht mehr sichtbar war. Unter Lichtschutz wurden die Anschnitte eine Viertelstunde lang in der o. g. Lösung inkubiert. Dann wurden die Präparate in einer mit destilliertem Wasser und drei Tropfen 32 % Ammoniak gefüllten Küvette geschwenkt. Derweil wurden sechs bis acht Tropfen Entwickler zur Lösung hinzugefügt. Die Anschnitte wurden daraufhin drei bis fünf Minuten lang in dieser Lösung inkubiert. Der Vorgang wurde beendet, sobald sich die Anschnitte schwarz und der Hintergrund braun färbten. Es folgte eine Waschung in destilliertem Wasser sowie eine Inkubation über zwei Minuten in 2 % Natriumthiosulfat. Vor der abschließenden Entwässerung und Eindeckelung wurden die Präparate in Leitungswasser gewaschen (LOCKSTAED 2013).

2.2.3.6 ED1-, β -APP- UND CD3-FÄRBUNG

Nach der Entparaffinierung durch Xylol und Ethanol wurden die Schnitte in Aqua dest. überführt und zur Antigenmaskierung fünfmal drei Minuten lang in 10 mM 0,2 % Citratpuffer aufgekocht. Nach 30-minütiger Abkühlung des Citratpuffers folgte eine 20-minütige Blockierung der endogenen Peroxidase durch eine PBS/Wasserstoffperoxid-Lösung. Die Reaktion wurde in PBS gestoppt. Dann wurden die Schnitte in einen *Spacer* eingelegt und dreimal mit PBS gewaschen. Die Blockierung des unspezifischen Hintergrunds erfolgte mit einer Pferdeserum/PBS/BSA-Lösung über einen Zeitraum von einer Stunde. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (s. **TAB 2.5**, S. 19) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte, nach dreimaliger Waschung mit PBS, eine Stunde lang mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (s. **TAB 2.6**, S. 19) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten dreimaligen Waschung mit PBS wurden die Schnitte mit Avidin-Peroxidase eine Stunde lang behandelt. Nach einer letzten dreimaligen Waschung mit PBS folgte die Entwicklung mittels einer 1- bis 10-minütigen Inkubation mit DAB. Die Reaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte zehn Minuten lang mit Hämalaun behandelt. Um den *pH*-Wert zu erhöhen, wurden sie anschließend zehn Minuten lang in Leitungswasser gebläut. Es folgte die Entwässerung, Eindeckelung und Auswertung.

2.2.3.7 AUSWERTUNG DER ED1-FÄRBUNG

Der Marker ED1 wird stark auf den Membranen von Lysosomen und schwach auf den Zellmembranen von myeloiden Zellen wie Makrophagen, Monozyten, Dendritischen Zellen und peripheren Blutgranulozyten exprimiert (DIJKSTRA et al. 1985). ED1 kennzeichnet spezifisch mobile bzw. eingewanderte Makrophagen, die hauptsächlich in der Frühphase einer inflammatorischen Reaktion vorkommen (GERDPRASERT et al. 2002; SCHMIDT et al. 2007).

Für die Auswertung der ED1-Färbungen wurden von jedem Sehnervenpräparat jeweils drei Anschnitte aus unterschiedlichen Höhen des Optischen Nerven beurteilt. Das Ausmaß der Einwanderung wurde anhand des folgenden *Scores* in fünf Schweregrade eingeteilt (s. **TAB 2.11**, S. 40). Hierfür wurden die angefärbten Nervenquerschnitte in 100-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop betrachtet.

PUNKTE	ANZAHL ED1+-ZELLEN / SEHNERVENANSCHNITT
0	Keine ED1+-Zelle
1	> 0-10 ED1+-Zellen
2	> 10-100 ED1+-Zellen
3	> 100-500 ED1+-Zellen
4	> 500 ED1+-Zellen

TAB 2.11: ED1-SCORE

2.2.3.8 AUSWERTUNG DER β -APP-FÄRBUNG

Das Beta-Amyloid-Precursor-Protein (β -APP) ist ein transmembranöses Glykoprotein. Es wird nach der Synthese axonal transportiert. Eine Läsion des axonalen Zytoskeletts führt zu einer Beeinträchtigung der Membranpermeabilität und des axonalen Transports, infolgedessen es zu einer Ansammlung von β -APP proximal des Läsionsorts kommt (OEHMICHEN et al. 1998; SHERRIFF et al. 1994). Demnach dient β -APP als Marker für den Nachweis von akuten Axonschäden in der weißen Hirnsubstanz.

Für die Auswertung der β -APP-Färbungen wurden von jedem Sehnerven jeweils drei Anschnitte aus drei unterschiedlichen Schnitthöhen lichtmikroskopisch betrachtet und deren β -APP+-Axone ausgezählt.

2.2.3.9 AUSWERTUNG DER CD3-FÄRBUNG

CD3 ist Teil eines oberflächlichen Proteinkomplexes, über den T-Lymphozyten aktiviert werden. Die Anfärbung von CD3 erlaubt folglich eine Darstellung dieser Zellen in den Optischen Nerven.

Um das Ausmaß der Einwanderung von CD3+-Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten der EAE beurteilen zu können, wurden die angefärbten Zellen in jedem der neun Anschnitte jedes Optischen Nerven unter einem Lichtmikroskop in 100-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.2.3.10 AUSWERTUNG DER BIELSCHOWSKY-SILBERFÄRBUNG

Mit der Silberimprägnationsmethode nach dem deutschen Neuropathologen MAX BIELSCHOWSKY kann ein chronischer axonaler Schaden nachgewiesen werden.

Die Auswertung der Bielschowsky-Silberfärbung erfolgte lichtmikroskopisch in 1000-facher Vergrößerung in Öl-Immersion. Mit der *Software* Axiovision wurden drei Bilder aus jeweils drei Blickfeldern zu jedem der neun Sehnervenanschnitte eines Nerven aufgenommen. Intakte Axone entsprechen den schwarzen Strukturen auf den angefärbten Schnitten (s. bspw. Bild B der **ABB 2.11**). Mit einer speziellen Okularzählplatte konnte der relative Anteil an intakten Axonen der jeweiligen Nervenanschnitte abgeschätzt werden. Die Okularzählplatte enthielt 25 vertikale und 6 horizontale Striche, die in einem festen Abstand zueinander über das Sichtfeld verteilt waren (s. Bild A der **ABB 2.11**). Sofern ein vertikaler Strich ein intaktes Axon überdeckte, wurde ein Punkt vergeben. Demnach konnten für die neun Anschnitte von jedem Nerven maximal 225 Punkte gezählt werden. Der Optische Nerv besteht jedoch nur zu einem kleinen Teil aus Nervenzellen bzw. Axonen. Neben den Nervenzellen enthält er auch Gliazellen und die Extrazellulärmatrix. Somit ist ein Wert von 225 intakten Axonen keine notwendige Bedingung für die völlige Unversehrtheit eines Nerven. Ein vergleichsweise hoher Wert spricht für einen geringeren chronischen axonalen Schaden.

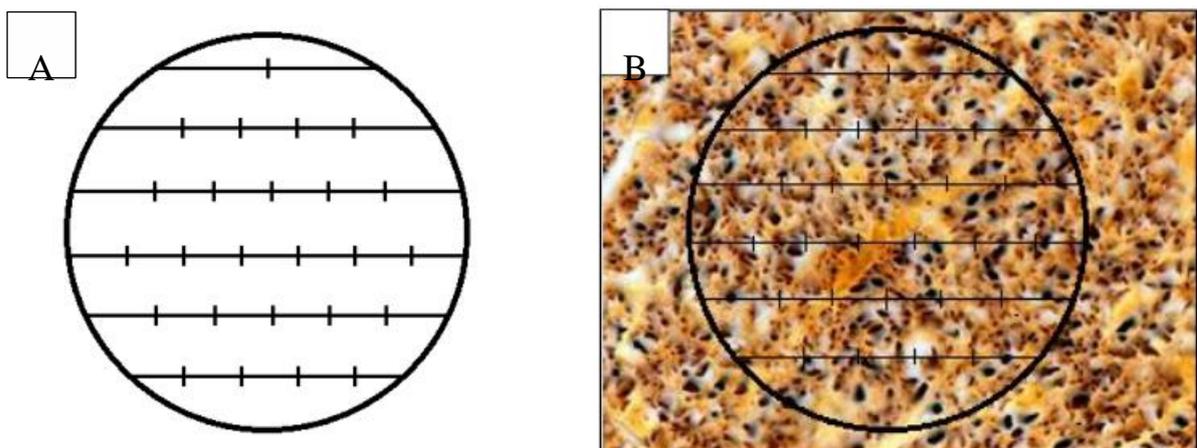


ABB 2.11: SKIZZE DER OKULARZÄHLPLATTE

2.2.3.11 AUSWERTUNG DER *LFB*-FÄRBUNG

Mit Hilfe der *LFB*-Färbung kann die axonale Demyelinisierung als Folge inflammatorischer Prozesse am Optischen Nerven nachgewiesen und quantifiziert werden. Die spezifische blaue Färbung beruht auf der Markierung von Lipiden in der Myelinschicht. Sofern diese durch entzündliche Prozesse von Makrophagen phagozytiert wird, erscheinen die entsprechenden Stellen rosafarben. Es lassen sich folglich blaue (myelinisierte) von rosa (demyelinisierten) Arealen unterscheiden.

Die demyelinisierte Fläche wurde im Verhältnis zur Gesamtgröße des Sehnerven-Querschnitts als Grad der Demyelinisierung in Prozent angegeben. Hierzu wurden Bilder mit der *Software* Axiovision in 100-facher Vergrößerung von den neun Anschnitten jedes Nerven aufgenommen und anschließend die Gesamtfläche der Anschnitte ausgemessen. Daraufhin wurde die myelinisierte Fläche gemessen. Die Differenz der beiden Werte entsprach folglich dem demyelinisierten Areal. Für jeden der drei Werte wurde der Mittelwert aller Anschnitte eines Nerven berechnet. Schließlich konnte der prozentuale Anteil, sowohl der myelinisierten als auch der demyelinisierten Fläche, von der Gesamtfläche der Nerven errechnet werden.

3 ERGEBNISSE

Für die Versuche wurden insgesamt 60 Tiere verwendet. 24 Tiere konnten aufgrund unterschiedlicher Probleme bei der Bilderstellung und -verarbeitung nicht ausgewertet werden. Bei sieben Ratten wurde der Optische Nerv während der Präparation mechanisch beschädigt, vier Ratten verstarben an den Folgen der EAE. Somit wurden 25 Ratten (5 Kontrolltiere und jeweils 5 am Tag 8, 10, 12 und 14 *p. i.*) in die finale Auswertung aufgenommen. Es konnten jedoch nicht alle darstellbaren Axone in sämtliche Analysen integriert werden – bspw. aufgrund überlappender Axone oder aufgrund von Axonen, bei denen nur ein kleiner Anteil fluoreszenzmikroskopisch darstellbar war.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Versuche detailliert dargestellt. Das **KAP 3.1** gibt eine Auflistung der Ergebnisse von unterschiedlichen Untersuchungen zu jeder der 25 Ratten. Hier findet sich auch eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse bzgl. der Korrelation zwischen den fluoreszenzmikroskopischen und klinischen *Scores*. In dem **KAP 3.2** (S. 46 ff.) sind zunächst die Ergebnisse der Axonauszählung und anschließend die der Axondegeneration dargestellt. Das **KAP 3.3** (S. 60 ff.) beinhaltet Darstellungen zu den fünf histopathologischen Untersuchungen, mit dem Hauptaugenmerk auf einem Vergleich des rechten und linken Nerven. Abschließend sind im **KAP 3.4** (S. 69 f.) die Hauptergebnisse noch einmal zusammengefasst dargelegt.

3.1 ÜBERSICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE

Die **TAB 3.1** (S. 45) zeigt eine Auflistung aller in die Auswertung aufgenommener Ratten, mit dem Vergleich des klinischen (**KL.**) und fluoreszenzmikroskopischen (**FL.**) *Scores* sowie der Ergebnisse der histopathologischen Färbungen. Die Kriterien für die Vergabe von *Score*-Punkten finden sich in den **TAB 2.9** (S. 25) sowie **TAB 2.10** (S. 32). Verglichen wird hierbei der rechte (**RE**) mit dem linken (**LI**) Nerven. Nur der linke Nerv wurde operativ freigelegt und

über sechs Stunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Tiernummer setzt sich zusammen aus dem Tag *post injectionem* (bzw. einem c für die Kontrolltiere) und einer Zahl von eins bis fünf für eine genaue Zuweisung eines Tieres innerhalb der jeweiligen Gruppe. Diese Nummern wurden den Tieren erst nach der Auswertung der Ergebnisse zugeteilt und entsprechen somit ausdrücklich nicht den (fortlaufenden) Nummern, die den Tieren vor Beginn der Untersuchungen zugewiesen wurden. Die Auswertung der Untersuchungen wurde blind durchgeführt.

Wie aus der nachfolgenden **TAB 3.1** (S. 45) hervorgeht, zeigten die Kontrolltiere und die Tiere der Gruppe Tag 8 *p. i.* keine klinischen Symptome in Form von Paresen. Anschließend blieb über die Hälfte der Ratten, bis einschließlich Tag 14 *p. i.*, klinisch unauffällig. Der andere Teil zeigte leichte bis zum Teil sehr stark ausgeprägte Paresen. Einzelne, degenerierende Axone, konnten dagegen zu jedem Zeitpunkt festgestellt werden. Eine mäßige Axondegeneration (1 Punkt im fluoreszenzmikroskopischen *Score*; < 10 % Degeneration) fand sich bei vier von fünf Ratten am Tag 8 *p. i.*, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Degeneration am Tag 10 *p. i.* und zumeist sehr starker Axonzerfall ab Tag 12 *p. i.*

Bei sämtlichen klinisch auffälligen Tieren zeigte der Großteil der Axone fluoreszenzmikroskopische Zeichen der Degeneration. Andersherum fiel jede Ratte, die 4 Punkte im fluoreszenzmikroskopischen *Score* aufwies (> 90 % Degeneration), zuvor auch mit Paresen auf. Der Korrelationskoeffizient zwischen den klinischen und fluoreszenzmikroskopischen *Score*-Punkten beträgt 0,66 (für $p < 0,05$). Alle Tiere, die ≥ 2 Punkte im fluoreszenzmikroskopischen *Score* hatten, zeigten auch in mindestens einem Optischen Nerven immunhistochemische Zeichen einer Entzündungsreaktion und/oder eine unterschiedlich stark ausgeprägte Axondegeneration.

	<i>SCORE</i>		<i>LFB</i>		<i>BIELSCH.</i>		<i>ED1</i>		<i>β-APP</i>		<i>CD3</i>	
	KL.	FL.	RE	LI	RE	LI	RE	LI	RE	LI	RE	LI
#c.1	0	0	0	0	167	167	0	0	0	0	0	0
#c.2	0	0	0	0	n.m.	n.m.	0	1	0	0	0	0
#c.3	0	0	0	0	189	178	0	0	0	0	0	0
#c.4	0	0	0	0	182	178	0	0	0	0	0	0
#c.5	0	1	0	0	153	83	0	1	0	0	0	0
#8.1	0	1	0	0	164	95	0	1	0	39	0	0
#8.2	0	1	0	0	169	182	0	0	0	0	0	0
#8.3	0	1	0	0	155	106	0	1	0	0	0	0
#8.4	0	1	0	0	176	185	1	0	0	0	0	0
#8.5	0	0	0	0	155	86	0	1	0	0	0	0
#10.1	1	3	0	13	176	144	0	2	0	83	0	0
#10.2	0	0	0	0	164	90	0	1	0	0	0	0
#10.3	0	1	0	0	153	171	0	1	0	0	0	0
#10.4	0	2	0	0	182	117	0	1	0	4	0	0
#10.5	0	1	0	0	162	126	1	1	10	0	0	0
#12.1	0	3	0	0	155	182	0	1	0	0	0	0
#12.2	1	3	33	37	86	72	3	3	76	62	0	3
#12.3	0	3	44	44	54	68	3	3	82	69	0	0
#12.4	3	4	75	78	20	47	4	4	93	0	2	2
#12.5	3	4	58	73	79	20	3	4	135	0	1	3
#14.1	0	2	58	0	99	90	3	2	37	7	0	0
#14.2	1,5	4	80	100	18	2	4	5	38	129	0	0
#14.3	0,3	3	17	0	146	160	2	2	0	0	0	0
#14.4	0	3	73	64	56	59	4	5	50	69	2	2
#14.5		3	0	0	140	122	0	0	0	0	0	0

TAB 3.1: ÜBERSICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE

3.2 ERGEBNISSE DER *IN-VIVO*-MIKROSKOPIE

3.2.1 AXONAUZÄHLUNG

In allen Optischen Nerven konnte eine unterschiedliche Anzahl an Axonen voneinander abgegrenzt und über sechs Stunden abgebildet werden. Ausgenommen hiervon ist der Optische Nerv des Kontrolltieres #c.1. Hier war es aufgrund der großen Anzahl der dargestellten Axone unmöglich, einzelne Axone voneinander abzugrenzen. Bereits zu Beginn der Aufnahmen befanden sich Axone in unterschiedlichen Stadien der Degeneration.

Bei 14 von 20 Nerven der immunisierten Tiere konnte eine anhaltende Degeneration festgestellt werden. Dies entspricht, bei einer Summe von drei bis elf Axonen in jeder immunisierten Gruppe, einem Mittelwert von 0,8 degenerierten Axonen pro Nerv. Der Anteil an degenerierten Axonen war zu den späteren Zeitpunkten Tag 12 *p. i.* (0,73) und 14 *p. i.* (0,35) deutlich höher als an den Tagen 8 *p. i.* (0,12) und 10 *p. i.* (0,06).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Axonauzählung dargestellt – beginnend mit den Kontrolltieren und anschließend in chronologischer Reihenfolge zum Zeitpunkt ihrer Erfassung nach der MOG-Immunisierung.

KONTROLLTIERE	STD. NULL	+EINE STD.	+ZWEI STD.	+DREI STD.	+VIER STD.	+FÜNF STD.	+SECHS STD.
Intakte Axone	26						
gut darstellbar	3	3	2	4	4	2	2
teilweise darstellbar	23	16	10	15	14	15	12
nicht mehr darstellbar		7	14	7	8	9	12
Degeneration beginnt							
Degenerierte Axone	1						
gut darstellbar	1						
teilweise darstellbar		1	1	1	1	1	1
nicht mehr darstellbar							

TAB 3.2: AXONAUSZÄHLUNG – KONTROLLTIER

Bei den Kontrollratten waren über den gesamten Zeitraum von sechs Stunden sämtliche Axone intakt. Die einzige Ausnahme hiervon stellte das Tier #c.5 dar, bei dem bereits zum Zeitpunkt Null ein Axon Zeichen der Degeneration aufwies und im Verlauf fortschreitend degenerierte. Nach sechs Stunden waren noch 14 von anfänglich 26 Axonen fluoreszenzmikroskopisch darstellbar (\cong 54 %).

TAG 8 P. I.	STD. NULL	+EINE STD.	+ZWEI STD.	+DREI STD.	+VIER STD.	+FÜNF STD.	+SECHS STD.
Intakte Axone	42						
gut darstellbar	30	29	19	16	16	16	14
teilweise darstellbar	12	10	6	9	5	5	5
nicht mehr darstellbar		3	16	14	16	16	17
Degeneration beginnt			1	3	5	5	6
Degenerierte Axone	5						
gut darstellbar	5	5	2	3	2	2	
teilweise darstellbar			1	1	1	1	3
nicht mehr darstellbar			2	1	2	2	2

TAB 3.3: AXONAUZÄHLUNG – TAG 8 P. I.

Am Tag 8 p. i. zeigte nur ein Nerv keine Zeichen eines Axonzerfalls, während sich bei dem Großteil der anderen Nerven bereits zu Beginn der Aufnahmen an einzelnen Axonen Zeichen der Degeneration fanden. Im Verhältnis zu den intakten Axonen waren diese jedoch deutlich in der Minderzahl. Nach sechs Stunden waren noch 60 % der zuvor 42 intakten Axone auszählbar, 14 % wiesen im Zeitverlauf Zeichen des Zerfalls auf. Von den fünf gut darstellbaren und sich bereits in der Degeneration befindlichen Axonen waren am Ende der Aufnahmen noch drei teilweise darstellbar. Eines dieser Axone war bereits eine Stunde nachdem es sich noch gut darstellen ließ, fluoreszenzmikroskopisch nicht mehr nachweisbar.

TAG 10 p. i.	STD. NULL	+EINE STD.	+ZWEI STD.	+DREI STD.	+VIER STD.	+FÜNF STD.	+SECHS STD.
Intakte Axone	50						
gut darstellbar	37	29	29	24	23	21	19
teilweise darstellbar	13	11	11	8	11	14	13
nicht mehr darstellbar		6 4	6 4	14	11	10	13
Degeneration beginnt				4	5	5	5
Degenerierte Axone	3						
gut darstellbar	3	3	2	1	1		
teilweise darstellbar			1	2	1	1	
nicht mehr darstellbar					1	2	3

TAB 3.4: AXONAUZÄHLUNG – TAG 10 p. i.

Auch am Tag 10 p. i. fanden sich an den meisten Nerven Zeichen der Axondegeneration, wobei ein Nerv keine und ein Nerv schwere Zeichen der Degeneration zeigte. 74 % der zum Zeitpunkt Null intakten Axone waren auch nach sechs Stunden noch darstellbar. 38 % aller intakten Axone ließen sich über den gesamten Zeitverlauf gut darstellen, 26 % waren nach sechs Stunden nicht mehr darstellbar. Jedes zehnte Axon zeigte bereits nach vier Stunden erste Zeichen eines Zerfalls. Die drei bereits in der Degeneration befindlichen Axone zum Zeitpunkt Null waren nach sechs Stunden nicht mehr sichtbar.

TAG 12 p. i.	STD. NULL	+EINE STD.	+ZWEI STD.	+DREI STD.	+VIER STD.	+FÜNF STD.	+SECHS STD.
Intakte Axone	15						
gut darstellbar	6	3	4	1	1	1	2 1
teilweise darstellbar	9	7	4	3	4	4	11
nicht mehr darstellbar		5	7	10	9	9	1
Degeneration beginnt				1	1	1	
Degenerierte Axone	11						
gut darstellbar	3	3	2	2	1		
teilweise darstellbar	8	4	7	4	5	3	2
nicht mehr darstellbar		4	2	5	5	8	9

TAB 3.5: AXONAUZÄHLUNG – TAG 12 p. i.

Ab dem Tag 12 p. i. waren an sämtlichen Nerven zumindest moderate Zeichen der Degeneration nachweisbar. In den Optischen Nerven mit schwerer bis kompletter Degeneration konnten einzelne Axone meist nicht voneinander abgegrenzt werden. Hier konnte häufig nur das Vorliegen von Axonrümmern festgestellt werden. Insgesamt waren einzelne Axone in den Nerven mit nur leichter Degeneration deutlich besser voneinander abgrenzbar als in denen mit schwerer Degeneration. Entsprechend ließen sich bei den fünf Nerven vom Tag 12 p. i. nur 15 intakte Axone verfolgen, wobei sich der Großteil nur teilweise darstellen ließ. Bei der letzten Aufnahme waren hiervon nur noch 20 % darstellbar. 42 % aller Axone zeigten bereits zu Beginn der Aufnahmen Zeichen des Zerfalls. Nach sechs Stunden waren bloß noch zwei von anfänglich 15 Axonen nachweisbar (\cong 18 %).

TAG 14 p. i.	STD.	+EINE	+ZWEI	+DREI	+VIER	+FÜNF	+SECHS
	NULL	STD.	STD.	STD.	STD.	STD.	STD.
Intakte Axone	20						
gut darstellbar	7	8	6	4	4	3	3
teilweise darstellbar	13	7	5	5	3	5	6
nicht mehr darstellbar		3	5	7	8	7	6
Degeneration beginnt		2	4	4	5	5	5
Degenerierte Axone	7						
gut darstellbar	4						
teilweise darstellbar	3	5	4	4	4	4	4
nicht mehr darstellbar		2	3	3	3	3	3

TAB 3.6: AXONAUZÄHLUNG – TAG 14 p. i.

Diejenigen Tiere, die die Erkrankung nicht überlebten, verstarben ausnahmslos zwischen den Tagen 12 und 14 p. i. bzw. während der Präparation des Optischen Nerven oder der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Bei allen anderen Tieren am Tag 14 p. i. fanden sich unterschiedlich stark ausgeprägte Zeichen eines Axonzerfalls. Durch die Zelltrümmer wurde die Differenzierung einzelner Axone deutlich erschwert. Immerhin waren 45 % der zu Anfang intakten Axone auch nach sechs Stunden noch intakt und ausreichend gut darstellbar, 25 % zerfielen spätestens vier Stunden nach Beginn der Aufnahmen. 26 % aller Axone befanden sich zum Zeitpunkt Null bereits im Prozess der Degeneration. Etwas mehr als die Hälfte dieser Axone ließ sich auch nach sechs Stunden noch teilweise darstellen.

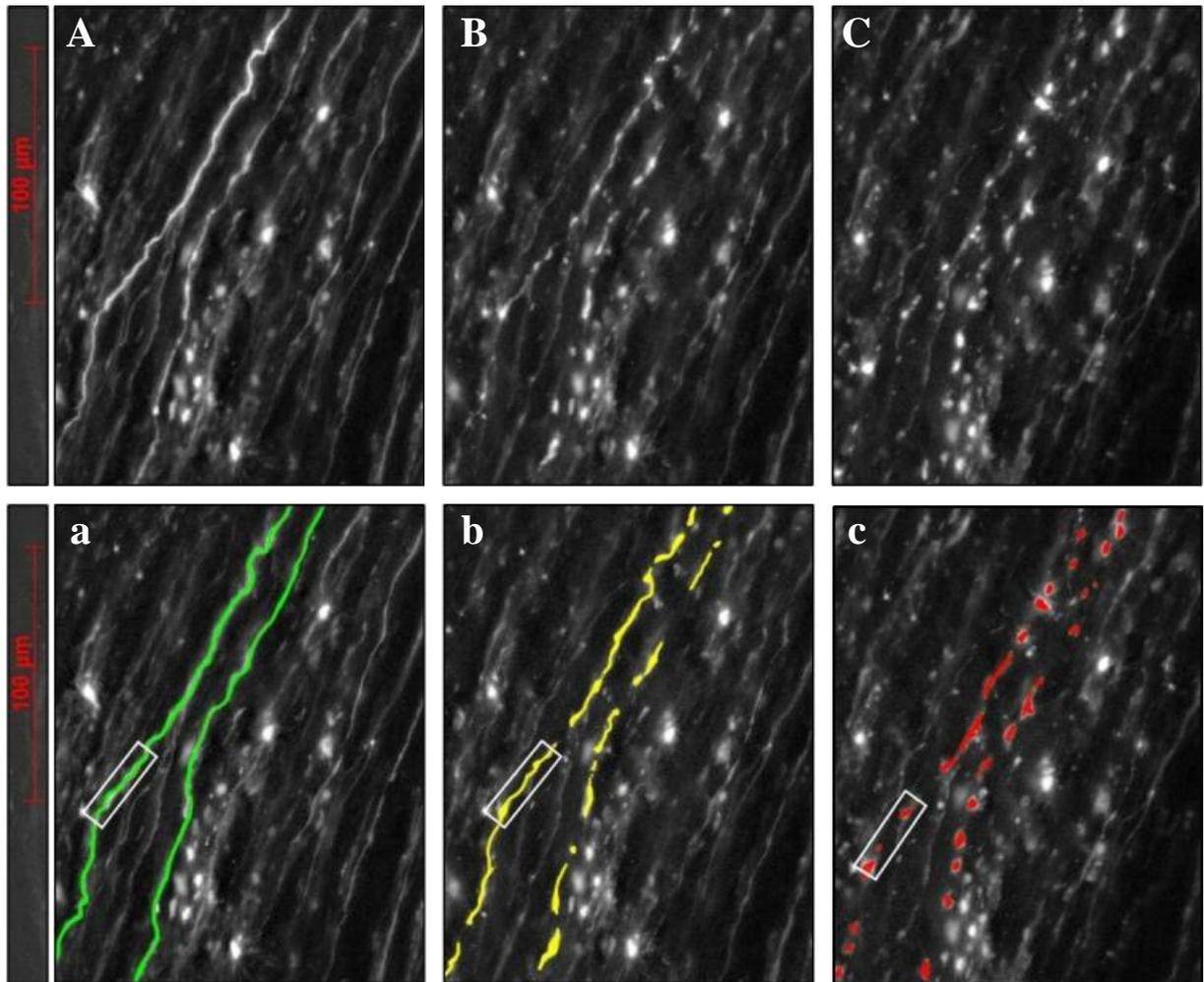
3.2.2 AXONDEGENERATION

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse derjenigen Axone dargestellt, die während der Aufnahmephase begannen zu degenerieren. In dem **KAP 3.2.2.1** werden zunächst einige ausgewählte fluoreszenzmikroskopische Bilder von Axonen dargestellt, anschließend finden sich im **KAP 3.2.2.2** (S. 55 ff.) die Ergebnisse der Axonmessungen.

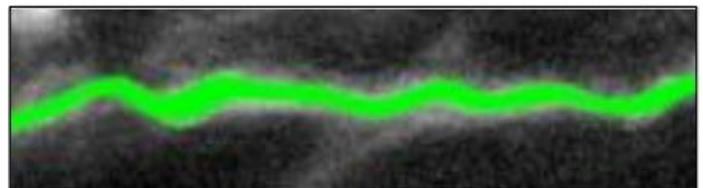
Degenerierende Axone bildeten zunächst Bulbus-ähnliche Axonschwellungen aus, gefolgt von zeitabhängigen Brüchen der axonalen Unversehrtheit mit kontinuierlichem Zerfall über die Zeit (s. bspw. **ABB 3.1**, S. 53). Daneben konnten auch Axone mit Axonschwellungen beobachtet werden, die, hinsichtlich ihrer Kontinuität, über die gesamte Dauer intakt blieben (s. bspw. **ABB 3.3**, S. 55). Bezüglich der Morphologie, ließen sich an den zerfallenen Axonen keine Unterschiede zu den unterschiedlichen Zeitpunkten feststellen.

3.2.2.1 BEISPIELAUFNAMMEN DER AXONDEGENERATION

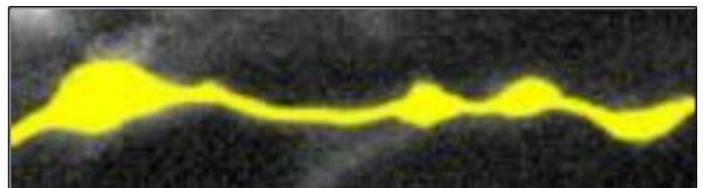
Nachfolgend werden einige Beispielaufnahmen von (scheinbar) degenerierenden Axonen und konstanten Axonschwellungen gezeigt. Die nachfolgende **ABB 3.1** (S. 53) zeigt die fluoreszenzmikroskopisch-morphologischen Veränderungen zweier Axone über den Zeitraum von ca. drei Stunden an einem Beispiel des Tieres #14.2. Die Axone waren zum Zeitpunkt Null fluoreszenzmikroskopisch noch völlig intakt, nach etwa einer Stunde konnten erste Brüche in der axonalen Kontinuität mit deutlichen Axonschwellungen beobachtet werden. Zwei weitere Stunden später fanden sich Axontrümmer als Ausdruck einer weitgehenden Degeneration.



0 h – Intaktes Axon



ca. 1 h – Axonschwellungen



ca. 3 h – Axontrümmer

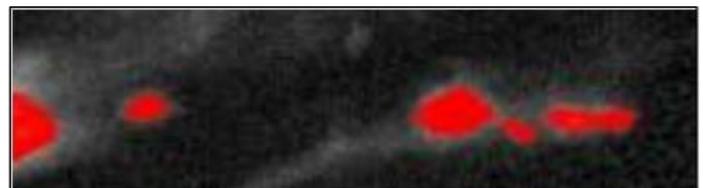


ABB 3.1: AXONDEGENERATION

Einige Axone schienen zunächst zu degenerieren, im Verlauf konnten diese jedoch häufig wieder kontinuierlich verfolgt werden. Die Ursache findet sich am ehesten in Schwankungen der Bildqualität. Oftmals konnte eine sichere Unterscheidung zwischen intakten und degenerierenden Axonen nur mit der Durchsicht der einzelnen Stapelbilder (*Stacks*) gewährleistet werden (s. **KAP 2.2.2.5**, S. 29 f.).

Die **ABB 3.2** zeigt ein Beispiel für eine scheinbare Degeneration. Das angefärbte Axon schien bei Betrachtung der 2D-Bilder zunächst zu zerfallen, auf der letzten Aufnahme wirkt es dagegen wieder intakt. Auffallend ist die zwischenzeitlich verminderte Bildqualität (s. bspw. Bild C).

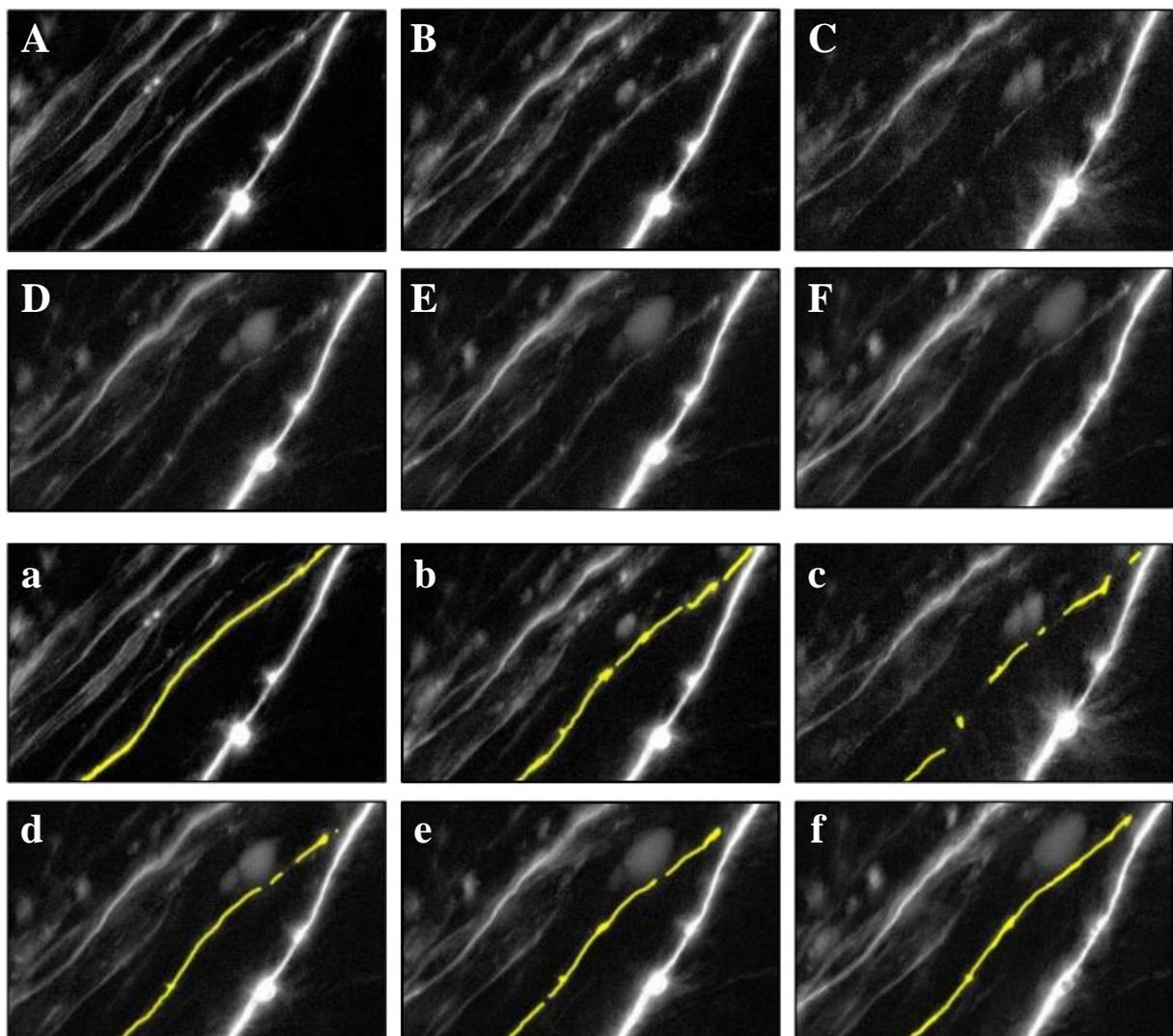


ABB 3.2: SCHEINBARE AXONDEGENERATION

Die nachfolgende **ABB 3.3** zeigt Axone über die Zeitdauer von sechs Stunden, die sich in dieser Zeit morphologisch unwesentlich veränderten und keine axonalen Zersetzungen aufwiesen, obwohl zum Zeitpunkt Null (entspr. Bild A) bereits Axonschwellungen vorlagen. Inwieweit die Schwellungen Ausdruck eines degenerativen Prozesses waren, bleibt unklar.

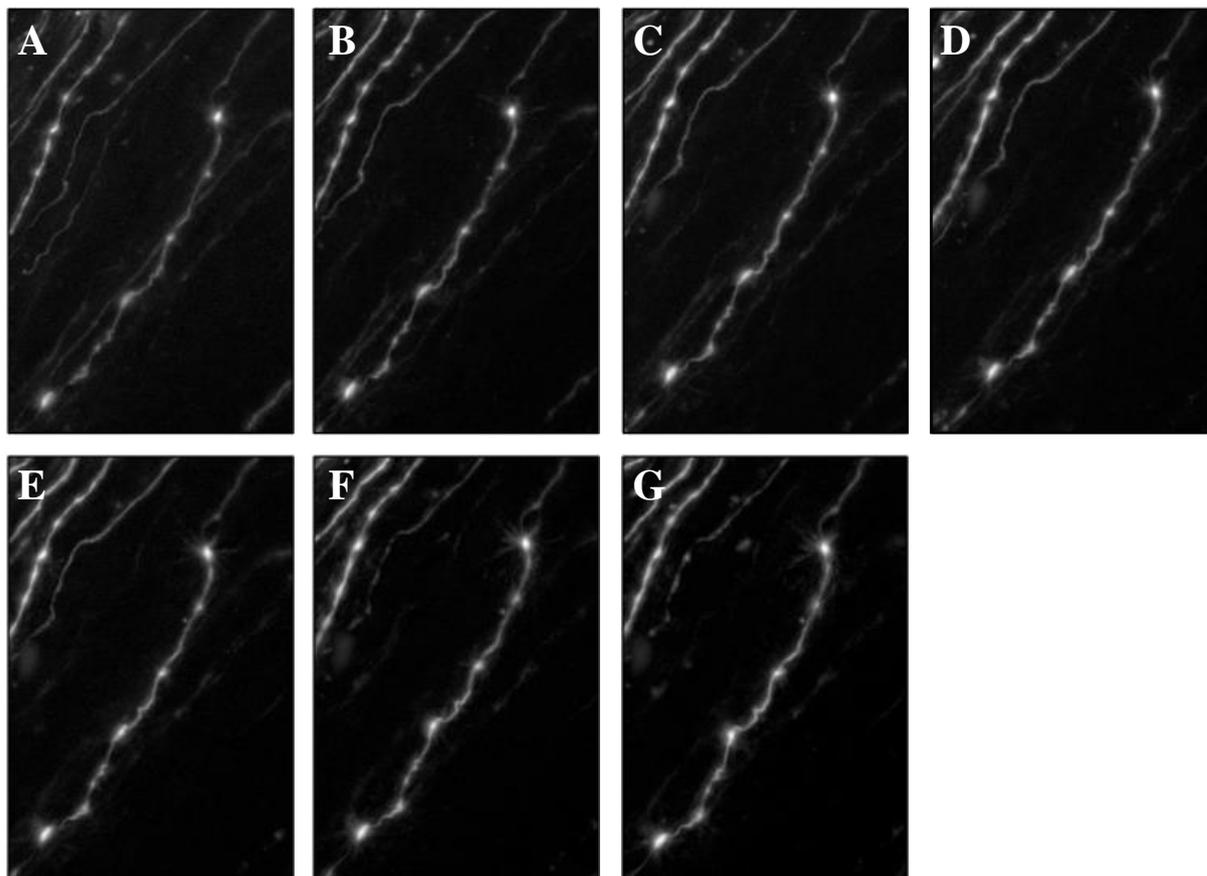


ABB 3.3: KONSTANTE AXONSCHWELLUNGEN

3.2.2.2 AXONALE INTEGRITÄT

Von den 18 Axonen, die zum Zeitpunkt Null intakt waren und im Anschluss Zeichen der Degeneration aufwiesen, begannen sechs Axone bereits eine oder zwei Stunden nach Beginn der Aufnahmen zu zerfallen. Bei diesen Axonen konnte der Ablauf des Zerfalls über einen Zeitraum von bis zu vier Stunden beobachtet werden.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Messungen für diese sechs Axone (# 1 bis # 6) dargestellt. Der Zeitpunkt **STD. NULL** bezieht sich auf die letzte Aufnahme, an dem das jeweilige Axon in einem unfragmentierten Zustand fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden konn-

te. Die weiteren Bilder wurden stündlich aufgenommen. Im Folgenden werden die Veränderung sowohl der Anzahl als auch der durchschnittlichen Länge jedes Axons sowie der Gesamtlänge aller Axonfragmente im Zeitverlauf von vier Stunden dargestellt. In den nachfolgenden **ABB 3.4**, **ABB 3.5** und **ABB 3.6** sind die Werte zur **STD. NULL** nicht integriert, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Axonfragmente sichtbar waren. Die entsprechenden Werte sind jedoch zum Vergleich in den dazugehörigen Tabellen aufgeführt.

	STD. NULL	ANZAHL DER AXONFRAGMENTE			
		+ EINE STD.	+ ZWEI STD.	+ DREI STD.	+ VIER STD.
# 1	1	6	12	7	7
# 2	1	14	20	24	
# 3	1	9	10	6	
# 4	1	11	99	5	9
# 5	1	10	8	11	7
# 6	1	7		8	9

TAB 3.7: ANZAHL DER AXONFRAGMENTE

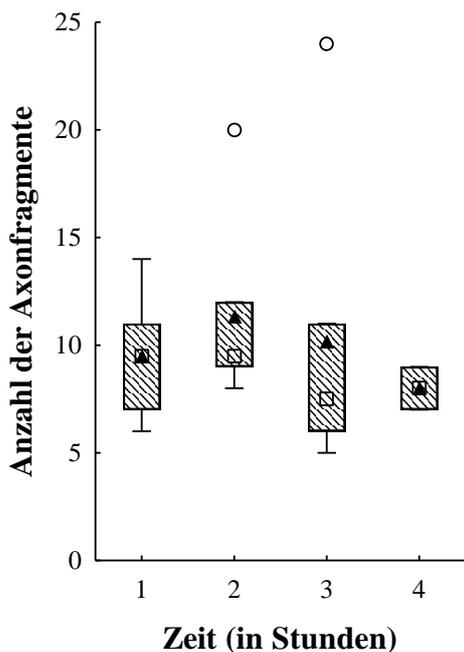


ABB 3.4: ANZAHL DER AXONFRAGMENTE

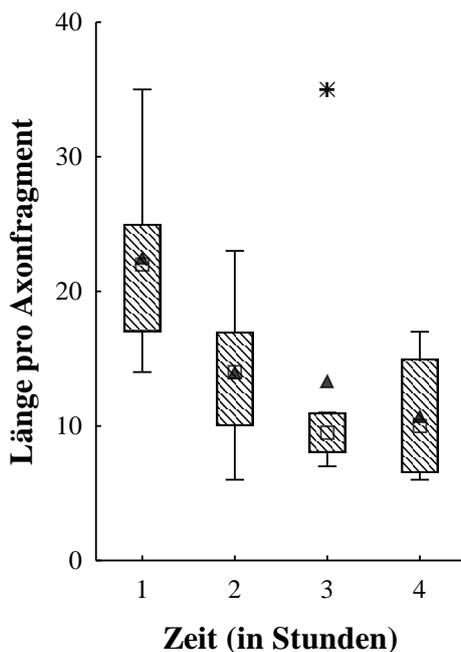


ABB 3.5: LÄNGE PRO AXONFRAGMENT

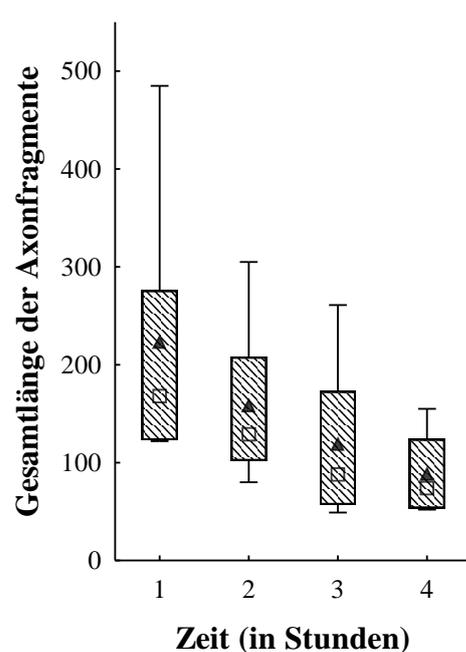


ABB 3.6: GESAMTLÄNGE DER AXONFRAGMENTE

	STD. NULL	ø LÄNGE PRO AXONFRAGMENT (IN ANZAHL DER PIXEL)			
		+ EINE STD.	+ ZWEI STD.	+ DREI STD.	+ VIER STD.
# 1	264	20	6	9	7
# 2	695	35	15	11	
# 3	400	14	10	8	17
# 4	388	25	23	35	13
# 5	356	17	17	10	6
# 6	292	24	13	7	

TAB 3.8: LÄNGE PRO AXONFRAGMENT

	STD. NULL	GESAMTLÄNGE DER AXONFRAGMENTE (IN ANZAHL DER PIXEL)			
		+ EINE STD.	+ ZWEI STD.	+ DREI STD.	+ VIER STD.
# 1	264	122	80	64	52
# 2	695	485	305	261	
# 3	400	123	102	49	
# 4	388	276	208	173	155
# 5	356	165	156	112	93
# 6	292	171	102	57	55

TAB 3.9: GESAMTLÄNGE DER AXONFRAGMENTE

Bei vier der sechs Axone konnte der Ablauf der Degeneration über eine Dauer von vier Stunden, bei zwei Axonen von drei Stunden, fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Im Durchschnitt zeigte sich die Anzahl der axonalen Brüche im Zeitverlauf nahezu unverändert. Die Längen der einzelnen Fragmente nahmen dagegen kontinuierlich ab, sodass sich die Gesamtlänge der Axone stetig verringerte.

Die nachfolgende axonale Integritätsrate beziffert das Verhältnis der Gesamtlänge der Axonfragmente zu dem zuvor intakten Axon. Ein Wert von 1,0 steht somit für ein intaktes Axon ohne Zeichen der Zersetzung. Dagegen bedeutet ein Wert von bspw. 0,7, dass, infolge der Degeneration, von diesem Axon nur noch 70 % der ursprünglichen Länge fluoreszenzmikroskopisch darstellbar war.

	AXONALE INTEGRITÄTSRATE				
	STD. NULL	+ EINE STD.	+ ZWEI STD.	+ DREI STD.	+ VIER STD.
# 1	1,0	0,46	0,30	0,24	0,20
# 2	1,0	0,70	0,44	0,38	
# 3	1,0	0,31	0,26	0,12	
# 4	1,0	0,70	0,54	0,45	0,40
# 5	1,0	0,46	0,44	0,31	0,25
# 6	1,0	0,59	0,35	0,20	0,19

TAB 3.10: AXONALE INTEGRITÄTSRATE

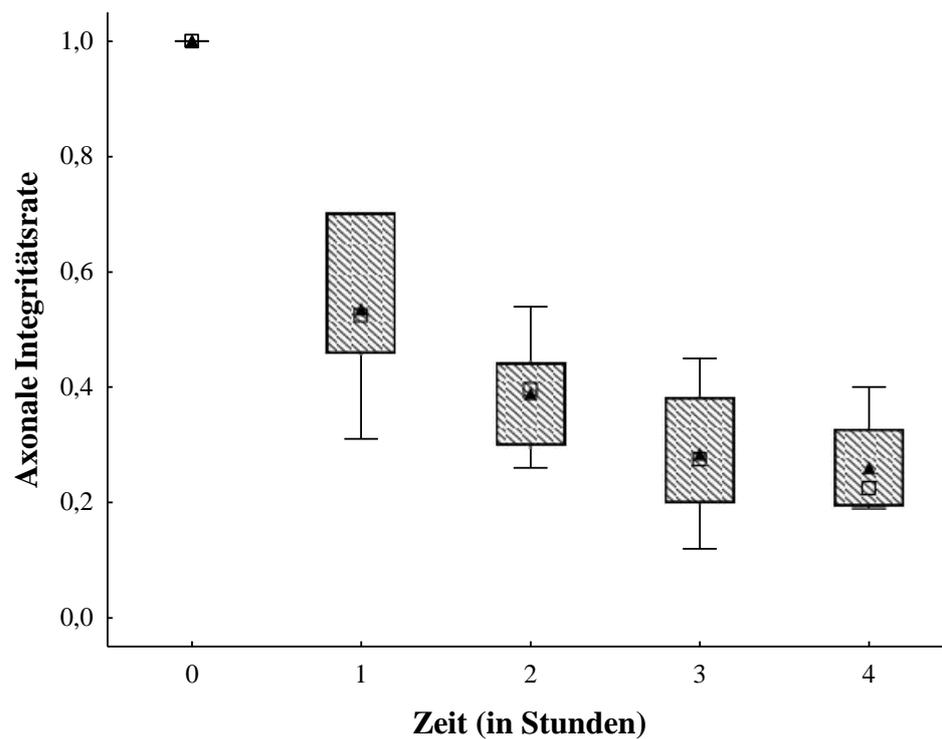


ABB 3.7: AXONALE INTEGRITÄTSRATE

Aus der **ABB 3.7** wird deutlich, dass die axonale Integrität der degenerierenden Nervenzellen kontinuierlich abnimmt. Nachdem die Axone über die gesamte Strecke kontinuierlich verfolgt werden konnten, waren nach einer Stunde im Durchschnitt nur noch 54 % der Axone angefärbt. In den darauffolgenden zwei Stunden verminderte sich die axonale Integrität weiter, jedoch deutlich langsamer als zu Beginn. Während der vierten Stunde der Beobachtung blieb die Rate im Durchschnitt unverändert. Nach vier Stunden waren im Mittel noch ca. 30 % der Axone fluoreszenzmikroskopisch angefärbt.

3.3 ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN

Zu jeder Färbung werden einige Beispielbilder gezeigt. Diese Bilder sind Originalaufnahmen von Optischen Nerven der hier untersuchten Ratten. Das Bild A zeigt stets einen gesunden Sehnervenanschnitt, das Bild B einen mäßig und das Bild C einen stark betroffenen Abschnitt. Ausgenommen hiervon sind die Aufnahmen der *CD3*- und β -*APP*-Färbung. Im Anschluss folgt die Darstellung und Aufarbeitung der histopathologischen Ergebnisse mit dem Hauptaugenmerk auf dem Vergleich der rechten und linken Nerven zu den unterschiedlichen Tagen nach der Induktion der MOG-Immunsierung.

3.3.1 MAKROPHAGENINFILTRATION

Makrophagen wandern bereits in der Frühphase der Entzündungsreaktion in das befallene Gewebe ein. Über den Marker ED1 können diverse Immunzellen in den Sehnervenanschnitten angefärbt und somit das Ausmaß der Einwanderung quantifiziert werden. Zur Differenzierung des Ausmaßes wurde ein semiquantitativer *Score* angewandt, um den Grad der Makrophageninfiltration in sechs Schweregrade einzuteilen (s. **TAB 2.11**, S. 40). Die **ABB 2.9** (S. 61) gibt eine Übersicht über die *Score*-Punkte für den rechten und linken Nerven zu den unterschiedlichen Zeitpunkten *p. i.*

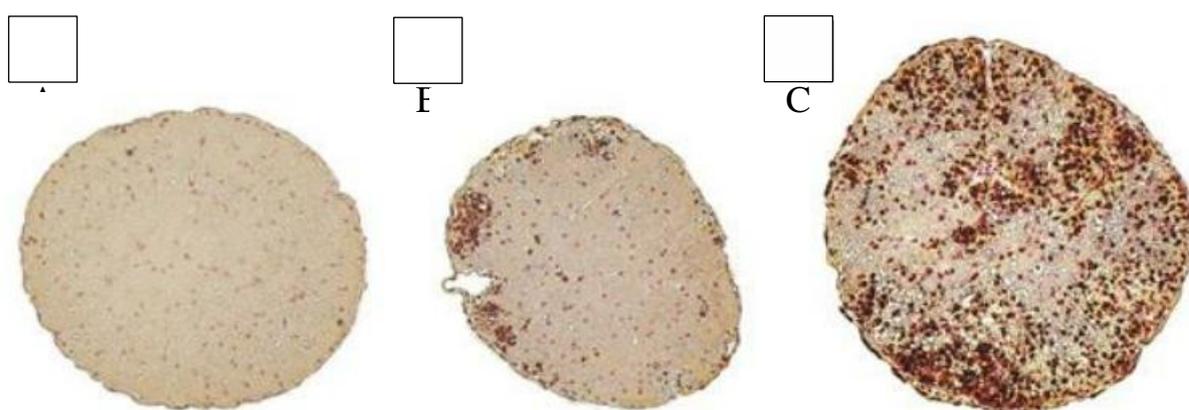


ABB 3.8: BEISPIELBILDER – ED1-FÄRBUNG

Abwehrzellen wurde über die immunhistochemische Färbung des Oberflächenrezeptors *CD3* ermittelt.

Der schwarze Pfeil auf der nachfolgenden **ABB 3.10** zeigt auf einen braun angefärbten, aktivierten T-Lymphozyten (in 630-facher Vergrößerung). In der **ABB 3.11** wird die Anzahl der eingewanderten *CD3+*-Zellen dargestellt, die aufsummiert in den jeweils neun Sehnervenanschnitten pro Nerven nachgewiesen werden konnten.

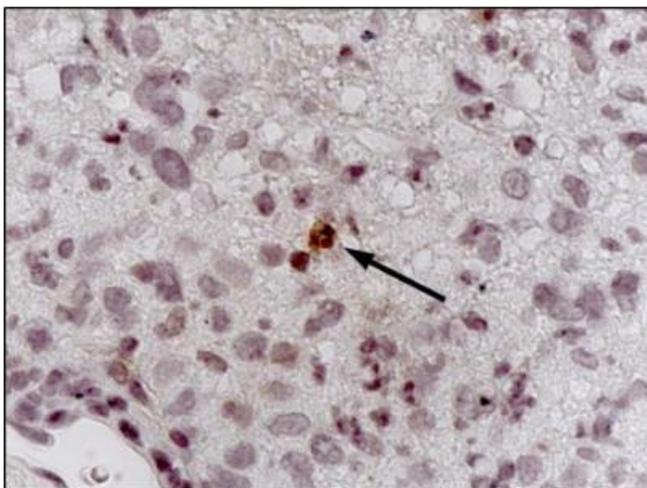


ABB 3.10: BEISPIELBILD – CD3-FÄRBUNG

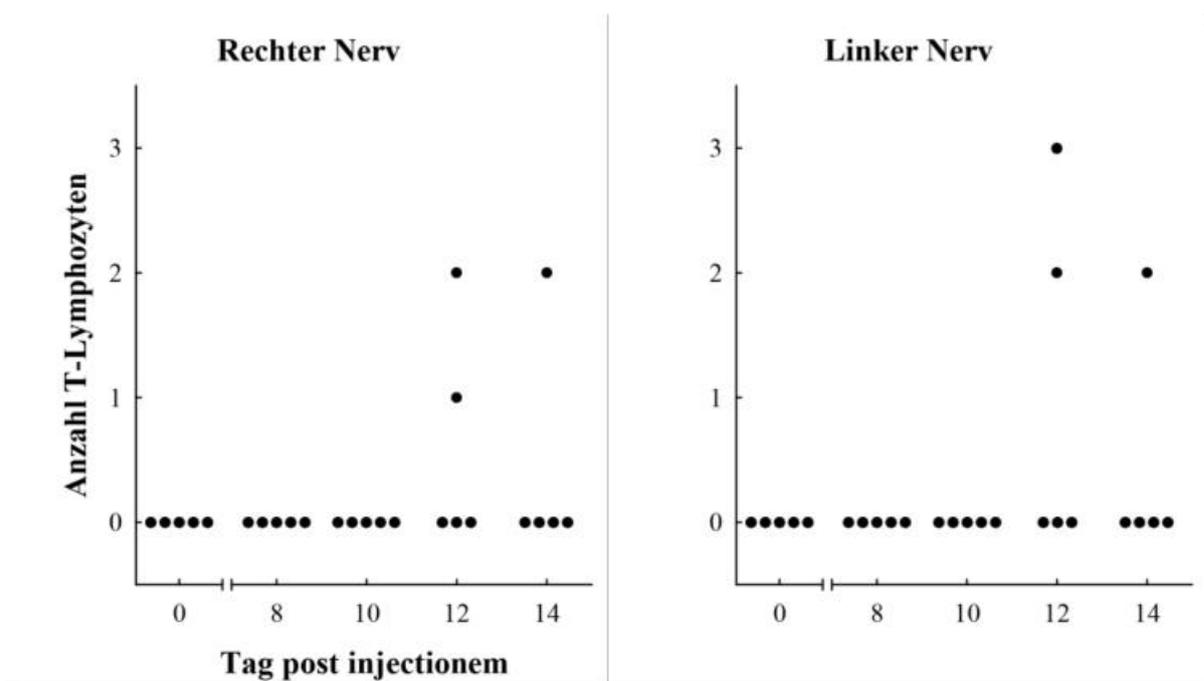


ABB 3.11: ANZAHL T-LYMPHOZYTEN

Bei den Kontrolltieren und zu den frühen Zeitpunkten *p. i.* fanden sich keine eingewanderten T-Lymphozyten. Am Tag 12 *p. i.* zeigten sich bei drei der fünf Tiere $CD3^+$ -Zellen, am Tag 14 *p. i.* bei einem Tier. Jedes dieser vier Tiere wies mindestens 3 Punkte im fluoreszenzmikroskopischen *Score* auf (> 50 % Degeneration) und zeigte auch klinisch unterschiedlich stark ausgeprägte Paresen. Insgesamt konnten in den Optischen Nerven des linken Auges etwas mehr eingewanderte T-Lymphozyten als in denen des rechten Auges nachgewiesen werden.

3.3.3 AKUTER AXONALER SCHADEN

Mit der Anfärbung des Markers β -APP lassen sich Läsionen des axonalen Zytoskeletts, mit nachfolgender Störung des axonalen Transports, nachweisen. Das Ausmaß der mit β -APP-angereicherten Axone gibt somit Aufschluss über akute Axonschäden.

Die braun angefärbten Strukturen auf der nachfolgenden **ABB 3.12** entsprechen β -APP⁺-Axonen. Das Bild zeigt einen Querschnitt eines Optischen Nerven in 630-facher Vergrößerung.

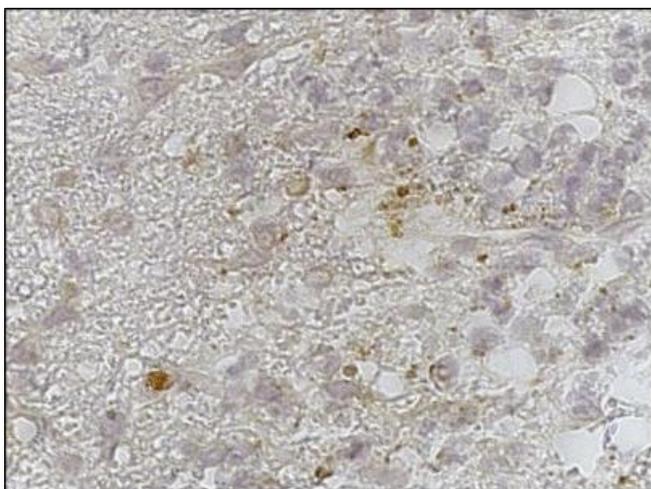


ABB 3.12: BEISPIELBILD – β -APP-FÄRBUNG

In der nachfolgenden **TAB 3.11** wird das Ausmaß des akuten axonalen Schadens, der an den linken und rechten Nerven an den unterschiedlichen Tagen *p. i.* entstanden ist, miteinander verglichen. Hierzu wurden die gezählten β -APP⁺-Axone in den Sehnervenanschnitten des rechten Nerven von denen des linken Nerven abgezogen und nachfolgende statistische Werte ermittelt:

ZEIT- PUNKT	MITTEL- WERT	STANDARD- ABWEICHUNG	STANDARD- FEHLER	95 %-KONFIDENZ- INTERVALL	
				VON	BIS
Kontrolle	0	0	0	0	0 7,8
8 <i>p. i.</i>	-7,8	17,44	7,8	-23,4	18,7
10 <i>p. i.</i>	-15,4	38,1	17,1	-49,5	104,4
12 <i>p. i.</i>	51,0	59,7	26,7	-2,4	24,65
14 <i>p. i.</i>	-16,0	45,4	20,3	-56,65	

TAB 3.11: β -APP-FÄRBUNG – DIFFERENZ ZWISCHEN RECHTEM UND LINKEM NERVEN

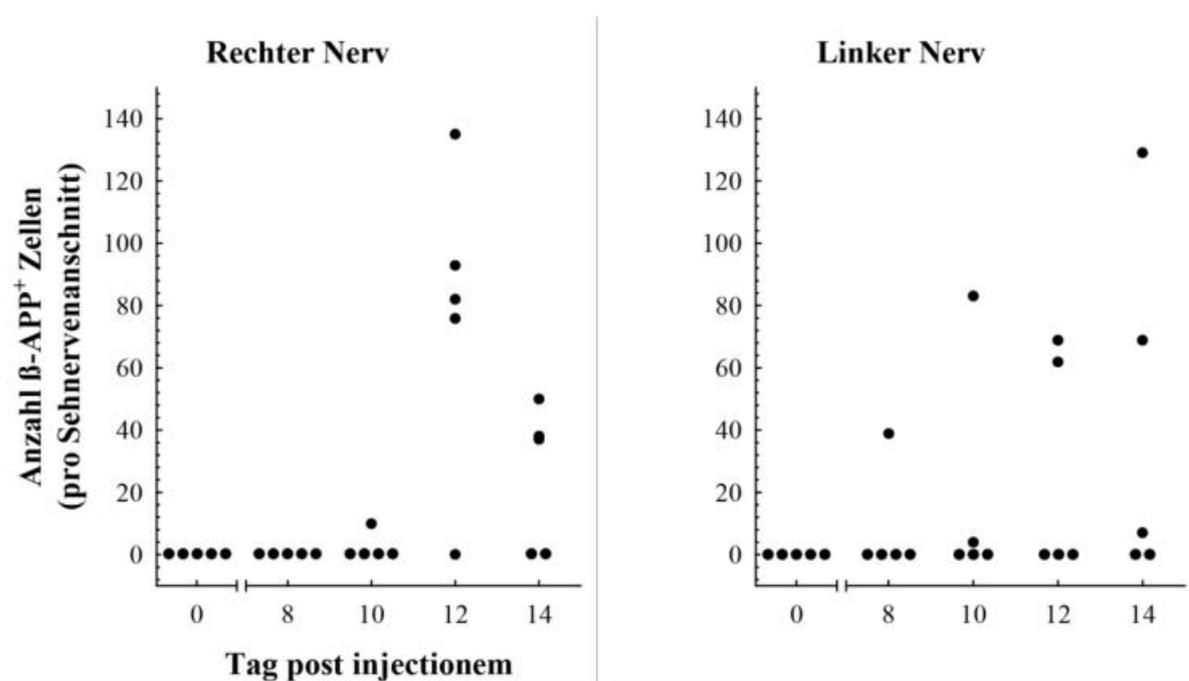


ABB 3.13: AUSMAß DER AKUTEN AXONSCHÄDIGUNG

Mit der steigenden Dauer *p. i.* ging eine vermehrte Axonschädigung einher. Sämtliche Kontrolltiere waren frei von β -APP⁺-Axonen. Am Tag 8 *p. i.* fand sich ein Nerv, der Schäden an den Axonen aufwies, am Tag 10 *p. i.* waren es drei Nerven. Zu den späteren Zeitpunkten war die Mehrzahl der Nerven betroffen. Der rechte (nicht-freipräparierte) Nerv war insgesamt etwas stärker geschädigt als der gegenüberliegende (freipräparierte) Nerv. Nerven mit β -APP⁺-Axonen zeigten immer auch degenerierte Axone in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung. Andersherum wiesen einige Optische Nerven mit ausschließlich β -APP⁻-negativen Axonen einen teilweise hohen Grad an Axondegeneration in der Fluoreszenzmikroskopie auf. Bei zwei der drei Tiere mit 4 Punkten im fluoreszenzmikroskopischen *Score* (> 90 % Degeneration) waren keine β -APP⁺-Axone nachweisbar. Dass die linken Nerven generell ausgeprägtere axonale Schäden davongetragen haben als die rechten Nerven – bspw. durch ein mögliches operatives Trauma – kann mit den vorliegenden Daten nicht bestätigt werden.

3.3.4 CHRONISCHER AXONALER SCHADEN

Das Ausmaß des chronischen axonalen Schadens wurde über die Silberfärbung neuronaler Strukturen nach BIELSCHOWSKY nachgewiesen. Die nachfolgende **ABB 3.14** zeigt drei Blickfelder unterschiedlicher Nerven mit von Bild A bis C ansteigendem chronischen axonalen Schaden.

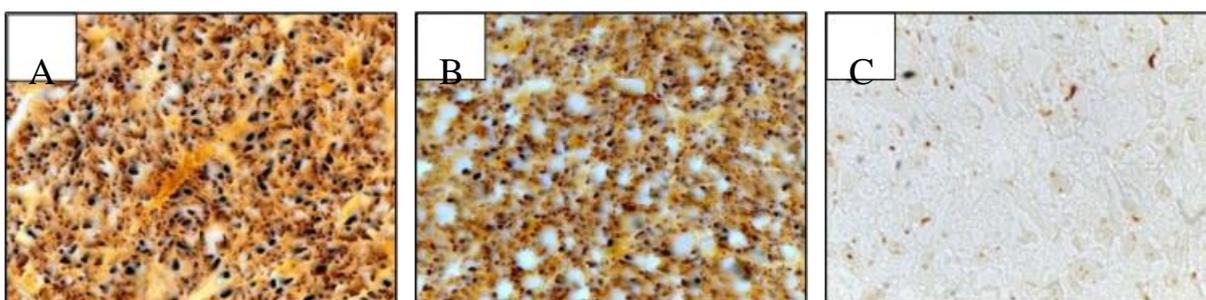


ABB 3.14: BEISPIELBILDER – BIELSCHOWSKY-SILBERFÄRBUNG

ZEIT- PUNKT	MITTEL- WERT	STANDARD- ABWEICHUNG	STANDARD- FEHLER	95 %-KONFIDENZ- INTERVALL	
				VON	BIS
Kontrolle	17	30,0	13,4	-9,8	43,8
8 p. i.	33	41,0	18,3	-3,7	70,0
10 p. i.	37,8	36,1	16,1	5,6	70,1
12 p. i.	1	36,5	16,3	-31,6	33,7
14 p. i.	5,2	13,5	6,0	-6,9	17,3

TAB 3.12: BIELSCHOWSKY-SILBERFÄRBUNG – DIFFERENZ ZWISCHEN RECHTEM UND LINKEM NERVEN

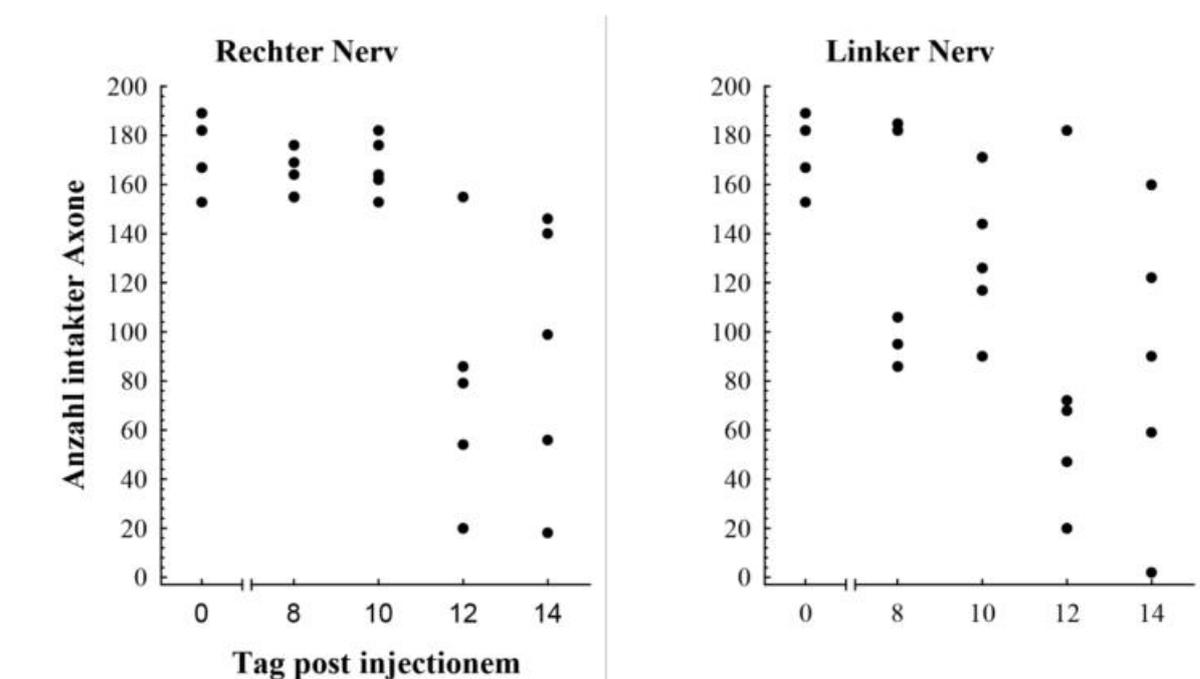


ABB 3.15: CHRONISCHER AXONALER SCHADEN

Zeichen eines chronischen axonalen Schadens konnte bei einem Kontrolltier, bei drei Tieren am Tag 8 p. i. und bei sämtlichen Tieren an den Tagen 10 bis 14 p. i. nachgewiesen werden. Insgesamt war der Schaden an den Tagen 8 und 10 p. i. in den meisten Fällen nur mäßig aus-

geprägt, zu den späten Zeitpunkten zumeist massiv. V. a. die drei Tiere mit 4 Punkten im fluoreszenzmikroskopischen *Score* zeigten eine ausgeprägte chronische Axonschädigung. Die Differenz der Messwerte zwischen den beiden Nerven war zu jedem Zeitpunkt gering. Einzig auffällig waren die Werte der am Tag 10 *p. i.* operierten Tiere. Hier zeigte sich bei vier der fünf Tiere im linken Nerven ein größerer chronischer Schaden gegenüber dem dazugehörigen rechten Nerven. Ein signifikanter Unterschied lässt sich aufgrund der niedrigen Fallzahlen an untersuchten Tieren jedoch nicht sicher nachweisen.

3.3.5 GRAD DER AXONALEN DEMYELINISIERUNG

Der Grad der axonalen Demyelinisierung wurde durch die Auswertung der *LFB*-Färbung bestimmt. In der **ABB 3.17** (S. 68) ist der Grad der demyelinisierten Fläche als prozentualer Anteil zur Gesamtfläche aufgetragen.

Das Bild A der nachfolgenden **ABB 3.16** zeigt einen gesunden Nervenanschnitt, das Bild B teilweise demyelinisierte Areale, das Bild C zeigt einen völlig demyelinisierten Nervenanschnitt.

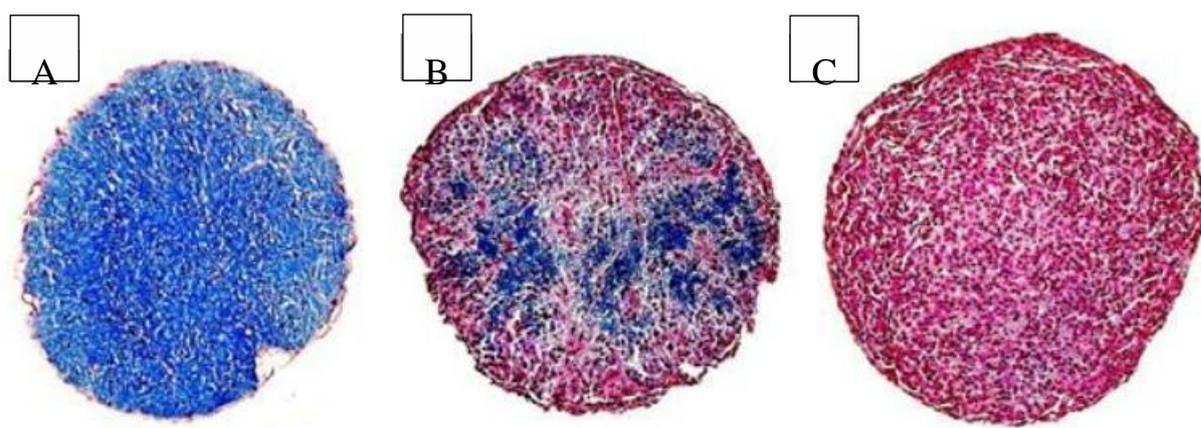


ABB 3.16: BEISPIELBILDER – *LFB*-FÄRBUNG

ZEIT- PUNKT	MITTEL- WERT	STANDARD- ABWEICHUNG	STANDARD- FEHLER	95 %-KONFIDENZ- INTERVALL	
				VON	BIS
Kontrolle	0	0	0	0	0
8 p. i.	0	0	0	0	0
10 p. i.	-2,6	-5,8	2,6	-7,8	2,6
12 p. i.	-4,4	6,2	2,8	-9,9	1,1
14 p. i.	12,8	28,8	12,9	-13,0	38,6

TAB 3.13: LFB-FÄRBUNG – DIFFERENZ ZWISCHEN RECHTEM UND LINKEM NERVEN

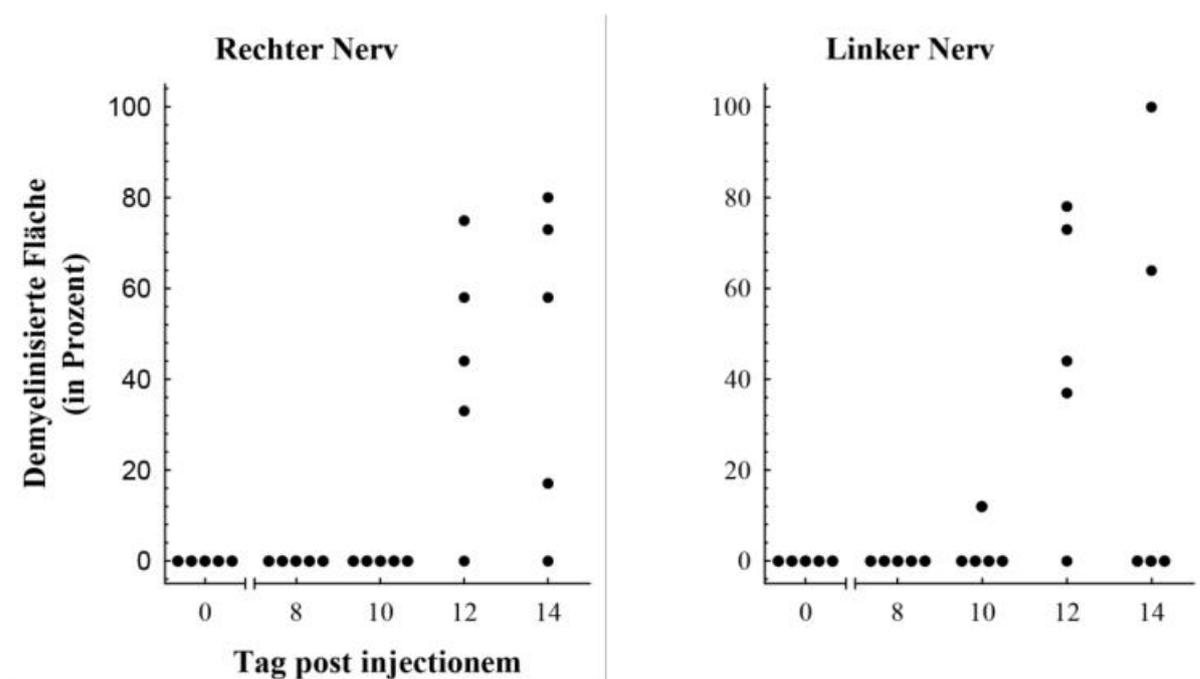


ABB 3.17: GRAD DER AXONALEN DEMYELINISIERUNG

Sowohl die Kontrolltiere als auch die Tiere an Tag 8 p. i. zeigten keine demyelinisierten Areale, am Tag 10 p. i. wies nur einer von zehn Nerven einen kleinen Anteil demyelinisierter Axone auf. Dagegen ließ sich bei jeweils vier der fünf Tiere an den Tagen 12 und 14 p. i. an mindestens einem Nerven Demyelinisierung nachweisen. Das Ausmaß der Demyelinisierung betraf

an diesen Tagen im Schnitt fast die Hälfte der Gesamtfläche. Die Unterschiede zwischen den linken und rechten Nerven waren nur marginal. Auffallend war die hohe Korrelation zwischen dem Ausmaß der Makrophageninfiltration und dem Grad der axonalen Demyelinisierung. Für den rechten Nerven besteht diesbezüglich ein Korrelationskoeffizient von 0,93, für den linken Nerven von 0,86 (für $p < 0,05$).

3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER HAUPTERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden Axone des Optischen Nerven bei lebenden *Brown Norway*-Ratten über den Zeitraum von sechs Stunden fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. 25 Ratten wurden hierfür in fünf Gruppen zu je fünf Tieren eingeteilt. Jede Gruppe wurde zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Induktion der MOG-EAE untersucht, eine weitere Gruppe diente als Kontrolle.

Es gelang uns, Axone des Optischen Nerven im Rahmen der EAE an lebenden Ratten über eine Zeitdauer von sechs Stunden fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. In sämtlichen Nerven konnte eine unterschiedliche Anzahl an Axonen dargestellt werden. Bei fast jedem Tier konnten zudem einzelne Axone voneinander abgegrenzt und ausgezählt werden.

Es ließen sich zudem morphologische, degenerative Veränderungen an einzelnen Axonen darstellen. Bereits zu Beginn der Aufnahmen fanden sich Axone in unterschiedlichen Stadien der Neurodegeneration. Über den Zeitraum von sechs Stunden konnte bei einem Großteil der Nerven eine anhaltende Degeneration festgestellt werden. Degenerierende Axone zeigten zunächst Axonschwellungen, gefolgt von zunehmenden Brüchen der axonalen Kontinuität. Der Anteil an degenerierten Axonen, im Verhältnis zu den intakten, war hierbei zu den späteren Zeitpunkten nach der Immunisierung deutlich höher als zu den früheren.

Bezüglich des Ablaufs der Neurodegeneration fanden wir Hinweise, dass die Axondegeneration möglicherweise bereits vor dem Auftreten der Demyelinisierung und vor der Ausprägung erster klinischer Symptome einsetzte.

Von sechs degenerierenden Axonen konnte die Anzahl und Länge der Axonfragmente sowie die durchschnittliche Länge über mehrere Stunden ausgemessen werden. Im Durchschnitt zeigte sich die Anzahl der axonalen Brüche im Zeitverlauf nahezu unverändert, die Längen der einzelnen Fragmente nahmen dagegen im Durchschnitt kontinuierlich ab, sodass sich

auch die Gesamtlänge der Axone stetig verringerte. Die axonale Integrität der untersuchten degenerierenden Nervenzellen nahm entsprechend kontinuierlich ab.

Eine durch die OP hervorgerufene Schädigung der Axone konnten wir weitestgehend ausschließen. Weder bei dem Grad der Makrophagen- und T-Lymphozyteninfiltration noch bei der Untersuchung des akuten und chronischen Schadens noch bei dem Ausmaß der axonalen Demyelinisierung konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den freipräparierten und nicht-freipräparierten Nerven sicher nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

In diesem Kapitel werden die angewandten Methoden und die Ergebnisse der Untersuchungen kritisch diskutiert. Im **KAP 4.1** werden die Methoden detailliert hinterfragt und die Vor- und Nachteile gegenüber alternativen Methoden dargelegt. Darauf folgend werden die Ergebnisse im Kontext der aktuellen Forschung diskutiert (s. **KAP 4.2**, S. 75 ff.), bevor abschließend ein Ausblick über mögliche künftige Untersuchungen gegeben wird (s. **KAP 4.3**, S. 81).

4.1 DISKUSSION DER METHODEN

4.1.1 *IN-VIVO*-UNTERSUCHUNGEN DES OPTISCHEN NERVEN

Der Optische Nerv ist derzeit im Fokus verschiedener klinischer Untersuchungen. Er ist bei einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen betroffen, wie bei der Optikusneuritis, im Rahmen eines Glaukoms oder der Leberschen Optikusatrophie (WILKINS et al. 2010; MUNEMASA et al. 2010; CARELLI et al. 2009). Dabei ist der Optische Nerv hervorragend geeignet, die Physiologie und Pathologie von Axonen des zentralen Nervensystems zu studieren (MAIER et al. 2007; OHLSSON et al. 2004). Er lässt sich, im Vergleich zum Großteil des zentralen Nervensystems, problemlos chirurgisch freilegen (s. **KAP 2.2.2.4**, S. 26 ff.). Seine Anatomie ist hierbei gut von dem umgebenden Gewebe abgrenzbar (KOCH et al. 2011). Zudem lassen sich die retinalen Ganglienzellen – deren Axone den Optischen Nerven bilden – durch intravitreale Injektionen von pharmakologischen Substanzen, schnell und sicher manipulieren (WILKINS et al. 2010; KOCH et al. 2011; DIEM et al. 2005). Der Optische Nerv bietet somit optimale Bedingungen zur Untersuchung der akuten axonalen Degeneration.

Die MOG-induzierte EAE ist eine Variante der aktiven EAE. Durch die Immunisierung mit dem Myelin-Antigen MOG zeigt sie eine ausgeprägte neurodegenerative Komponente und ist daher besonders gut zur Erforschung der akuten Axondegeneration geeignet (SATTLER et al.

2008). Dagegen bildet die passive EAE (*adoptive-transfer EAE*) vor allem die entzündliche Komponente ab (FLÜGEL et al. 2001) und ist demzufolge für die Untersuchung der neurodegenerativer Prozesse weniger tauglich.

Ein Ziel der Untersuchungen war die Darstellung morphologischer Veränderungen an einzelnen Axonen im Zuge ihres Degenerationsprozesses. Untersuchungen in einer künstlichen Umgebung, außerhalb eines lebenden Organismus (*in-vitro*), wären für dieses Vorhaben ungeeignet gewesen. In fixiertem Nervengewebe würden Fixationsartefakte die genaue Darstellung der degenerativen Morphologie unmöglich machen (KOCH et al. 2011). Veränderungen, die innerhalb kürzester Zeit an einzelnen Axonen entstehen, wären ohne den Stoffwechsel lebender Organismen nur unzureichend beurteilbar. Auch weitergehende Forschungen, wie bspw. Untersuchungen des axonalen Transports, von mitochondrialen Funktionen oder der intraaxonalen Kalziumhomöostase als Schlüsselereignisse in der Pathogenese der axonalen Degeneration (COLEMAN 2005) können nur in vitalem Gewebe hinreichend untersucht werden. Demzufolge sind *In-vivo*-Untersuchungen die Methode der Wahl, um die Mechanismen der axonalen Degeneration zu studieren (NIKIC et al. 2011; HEIN et al. 2012).

4.1.2 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE *LIVE*-AUFNAHMEN

In der Vergangenheit wurden verschiedene experimentelle Modelle beschrieben, die sich auf *In-vivo-Live*-Aufnahmen stützten. Einige Beispiele für deren Anwendung finden sich in der Entschlüsselung physiologischer Prozesse innerhalb des ZNS, bspw. von Kalzium-Signalen im visuellen Cortex (OHKI et al. 2005) oder der zerebralen Hämodynamik (LINDVERE et al. 2010). Die Darstellung von Axonen des Rückenmarks wurde im Vorfeld bereits an transgenen Mäusen demonstriert, die GFP (*Green Fluorescent Protein*) oder Varianten von GFP in sensorischen Neuronen exprimierten (MISGELD et al. 2007). Auch *Live*-Aufnahmen der Retina von lebenden Tieren wurden zuvor in diversen Modellen angewandt, in denen jedoch allesamt die *CLSO* (*Confocal Laser Scanning Ophthalmoscopy*) Verwendung fand. MARIA FRANCESCA CORDEIRO etablierte 2004 eine *In-vivo*-Aufnahmetechnik, die auf intravitreale Injektionen von FITC Annexin V (*Fluorescein Isothiocyanate Annexin 5*) basierte und somit die Detektion von apoptotischen Zellen in der Retina lebender Ratten ermöglichte. Die Axone der retinalen Ganglienzellen lassen mit dieser Technik jedoch nicht darstellen. In ähnlicher Weise wurde eine Kombina-

tion einer intravitrealen Injektion eines Chloromethyl-Derivats von Fluoresceindiacetat und einer CLSO der Rattenretina angewandt (KANAMORI et al. 2010). Diese Methode erlaubt zwar die Darstellung von Axonbündeln *in-vivo*, jedoch nicht die Abgrenzung einzelner Axone voneinander. Zudem erlaubt der permanente Verlust des fluoreszierenden Farbstoffs keinen ausreichend langen Beobachtungszeitraum.

Die Erstellung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen – wie sie in dieser Arbeit Anwendung fanden – basieren auf einer Arbeit von JAN KOCH aus dem Jahr 2011. Dieser etablierte eine Technik für *In-vivo-Live*-Aufnahmen, die eine Darstellung von einzelnen Axonen über einen Zeitraum von bis zu acht Stunden ermöglicht. Die Anfärbung der axonalen Strukturen wird über eine intravitreale Injektion viraler Vektoren erreicht. Diese Vektoren induzieren in der Folge eine Expression von Fluoreszenzproteinen in den retinalen Ganglienzellen der Versuchstiere. Der herausragende Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine speziellen transgenen Ratten verwendet werden müssen. Grundsätzlich können über die Anwendung unterschiedlicher Virus-Serotypen verschiedenste Zellarten angefärbt werden. In diesem Fall wurde als Vektor das Virus AAV-1/2 verwendet, das nahezu ausschließlich in retinalen Ganglienzellen transduziert wird. Zusätzlich kann der Untersucher eine breite Auswahl an unterschiedlichen Fluorophores verwenden. Die Entscheidung für oder gegen ein bestimmtes Fluorophor ist hierbei abhängig von dem jeweiligen viralen Vektor und den spezifischen Anforderungen des verwendeten Fluoreszenzmikroskops. In den hier dargestellten Untersuchungen wurde mCherry verwendet. Die Anwendung dieser Methode ermöglichte uns die Darstellung einzelner Axone, bei einem vergleichsweise geringen Verlust des fluoreszierenden Farbstoffs und erlaubte uns somit die wiederholte Erstellung von Aufnahmen über den Zeitraum mehrerer Stunden.

4.1.3 FORSCHUNGSDESIGN – MÖGLICHKEITEN UND PROBLEME

Zur Untersuchung neurodegenerativer Prozesse an Axonen des Optischen Nerven wurde eine laborexperimentelle Versuchsreihe mit 25 weiblichen *Brown Norway*-Ratten geplant, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion der MOG-EAE fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden. Nach Beendigung der Aufnahmen wurden von beiden Optische Nerven immunhistochemische Färbungen erstellt.

Die Ergebnisse wurden durch ein standardisiertes Verfahren bzgl. Immunisierung, Anästhesie, Präparationsablauf, technischer Konfiguration und immunhistochemischer Färbungen vergleichbar gemacht. Die relativ schlichte Anatomie des Optischen Nerven erleichtert einerseits die Beurteilung der Ergebnisse und andererseits eine etwaige Manipulation des nervalen Systems. Dieses Verfahren bietet somit eine Vielzahl an Untersuchungsmöglichkeiten. Denkbare nachfolgende Untersuchungen werden im **KAP 4.3** (S. 81) dargestellt.

Die Durchführung der tierexperimentellen Eingriffe ist jedoch teilweise äußerst anspruchsvoll und untersucherabhängig, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Untersucher einschränkt. Das handwerklich anspruchsvollste Verfahren findet sich zweifelsohne in der Präparation der Optischen Nerven – insbesondere bei der Verwendung der verhältnismäßig kleinen *Brown Norway*-Ratten (im Vergleich zu Wistar- und Lewis-Ratten). Entzündete Nerven sind stark durchblutet, geschwollen und außerordentlich vulnerabel. An einer Optikusneuritis erkrankte Tiere stellen, bzgl. der Präparation des Optischen Nerven, eine besondere Herausforderung an den Untersucher. Die Operation bedarf einer speziellen Sorgfalt, damit der Nerv nicht vor Beginn der Aufnahmen mechanisch verletzt wird. Ferner erfordert die Durchführung dieser tierexperimentellen Verfahren Erfahrung in der Handhabung mit Versuchstieren sowie in der Überwachung und Beurteilung von Vitalzeichen während der Anästhesie. Neben diesen untersucherabhängigen Fertigkeiten muss auch die kostenintensive technische Ausstattung erwähnt werden. Hervorzuheben ist diesbezüglich vor allem die Anschaffung eines Fluoreszenzmikroskops samt Anwendungs-*Software*.

Die Ausprägung der EAE ist interindividuell unterschiedlich und somit eine entscheidende Variable in der Beurteilung des Grades der Axondegeneration. Daher ist es wenig sinnvoll, unterschiedliche Tiere miteinander zu vergleichen. Aussagekräftiger ist die separate Untersuchung beider Optischer Nerven jeweils eines Tieres. Nur 90 % der weiblichen *Brown Norway*-Ratten entwickeln nach der Immunisierung mit MOG eine akute Optikusneuritis (STORCH et al. 1998b). Bei jedem zehnten Tier bleibt demnach der gewünschte Effekt aus. Auch bei denjenigen Tieren, die eine Optikusneuritis entwickeln, ist die Ausprägung keinesfalls einheitlich. Mit der Dauer und Schwere der Erkrankung stieg auch die Mortalität der Tiere während der Untersuchungen an. Vier Ratten verstarben vor oder während der Präparation des Optischen Nerven – bzw. während der Erstellung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen – an den Folgen der EAE. Sämtliche dieser Versuchstiere verstarben nach dem Tag 12 *p. i.* und wurden

anschließend von der Auswertung ausgeschlossen. Da der Versuchsplan fünf Tiere pro Tag *p. i.* vorsah, wurden entsprechend vier Ratten nachträglich immunisiert und am Tag 14 *p. i.* untersucht. Der Umstand, dass nur diese nachimmunisierten Tiere in die Auswertung aufgenommen werden konnten – und nicht die verstorbenen Tiere – könnte zu einer Unterschätzung des Ausmaßes der Erkrankung am Tag 14 *p. i.* geführt oder zumindest beigetragen haben (s. **KAP 4.2.2**, S. 77 f.).

4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Zunächst wird diskutiert, ob die operative Freilegung der Optischen Nerven möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der Axondegeneration hatte. Anschließend werden die Ergebnisse der Axonanzählung (s. **KAP 3.2.1**, S. 46 ff.) diskutiert – sowohl im Hinblick auf die Ergebnisse als auch auf mögliche Fehlerquellen beim Versuchsaufbau. Anschließend wird der Ablauf der axonalen Degeneration, auf der Grundlage der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (s. **KAP 3.2**, S. 46 ff.) sowie der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen (s. **KAP 3.3**, S. 60 ff.), im Kontext des aktuellen Stands der Forschungen dargestellt. Abschließend wird der Verlust der axonalen Integrität im Rahmen der Axondegeneration beurteilt (s. **KAP 3.2.2.2**, S. 55 ff.).

4.2.1 AUSSCHLUSS VON TRAUMATA ALS AUSLÖSER DER NEURODEGENERATION

An den freipräparierten Optischen Nerven konnten zweifelsohne neurodegenerative Prozesse beobachtet werden. Da bei den Tieren im Vorfeld die MOG-EAE induziert wurde, liegt die Annahme zunächst einmal nah, dass die ausgeprägte Entzündung ursächlich für den Zelltod war. Es hätten jedoch auch durch die Operation entstandene Traumata zu dem Zelluntergang beigetragen haben können. Hierbei müssten die Axone nicht zwingend direkt geschädigt worden sein. Allein die Verletzung von Blutgefäßen hätte ausreichen können, um die Degeneration einzelner Axone auszulösen oder zumindest zu beschleunigen. Sowohl aktivierte Mikroglia als auch aus verletzten Blutgefäßen austretende lösliche Stoffe wie Zytokine oder Antikörper korrelieren nachweislich mit dem Beginn der Degeneration retinaler Ganglienzel-

len (SOTO ET AL. 2011). Es ist also denkbar, dass beide Vorfälle eine Rolle im Degenerationsprozess gespielt haben. Auch ein sich selbst verstärkender *Circulus vitiosus* kann nicht ausgeschlossen werden.

Zur Überprüfung, ob die beobachtete Neurodegeneration eine Folge der EAE oder eines Traumas durch die Präparation der Nerven war, wurden sowohl der freipräparierte als auch der gegenüberliegende Optische Nerv immunhistochemisch untersucht. Verglichen wurde das Ausmaß des akuten und chronischen axonalen Schadens, der Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen sowie der Grad der Demyelinisierung. Anschließend wurde von jedem Tier die Differenz der Werte des linken und rechten Nerven ermittelt und das 95%-Konfidenzintervall errechnet. Der wahre Wert der Abweichung zwischen beiden Nerven eines Tieres befindet sich mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb dieses Intervalls. Nach Auswertung der Ergebnisse konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden. Für einen genaueren Vorhersagewert müsste die Anzahl der Versuchstiere jedoch massiv erhöht werden. Bei der relativ geringen Anzahl an Tieren in dieser Untersuchungsreihe konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den freipräparierten und den gegenüberliegenden Nerven nicht sicher nachgewiesen werden. Es gilt jedoch zu beachten, dass der linke und der rechte Nerv nicht eins zu eins miteinander verglichen werden können. Als eine Besonderheit dieses Tiermodells entwickeln die Ratten zwar in den meisten Fällen eine beidseitige Optikusneuritis, diese verläuft jedoch nicht immer völlig identisch.

Als Qualitätssicherung dienten u. a. die Kontrolltiere. Die Optischen Nerven konnten, trotz der besonderen Herausforderung bei deren Präparation (s. **KAP 4.1.3**, S. 73 ff.), technisch einwandfrei freigelegt werden. Bei allen fünf Kontrolltieren waren über den gesamten Zeitraum von sechs Stunden sämtliche Axone intakt. Eine einzige Ausnahme fand sich bei dem Tier #c.5, bei dem bereits zum Zeitpunkt Null ein Axon Zeichen der Axondegeneration aufwies und im Verlauf fortschreitend degenerierte. Dieses Tier zeigte jedoch auch in der Auswertung der histopathologischen Färbungen als einziges Kontrolltier Zeichen eines chronischen axonalen Schadens sowie eine Einwanderung von Makrophagen. Demyelinisierte Axone oder akute axonale Schäden waren nicht nachweisbar. Darüber hinaus fand sich keine Infiltration von T-Lymphozyten in dem betroffenen Nerven. Es ist demnach sehr unwahrscheinlich, dass ein etwaiges Operationstrauma zu der Degeneration dieses einen Axons geführt hat. Warum dieses Tier trotz einer Scheinimmunisierung einen axonalen Schaden erlitt und von Makro-

phagen infiltriert wurde, kann nur spekulativ beantwortet werden. Als Ursache sind z. B. unterschwellige krankhafte Veränderungen denkbar. Subklinische Veränderungen unterschiedlicher Genese im Bereich des proximalen Optischen Nerven können nachweislich eine Degeneration in der Retina hervorrufen (SOTO et al. 2011). Die fortgeschrittene Einwanderung von Immunzellen in Kombination mit einem chronischen axonalen Schaden sprechen jedoch eher für eine von der Operation unabhängige Entzündungsreaktion. Zusammenfassend betrachtet liegen keine gesicherten Hinweise vor, dass mögliche Operationstraumata als Ursache für die Neurodegeneration in Frage kamen.

4.2.2 QUANTIFIZIERUNG DER AXONE

Es gelang uns, in sämtlichen freipräparierten Optischen Nerven (bis auf einem) eine unterschiedliche Anzahl an Axonen voneinander abzugrenzen und über einen Zeitraum von sechs Stunden fluoreszenzmikroskopisch abzubilden. Der Anteil an degenerierten Axonen, im Verhältnis zu den intakten, war zu den späteren Zeitpunkten Tag 12 *p. i.* (0,73) und 14 *p. i.* (0,35) deutlich höher als an den Tagen 8 *p. i.* (0,12) und 10 *p. i.* (0,06). Auffällig hierbei ist, dass dieser Anteil am Tag 12 *p. i.* mehr als doppelt so hoch wie der am Tag 14 *p. i.* war. Zu erwarten wäre dagegen ein mit der Dauer nach Induktion der MOG-EAE ansteigender Wert. Zudem weisen die Tiere aus der Gruppe Tag 12 *p. i.* insgesamt auch höhere Punktzahlen in den klinischen und fluoreszenzmikroskopischen Scores gegenüber den am Tag 14 *p. i.* untersuchten Tieren auf (s. **TAB 3.1**, S. 45). Dieses Phänomen lässt sich am ehesten durch die Tiermodellbedingte Variabilität erklären. Zudem wurden diejenigen Tiere, die an den Folgen der EAE verstorbenen sind – und mutmaßlich eine ausgeprägte Degeneration gezeigt hätten – von der Auswertung ausgeschlossen und durch nachträglich immunisierte Tiere ersetzt (s. **KAP 4.1.3**, S. 73 ff.).

Nicht alle Axone ließen sich über den Zeitraum von sechs Stunden fluoreszenzmikroskopisch darstellen. Der Grund hierfür lässt sich, neben der Axondegeneration, vor allem mit dem Effekt der Photobleichung erklären (s. **KAP 1.2.2**, S. 10 f. und **ABB 2.9**, S. 35). Das Ausmaß dieses Effekts lässt sich am besten durch die Betrachtung der Axone gesunder Tiere darstellen. Von den anfänglich 26 Axonen in der Kontrollgruppe waren nach sechs Stunden nur noch 14 Axone fluoreszenzmikroskopisch darstellbar.

Für eine möglichst genaue Quantifizierung der Axone mussten sich diese voneinander abgrenzen lassen. Dies gelang zu den frühen Zeitpunkten nach Injektion der MOG-EAE deutlich problemloser als zu den späteren Zeitpunkten. Bestehende Axonrümpfer erschwerten die Auszählung der Axone in erheblichem Maße. Infolgedessen war es bei schwer kranken Tieren teilweise unmöglich, einzelne Axone voneinander abzugrenzen.

4.2.3 ABLAUF DER NEURODEGENERATION IN DER EAE

Die Neurodegeneration scheint der bestimmende Faktor für bleibende Behinderungen in der MS zu sein. Traditionell wird sie als sekundärer Bestandteil angesehen, mit der entzündungsinduzierten Demyelinisierung als treibende Kraft. Die Beziehung zwischen der Entzündung und dem Entstehen der Neurodegeneration ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Da die MS viele Jahre als primär entzündlich-demyelinisierende Erkrankung angesehen wurde, lag der Fokus lange Zeit auf der Erforschung des Ablaufs der Entzündungsreaktion im Bereich der weißen Hirnsubstanz. Als Hauptdiagnoseinstrument der MS diente über viele Jahre die MRT-Untersuchung, da sie zuverlässig Entzündungsherde in der weißen Substanz detektierte. Die Fokussierung auf dieses Nachweisverfahren führte zu der Annahme, die Demyelinisierung sei das vorherrschende Charakteristikum der MS (FISHER et al. 2007). Diese allgemeine Sicht wurde jedoch durch histologische Darstellungen in Post-mortem-Untersuchungen verändert. Es zeigte sich, dass axonale Durchtrennungen und axonaler Verlust bereits frühzeitig in der Erkrankung auftreten. Es liegt somit nah, dass eine ausgeprägte neurodegenerative Komponente einen weitaus größeren Anteil in der Pathogenese der MS einnimmt, als zunächst angenommen (FERGUSON et al. 1997; TRAPP et al. 1998). Zudem zeigen neue MRT-Parameter eine teilweise deutlich ausgeprägte Atrophie der grauen Substanz von MS-Patienten (MILLER et al. 2002). Diese kann bereits in frühen Erkrankungsstadien entstehen und teilweise Läsionen in der weißen Substanz vorausgehen (CHARD und MILLER 2009). Zudem konnte bei den Patienten eine Verminderung von N-Acetyl-Aspartat (NAA) – als ein Zeichen für eine neuronale Dysfunktion und Destruktion – beobachtet werden (BJARTMAR et al. 2000). Beide Aspekte zeigen eine hohe Korrelation mit dem Grad der Behinderung (STEFANO et al. 1998; OBERT et al. 2016). Auch wenn axonale Degeneration hauptsächlich in demyelinisierten Läsionen gefunden wurden (KORNEK et al. 2000) und diese mit dem Ausmaß der Entzündung korrelierten

(FRISCHER et al. 2009; TRAPP et al. 1998), gibt es überzeugende Daten für die Entstehung von immunvermittelten axonalen Schäden, unabhängig von aktiven demyelinisierenden Prozessen (BITSCH et al. 2000; DELUCA et al. 2006).

Daten zur Kinetik der Neurodegeneration in der MOG-EAE wurden 2004 von einer Arbeitsgruppe um MURIEL HOBOM beschrieben, die eine elektrophysiologische *In-vivo*-Auswertung der optischen Leitungsbahn mit einer Untersuchung der Anzahl der RGC kombinierte. Hier zeigte sich, dass die Optikusneuritis zur Apoptose der RGC führt und dass der neuronale Zelltod bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome eintritt. Sie stellten die Hypothese auf, dass der Hauptgrund für den Verlust von RGC im Rahmen der MOG-EAE in der Entzündung liegt, das Absterben der RGC jedoch auch unabhängig von histopathologischen Veränderungen stattfindet.

RICHARD FAIRLESS gelang es 2012 diese Daten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zu bestätigen. Bereits sieben Tage nach der Induktion der MOG-EAE konnten erste ultrastrukturelle Zeichen der Axondegeneration nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt – ca. eine Woche vor Beginn der klinischen Symptome – wurde erstmals eine signifikante Reduktion der RGC festgestellt. Auch frühe Entzündungszeichen entstanden in der Retina bereits bevor deutliche histopathologische Zeichen in den Optischen Nerven manifest wurden. Ferner wurde eine frühe Aktivierung von Mikroglia-Zellen in der Retina beobachtet. Der größte Anteil an aktivierter Mikroglia wurde hierbei im Bereich der *Lamina cribrosa* festgestellt. Von dieser Stelle des Nerven wurden auch in der vorliegenden Arbeit die fluoreszenzmikroskopischen Bilder aufgenommen. Demyelinisierungen und axonale Verluste fanden sich erst mit dem Ausbruch klinischer Symptome. Hieraus lässt sich schließen, dass der Auslöser des Axonzerfalls möglicherweise nicht in einer sekundären Verletzung des Optischen Nerven, sondern in der Retina zu suchen ist.

Bei der Betrachtung unserer Ergebnisse fällt auf, dass jedes Tier, das am Tag der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bereits klinische Symptome in Form von Paresen zeigte, sowohl demyelinisierte Areale (gemessen durch die *LFB*-Färbung) als auch in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung akute Axondegeneration aufwies (s. **TAB 3.1**, S. 45). Gleichzeitig zeigten sämtliche Tiere mit demyelinisierten Arealen im Optischen Nerven, auch Axondegeneration in der Fluoreszenzmikroskopie. Es fanden sich jedoch auch Tiere, die ausschließlich fluoreszenzmikroskopisch Axondegeneration aufwiesen, ohne zuvor klinisch auf-

fällig geworden zu sein und ohne Demyelinisierungen in den Optischen Nerven – vor allem zu den frühen Zeitpunkten *post injectionem*. Dies führt zu der Vermutung, dass erste Axondegenerationen bereits vor dem Prozess der Demyelinisierung und der Entstehung von Paresen auftraten. Zu diesen Zeitpunkten war das Ausmaß des Axonzerfalls zumeist schon in einem fortgeschrittenen Stadium. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die Tiere nicht repetitiv fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden konnten. Folglich lässt sich bei denjenigen Tieren, die sowohl klinisch auffällig waren als auch Demyelinisierungen und Axondegenerationen zeigten, der o. g. Ablauf nicht sicher belegen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass wir uns bei der Bewertung der klinischen Symptome ausschließlich auf die Entstehung von Paresen bezogen haben. Ob die Tiere außerhalb dieser Bewertungsskala klinische Symptome zeigten, bspw. in Form von Sehstörungen oder Sensibilitätsausfällen, lässt sich nicht ausschließen. Insgesamt deutet jedoch vieles darauf hin, dass die Axondegeneration nicht sekundär aufgrund von Demyelinisierung entstand, sondern ein sehr frühes Ereignis darstellte und bereits vor dem Einsetzen der Demyelinisierung auftrat. Unsere Ergebnisse decken sich diesbezüglich mit den Ergebnissen von RICHARD FAIRLESS.

Drei der 25 freipräparierten Nerven enthielten Makrophagen ohne Zeichen der Axondegeneration in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Dagegen zeigten am Tag 8 *p. i.* zwei Nerven eindeutig degenerierte Axone, ohne dass hier eine Makrophageninfiltration belegt werden konnte. Es ist somit aus den Daten nicht eindeutig zu erlesen, ob die Makrophageninfiltration der Axondegeneration vorausgeht oder umgekehrt. Eine hohe Korrelation zwischen beiden Vorgängen besteht jedoch zweifelsfrei (s. **KAP 3.3.1**, S. 60 f.).

4.2.4 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER AXONDEGENERATION

Der fluoreszenzmikroskopisch-morphologische Ablauf der Axondegeneration wurde in der Vergangenheit bereits in unterschiedlichen Modellen beobachtet und beschrieben. Der Verlauf umfasst charakteristische aufeinanderfolgende Stufen, beginnend mit fokalen Axonschwellungen, die nach unterschiedlicher Dauer in Axonfragmenten münden. Diesen Verlauf zeigten u.a. fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in einem EAE-Modell an Axonen des Rückenmarks von Ratten (NIKIC et al. 2011). Hierbei wurde zudem beobachtet, dass auf die Phase der Axonschwellungen nicht immer eine Axonfragmentation folgte. Einige Axone zeig-

ten teilweise tagelang unveränderte Schwellungen, andere erholten sich sogar wieder und degenerierten in der Folge nicht. Die entscheidende ultrastrukturelle Charakteristik von Axonen mit Schwellungen scheint dabei das Vorliegen von dysmorphen, geschwollenen Mitochondrien zu sein (NIKIC et al. 2011).

Der Ablauf der Axondegeneration war auch in unserem EAE-Modell uneinheitlich. Einige Axone entwickelten Axonschwellungen ohne anschließende Zersetzungen, andere Axone wiederum zeigten Zersetzungen ohne zuvor Axonschwellungen auszubilden. Was die Morphologie der zerfallenen Axone betraf, so ließen sich keine Unterschiede an den verschiedenen Tagen *p. i.* feststellen (s. **KAP 3.2.2**, S. 52 ff. und **ABB 3.1**, S. 53). Warum jedoch einige Axone bereits wenige Stunden nach der Entstehung von Axonschwellungen zerfielen, andere hingegen konstant blieben, ist nach wie vor ungeklärt.

Die axonale Integritätsrate, wie sie in der vorliegenden Arbeit berechnet wurde (s. **KAP 3.2.2.2**, S. 55 ff.), basiert auf einer Arbeit zur Untersuchung der akuten axonalen Degeneration von JOHANNA KNÖFERLE aus dem Jahr 2010. In diesem rein neurodegenerativen Modell wurde die axonale Integrität jedoch nicht im Rahmen der MOG-EAE, sondern durch einen mechanischen Druck in Form einer Quetschung auf den Optischen Nerven, gestört. Der fluoreszenzmikroskopisch-morphologische Ablauf weist jedoch zwischen beiden Modellen deutliche Parallelen auf. In beiden Modellen entwickelten sich zunächst Bulbus-ähnliche Axonschwellungen, die im Zeitverlauf zahlenmäßig zunahmten und von zeitabhängigen Brüchen der axonalen Unversehrtheit, mit kontinuierlichem Zerfall über die Zeit, begleitet wurden. Vergleicht man die Entwicklung der axonalen Integrität über die Dauer mehrerer Stunden, so fallen auch hier offensichtliche Ähnlichkeiten auf. Die Endstrecke der Axondegeneration scheint Noxen-unabhängig zu sein – unerheblich ob eine Entzündung oder ein Trauma ursächlich ist. Es gibt Hinweise darauf, dass sich die Endstrecke der intrazellulär angeworfenen Kaskaden gleicht, sobald der Zelltod einmal eingeleitet wurde (KOEBERLE und BÄHR 2004). Dies würde die auffallend ähnliche Kinetik des RGC-Verlustes in beiden Modellen hinreichend erklären.

4.3 AUSBLICK

Die hier durchgeführten Untersuchungen stellen einen Anfang dar, mit denen die Abläufe der akuten Axondegeneration erforscht werden können. Das angewandte Verfahren, gezielt Axo-

ne anzufärben und anschließend fluoreszenzmikroskopisch darzustellen, ist theoretisch beliebig erweiterbar. Die retinalen Ganglienzellen können über eine intravitreale Injektion viraler Vektoren problemlos manipuliert werden. Für weitergehende Untersuchungen könnten auch pharmakologische Substanzen intravitreal oder nach Freilegung des Optischen Nerven appliziert werden, bspw. zur Testung neuroprotektiver oder immunmodulatorischer Substanzen *in-vivo*. Um das Einsetzen der Axondegeneration und ihren Verlauf noch präziser bestimmen zu können, wäre es interessant, die Aufnahmen nicht stündlich, sondern repetitiv im Abstand weniger Tage zu erstellen. Um den Informationsgehalt der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen weiter zu erhöhen, wäre es zudem spannend, neben den Axonen weitere Strukturen gleichzeitig anzufärben. Durch den Einsatz unterschiedlicher Vektoren könnten z. B. zusätzlich eingewanderte Immunzellen dargestellt werden. Ferner ließen sich im Rahmen der *Live*-Aufnahmetechnik weitere axonale Pathologien im ZNS *in-vivo* analysieren. Hierzu gehören u. a. traumatische Verletzungen durch eine mechanische Axotomie oder chemischer Stress durch die Applikation von Toxinen. Auch Augenerkrankungen, die zu einem sekundären axonalen Schaden führen, könnten im Rahmen dieses Modells untersucht werden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nervaler Strukturen *in-vivo* bieten folglich eine Vielzahl an Untersuchungsmöglichkeiten, sowohl in der Erforschung der EAE als auch in der Untersuchung der Pathogenese weiterer Krankheitsbilder.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems und betrifft vor allem junge erwachsene Menschen. Im Verlauf der Erkrankung entstehen vielfach entzündlich-entmarkende Läsionen in der weißen Substanz des ZNS – verursacht durch den Angriff des körpereigenen Immunsystems, insbesondere auf die Myelinscheiden und Axone. Die hieraus resultierende Axondegeneration ist bereits in den Frühstadien der Erkrankung nachweisbar und korreliert mit der Entwicklung irreversibler neurologischer Defizite. Die bisher zur Verfügung stehenden Therapien richten sich gegen die Entzündung, können den Verlust von Neuronen und Axonen jedoch nur unzureichend beeinflussen. Nur durch das detaillierte Verständnis der zum neuronalen Zelltod führenden Mechanismen, wird die Entwicklung neuroprotektiver Therapien für MS-Patienten möglich werden.

Die akute Axondegeneration ist ein zentrales Ereignis in der Pathogenese der Multiplen Sklerose. Es gelang uns, diese, in einem Tiermodell der EAE an lebenden Ratten, zu quantifizieren und darüber hinaus die fluoreszenzmikroskopisch-morphologischen Veränderungen an den degenerierenden Axonen – hinsichtlich des Ablaufs der Axondegeneration – zu untersuchen. Die Experimente wurden hierbei an den Optischen Nerven der Tiere durchgeführt, da diese hervorragend dazu geeignet sind, die Physiologie und Pathologie von Axonen des zentralen Nervensystems zu studieren.

In sämtlichen Nerven konnten wir eine unterschiedliche Anzahl an Axonen fluoreszenzmikroskopisch darstellen. Bereits zu Beginn der Aufnahmen ließen sich Axone beobachten, die sich in unterschiedlichen Stadien der Neurodegeneration befanden. Über den Zeitraum von sechs Stunden konnten wir bei einem Großteil der Nerven eine anhaltende Degeneration feststellen. Weder bei dem Grad der Makrophagen- und T-Lymphozyteninfiltration noch bei dem Grad der axonalen Demyelinisierung noch bei der Untersuchung des akuten und chronischen axonalen Schadens ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den freipräparierten und

nicht-freipräparierten Nerven nachweisen. Dass ein operatives Trauma als Auslöser der Axondegeneration in Frage kommt, ist sehr unwahrscheinlich.

Der Ablauf der Neurodegeneration – vor allem die Beziehung zwischen der Immunantwort und dem Fortgang der Neurodegeneration – ist nach wie vor nicht sicher geklärt. Bei der Auswertung unserer Untersuchungen fanden wir jedoch Hinweise, dass die Axondegeneration nicht sekundär aufgrund von histopathologisch nachweisbaren Demyelinisierungen entstanden ist, sondern bereits vor deren Auftreten und vor der Ausprägung erster klinischer Symptome einsetzte. Der Hergang der Axondegeneration verlief hierbei interindividuell unterschiedlich. Der Großteil der degenerierenden Axone bildete zunächst Bulbus-ähnliche Axonschwellungen aus, gefolgt von zeitabhängigen Brüchen der axonalen Unversehrtheit mit kontinuierlichem Zerfall über die Zeit. Daneben konnten wir auch Axone mit Axonschwellungen beobachten, die hinsichtlich ihrer Kontinuität, über die gesamte Dauer intakt blieben. Andere Axone dagegen zeigten Zersetzungen, ohne eine vorherige Ausbildung von Axonschwellungen. Was die Morphologie der zerfallenen Axone betraf, so ließen sich keine Unterschiede an den verschiedenen Tagen nach Induktion der MOG-EAE feststellen. Die Analyse der axonalen Integritätsrate von degenerierenden Axonen stützt zudem unsere Vermutung, dass die Endstrecke der Axondegeneration Noxen-unabhängig stattfindet, unerheblich ob Entzündungen oder Traumata ursächlich sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag zur Entschlüsselung der Beziehung zwischen der Immunantwort und dem Fortgang der Neurodegeneration im Tiermodell der Multiplen Sklerose. Die Ergebnisse unterstreichen jedoch auch die Notwendigkeit weiterer klinischer und experimenteller Studien, um über das Verständnis der Axondegeneration bei der Entwicklung neuroprotektiver Therapieoptionen mitzuwirken.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, Matthieu JM, Baker D (1994): Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol* 153, 4349–4356
- Andersson PB, Goodkin DE (1996): Current pharmacologic treatment of multiple sclerosis symptoms. *West J Med* 165, 313–317
- Ascherio A, Munch M (2000): Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 11, 220–224
- Axenfeld T, Pau H, Böke W: *Lehrbuch und Atlas der Augenheilkunde*. 12., völlig neu bearb. Auflage; Fischer, Stuttgart 1980
- Babinski J: *Étude anatomique et clinique sur la sclérose en plaques*. G. Masson, Paris 1885
- Bayas A, Gold R (2003): Lessons from 10 years of interferon beta-1b (Betaferon/Betaseron) treatment. *J Neurol* 250 Suppl 4, IV3-8
- Beck RW, Cleary PA, Anderson MM, Keltner JL, Shults WT, Kaufman DI, Buckley EG, Corbett JJ, Kupersmith MJ, Miller NR (1992): A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. The Optic Neuritis Study Group. *New Engl J Med* 326, 581–588
- Beer S, Kesselring J (1991): Steroidtherapie bei Multipler Sklerose. *Schweiz Med Wochenschr* 121, 961–969
- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123 (Pt 6), 1174–1183

- 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
- Bruck W, Bitsch A, Kolenda H, Bruck Y, Stiefel M, Lassmann H (1997): Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann Neurol* 42, 783–793
- Burgoon MP, Williamson RA, Owens GP, Ghausi O, Bastidas RB, Burton DR, Gilden DH (1999): Cloning the antibody response in humans with inflammatory CNS disease: isolation of measles virus-specific antibodies from phage display libraries of a subacute sclerosing panencephalitis brain. *J Neuroimmunol* 94, 204–211
- Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Barboni P, Ross-Cisneros FN, Sadun AA (2009): Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders. *Biochim Biophys Acta* 1787, 518–528
- Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, Schultz ER, Bennett JL, Garber RL, Chang M (1995): Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7440–7444
- Charcot JM: *Histologie de la sclérose en plaques, leçon faite à l'hospice de la Salpêtrière*. Paris 1869
- Charcot JM: *Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière*. Band 1, 4. Auflage; Delahaye et Lecrosnier, Paris 1880
- Chard D, Miller D (2009): Grey matter pathology in clinically early multiple sclerosis: evidence from magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci* 282, 5–11
- Coleman M (2005): Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6, 889–898
- Cordeiro MF, Guo L, Luong V, Harding G, Wang W, Jones HE, Moss SE, Am Sillito, Fitzke FW (2004): Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 13352–13356

- Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A (2011): Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. *Biochim Biophys Acta* 1812, 177–183
- de Vos, Alex F, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk, Paul, Ravid R, Rensing S (2002): Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169, 5415–5423
- DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM (2006): The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain* 129, 1507–1516
- DGN/KKNMS-Leitlinie (2012): https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2012/pdf/030-050I_S2e_Multiple_Sklerose_Diagnostik_Therapie_2014-08_verlaengert.pdf
[Zugriff am 22.02.2017]
- Diem R, Sattler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bähr M (2005): Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain* 128, 375–385
- Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G (1985): The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Adv Exp Med Biol* 186, 409–419
- Doerck S, Göbel K, Weise G, Schneider-Hohendorf T, Reinhardt M, Hauff P, Schwab N, Linker R, Mäurer M, Meuth SG (2010): Temporal pattern of ICAM-1 mediated regulatory T cell recruitment to sites of inflammation in adoptive transfer model of multiple sclerosis. *PLOS ONE* 5, e15478
- D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP (1996): Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 184, 2361–2370
- Dyment DA, Yee, I M L, Ebers GC, Sadovnick AD (2006): Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 258–259
- Fairless R, Williams SK, Hoffmann DB, Stojic A, Hochmeister S, Schmitz F, Storch MK, Diem R (2012): Preclinical retinal neurodegeneration in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 32, 5585–5597

Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997): Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3), 393–399

Fischer K: Multiple Sklerose und Psychopathologie – retrospektive Untersuchung über psychiatrisch-psychosomatische Befunde bei Patientinnen einer neurologischen Rehabilitationseinrichtung. Med. Diss. Marburg 2008

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004): Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185, 232–240

Fisher E, Chang A, Fox RJ, Tkach JA, Svarovsky T, Nakamura K, Rudick RA, Trapp BD (2007): Imaging correlates of axonal swelling in chronic multiple sclerosis brains. *Ann Neurol* 62, 219–228

Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H (2001): Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 14, 547–560

Fraenkel M, Jakob A (1913): Zur Pathologie der multiplen Sklerose mit besonderer Berücksichtigung der akuten Formen. *Z Neurol* 14, 565-603

Frequin ST, Lamers KJ, Barkhof F, Borm GF, Hommes OR (1994): Follow-up study of MS patients treated with high-dose intravenous methylprednisolone. *Acta Neurol Scand* 90, 105–110

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

Frommann CFW: Untersuchungen über die Gewebsveränderungen bei der multiplen Sklerose des Gehirns und Rückenmarks. Fischer, Jena 1878

Gale CR, Martyn CN (1995): Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 47, 425–448

- Gerdprasert O, O'Bryan MK, Muir JA, Caldwell AM, Schlatt S, de Kretser, David M, Hedger MP (2002): The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population. *Cell Tissue Res* 308, 277–285
- Gerlach D: Das Lichtmikroskop: E. Einf. in Funktion u. Anwendung in Biologie u. Medizin. 2. überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 1985
- Gold R, Linington C, Lassmann H (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953–1971
- Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP, Halper J, Likosky WH, Lublin FD, Silberberg DH, Stuart WH, van den Noort, S (2002): Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 58, 169–178
- Hacke W, Poeck K: Neurologie. 12. Auflage; Springer, Heidelberg 2006
- Hein K, Gadjanski I, Kretschmar B, Lange K, Diem R, Sattler MB, Bähr M (2012): An optical coherence tomography study on degeneration of retinal nerve fiber layer in rats with autoimmune optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 157–163
- Heininger K: In-vitro- und in-vivo-Untersuchungen zur selektiven Immunadsorptionsbehandlung neurologischer Erkrankungen (Schriftenreihe Neurologie Neurology Series, Band 33). Springer, Berlin 1993
- Hess K: Ueber einen Fall von multipler Sklerose des Centralnervensystems. Med. Diss. Berlin 1888
- Hickey WF (1991): Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1, 97–105
- Hobom M, Storch MK, Weissert R, Maier K, Radhakrishnan A, Kramer B, Bähr M, Diem R (2004): Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Pathol* 14, 148–157

- Hoffmann S, Vitzthum K, Mache S, Spallek M, Quarcoo D, Groneberg DA, Uibel S (2009): Multiple Sklerose: Epidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. *Prakt Arb med* 17, 12–18
- Hohlfeld R, Wekerle H (2001): Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 14, 299–304
- Kanamori A, Catrinescu MM, Traistaru M, Beaubien R, La Levin (2010): In vivo imaging of retinal ganglion cell axons within the nerve fiber layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2011–2018
- Katsnelson A (2010): Twin study surveys genome for cause of multiple sclerosis. *Nature* 464, 1259
- Kesselring J, Beer S (2005): Symptomatic therapy and neurorehabilitation in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4, 643–652
- Kleinschnitz C, Meuth SG, Stüve O, Kieseier B, Wiendl H (2007): Multiple sclerosis therapy: an update on recently finished trials. *J Neurol* 254, 1473–1490
- Knöferle J, Koch JC, Ostendorf T, Michel U, Planchamp V, Vutova P, Tönges L, Stadelmann C, Brück W, Bähr M (2010): Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 6064–6069
- Koch JC, Knöferle J, Tönges L, Michel U, Bähr M, Lingor P (2011): Imaging of rat optic nerve axons in vivo. *Nat Protoc* 6, 1887–1896
- Koeberle PD, Bähr M (2004): Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone? *J Neurobiol* 59, 162–180
- Koritschoner R, Schweinburg F (1925): Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitätsf Exp Therapie* 42, 217–283
- Kornek B, Lassmann H (1999): Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note. *Brain Pathol* 9, 651–656

- 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
- Leitlinie (2012) zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose s. DGN/KKNMS-Leitlinie
- Lin-Jülich SZ (o. J.): www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz/ [Zugriff am 02.03.2017]
- Lockstaed G: Die Rolle der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase Typ ζ (RPTP ζ) bei der De- und Remyelinisierung. Med. Diss. Göttingen 2013
- Li H, Li SH, Yu ZX, Shelbourne P, Li XJ (2001): Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 21, 8473–8481
- Lindvere L, Dorr A, Stefanovic B (2010): Two-photon fluorescence microscopy of cerebral hemodynamics. *Cold Spring Harb Protoc* 2010 (9), pdb. port 5494
- Lington C, Berger T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, Lu HC, Lassmann H, Wekerle H (1993): T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* 23, 1364–1372
- Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, Krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, Strominger JL, Svejgaard A, Hjorth JP, Holmdahl R (1999): A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* 23, 343–347
- Maier K, Merkler D, Gerber J, Taheri N, Kuhnert AV, Williams SK, Neusch C, Bähr M, Diem R (2007): Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation. *Neurobiol Dis* 25, 514–525
- Malik M, Chen Y, Kienzle MF, Tomkiewicz BE, Collman RG, Ptasznik A (2008): Monocyte migration and LFA-1-mediated attachment to brain microvascular endothelia is regulated by SDF-1 alpha through Lyn kinase. *J Immunol* 181, 4632–4637
- Masuhr KF, Neumann M: Neurologie. 6. Auflage; Thieme, Stuttgart 2007

- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121–127
- Melcangi RC, Cavarretta I, Magnaghi V, Ciusani E, Salmaggi A (2000): Corticosteroids protect oligodendrocytes from cytokine-induced cell death. *Neuroreport* 11, 3969–3972
- Meyer R, Weissert R, Diem R, Storch MK, de Graaf, K L, Kramer B, Bähr M (2001): Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 21, 6214–6220
- Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJM, Thompson AJ (2002): Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125, 1676–1695
- Misgeld T, Nikic I, Kerschensteiner M (2007): In vivo imaging of single axons in the mouse spinal cord. *Nat Protoc* 2, 263–268
- Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung H, Zettl UK (2010): Animal models of multiple sclerosis-- potentials and limitations. *Prog Neurobiol* 92, 386–404
- Mumenthaler M, Mattle H: *Neurologie*. 11., überarb. und erw. Auflage; Thieme, Stuttgart 2002
- Mumenthaler M, Mattle H: *Kurzlehrbuch Neurologie*. Thieme, Stuttgart 2006
- Mumenthaler M, Mattle H: *Kurzlehrbuch Neurologie*. 3. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011
- Munemasa Y, Kitaoka Y, Kuribayashi J, Ueno S (2010): Modulation of mitochondria in the axon and soma of retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *J Neurochem* 115, 1508–1519
- Niedermayr A (2010): <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741> [Zugriff am 22.02.2017]
- Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Bruck W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M (2011): A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med* 17, 495–499
- Obert D, Helms G, Sattler MB, Jung K, Kretzschmar B, Bähr M, Dechent P, Diem R, Hein K (2016): Brain Metabolite Changes in Patients with Relapsing-Remitting and Secondary Progressive Multiple Sclerosis: A Two-Year Follow-Up Study. *PLOS ONE* 11, e0162583

- Oehmichen M, Meissner C, Schmidt V, Pedal I, König HG, Saternus KS (1998): Axonal injury - a diagnostic tool in forensic neuropathology? *Forensic Sci Int* 95, 67–83
- Ohki K, Chung S, Ch'ng YH, Kara P, Reid RC (2005): Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* 433, 597–603
- Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M (2004): A temporal study of axonal degeneration and glial scar formation following a standardized crush injury of the optic nerve in the adult rat. *Restor Neurol Neurosci* 22, 1–10
- Oksenberg JR, Barcellos LF (2000): The complex genetic aetiology of multiple sclerosis. *J Neurovirol* 6 Suppl 2, S10-4
- Perk A : Einfluss der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf zelluläre Adhäsionsprozesse an der Gefäßwand in vivo: Untersuchungen mit der Hilfe der Intravitalmikroskopie an zwei Verletzungsmodellen der Maus. Med. vit. Diss. Tübingen 2012
- Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Göppfarth D (2014): Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland. Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung. *Nervenarzt* 85, 990–998
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292–302
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13, 227–231
- Putnam TJ (1936): Studies in multiple sclerosis. *Ann Intern Med* 9, 854
- Putzki N, Yaldizli O, Mäurer M, Cursiefen S, Kuckert S, Klawe C, Maschke M, Tettenborn B, Limmroth V (2010): Efficacy of natalizumab in second line therapy of relapsing-remitting multiple sclerosis: results from a multi-center study in German speaking countries. *Eur J Neurol* 17, 31–37
- Rieckmann P (2006): Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose, aktuelle Therapieempfehlungen. *Nervenarzt* 77, 1506–1518

- Rieckmann P (2009): Concepts of induction and escalation therapy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 277 Suppl 1, S42-5
- Rietberg MB, Brooks D, Uitdehaag, BM, Kwakkel G (2005): Exercise therapy for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* CD003980
- Rose AS, Ellison GW, Myers LW, Tourtellotte WW (1976): Criteria for the clinical diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology* 26, 20–22
- Sadovnick AD, Ebers GC (1995): Genetics of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 13, 99–118
- Sattler MB, Togni M, Gadjanski I, Suhs K, Meyer N, Bähr M, Diem R (2008): Strain-specific susceptibility for neurodegeneration in a rat model of autoimmune optic neuritis. *J Neuroimmunol* 193, 77–86
- Scheumann S: Die Wirkung eines RGMa-Antikörpers im Optikusneuritis-Modell. Med. Diss. Göttingen 2010
- Schmidt A, Sucke J, Fuchs-Moll G, Freitag P, Hirschburger M, Kaufmann A, Garn H, Padberg W, Grau V (2007): Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J Leukoc Biol* 81, 186–194
- Schönfelder T, Pöhlau D: Früherkennung und Diagnostik der Multiplen Sklerose. In: Kip M, Schönfelder T, Bleß HH (Hrsg.): *Weißbuch Multiple Sklerose: Versorgungssituation in Deutschland*. Springer, Berlin 2016, 23-54
- Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, Nagler B, Sibley WA, Tourtellotte WW, Willmon TL (1965): Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122, 552–568
- Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S (1994): Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol* 88, 433–439
- Simka M (2009): Blood brain barrier compromise with endothelial inflammation may lead to autoimmune loss of myelin during multiple sclerosis. *Curr Neurovasc Res* 6, 132–139
- Smith KJ, Kapoor R, Felts PA (1999): Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol* 9, 69–92

- Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC (1997): Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 3, 1394–1397
- Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke HJ (1995): Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 68, 2588–2600
- Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N (2011): Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 52, 434–441
- Stefano N de, 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 (Pt 8), 1469–1477
- Steffler A, Brehm U, Storch M, Lambracht-Washington D, Bourquin C, Wonigeit K, Lassmann H, Lington C (1999): Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the "resistant" Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. *J Immunol* 163, 40–49
- Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H (1998a): Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43, 465–471
- Storch MK, Steffler A, Brehm U, Weissert R, Wallström E, Kerschensteiner M, Olsson T, Lington C, Lassmann H (1998b): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8, 681–694
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New Engl J Med* 338, 278–285
- Uhthoff W: Untersuchungen über die bei der multiplen Herdsklerose vorkommenden Augenstörungen. August Hirschwald (Verlag), Berlin 1889

- van Walderveen MA, Barkhof F, Hommes OR, Polman CH, Tobi H, Frequin ST, Valk J (1995): Correlating MRI and clinical disease activity in multiple sclerosis: relevance of hypointense lesions on short-TR/short-TE (T1-weighted) spin-echo images. *Neurology* 45, 1684–1690
- Volgger M und Lichtscheidl K (2008): www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/definition/1_einleitung.htm [Zugriff am 02.03.2017]
- Weissert R, Wallström E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, Lington C, Olsson T (1998): MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest* 102, 1265–1273
- Wilkins A, Kondo Y, Song J, Liu S, Compston A, Black JA, Waxman SG, Duncan ID (2010): Slowly progressive axonal degeneration in a rat model of chronic, nonimmune-mediated demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 1256–1269
- Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80, 695–705

DANKSAGUNG

Prof. DR. KATHARINA HEIN möchte ganz besonders für die wertvollen Anregungen, Diskussionen, professionellen Kritiken und für die Betreuung meiner gesamten Arbeit danken.

Mein herzlicher Dank gilt zudem DR. BENEDIKT KRETZSCHMAR für die freundliche Unterstützung, Betreuung und Anregung zu dieser Arbeit. Sein Engagement, das Interesse an meinen Fortschritten sowie die konstruktiven Kritiken trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Dankbar für die hervorragende Zusammenarbeit bin ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. DR. KATHARINA HEIN. DR. SABINE HEROLD danke ich für die außerordentliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente, IRINA GRAF danke ich für die geduldige Anleitung der Arbeitsmethoden, bei DR. PRATEEK KUMAR bedanke ich mich für den zuvorkommenden Rat.

Ferner danke ich PD DR. JAN KOCH für die fachliche Unterstützung, sowohl bei der Durchführung der Versuche als auch bei deren Auswertung. Für die positive Kritik und konstruktive Diskussion bedanke ich mich zudem bei PROF. DR. PAUL LINGOR.

Für die Bereitstellung des Virus bedanke ich mich herzlich bei PROF. DR. UWE MICHEL sowie für die Bereitstellung des MOG bei PROF. DR. CHRISTINE STADELMANN.

