

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

# **Schwannzell-Remyelinisierung bei Neuromyelitis optica**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Parinaz Yavarzadeh**

aus

Sari/Iran

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuerin: Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler

### **Prüfungskommission**

Betreuerin: Frau Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler  
Korreferentin: Frau Prof. Dr. Francesca Odoardi  
Promoter-Vertretung: Herr Prof. Dr. Ralf Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 07.11.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Schwanzzell-Remyelinisierung bei Neuromyelitis optica“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, November 2023

Parinaz Yavarzadeh

*Die Dissertation widme ich meinen Eltern, meinen Brüdern und meinen Engsten,  
die mir so oft Kraft gegeben haben. Die Widmung gilt auch meiner Betreuerin  
Christine, die mir in den Jahren geduldig und liebevoll zur Seite stand.*

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	V
Diagrammverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Definition.....	1
1.2 Epidemiologie.....	2
1.3 Symptome .....	3
1.4 Krankheitsverlauf .....	3
1.5 Diagnostik.....	5
1.6 Serologie .....	6
1.7 NMO-Kriterien.....	7
1.8 Pathogenese der NMO.....	11
1.9 Aktive NMO-Läsionen .....	12
1.10 Inaktive NMO-Läsionen.....	13
1.11 Therapie .....	13
1.12 Remyelinisierung.....	14
1.13 Rolle der Oligodendrozyten .....	15
1.14 Rolle der Astrozyten.....	16
1.15 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Patientinnen und Patienten.....	17
2.2 Gewebe .....	19
2.3 Histologische Färbungen.....	19
2.4 Immunhistochemische Färbungen .....	21
2.4.1 MBP, MAG, PLP, PO .....	24
2.4.2 Kim1P, MRP14.....	25
2.4.3 GFAP, NogoA .....	25
2.4.4 NF200, APP .....	25
2.5 Fluoreszenzmikroskopie.....	25
2.6 Lichtmikroskopische und Fluoreszenz-Doppelmarkierungen.....	26

2.7	GFAP-P0 Fluoreszenz-Doppelfärbung.....	27
2.8	Mikroskopie .....	28
2.9	Morphometrie und Statistik .....	28
2.9.1	Auswahl der Läsionen .....	28
2.9.2	Stadieneinteilung der Läsionen .....	30
2.9.3	Morphometrie.....	31
2.9.4	Statistische Darstellung der Ergebnisse.....	31
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Charakterisierung der untersuchten Läsionen .....	33
3.2	Schwanzzell-Remyelinisierung in NMO-Läsionen .....	36
3.3	Reduktion der Dichte an Oligodendrozyten in Schwanzzell-remyelinisierten Arealen .....	40
3.4	Astrozytendichte in SZR-Arealen .....	44
3.5	Axone in den SZR-Arealen.....	48
3.6	Ausmaß der Schwanzzell-Remyelinisierung bezogen auf das Läsionsstadium.....	53
3.7	Korrelation zwischen Ausmaß der Schwanzzell-Remyelinisierung und der Krankheitsdauer .....	53
4	Diskussion.....	55
4.1	Ziele der Arbeit.....	55
4.2	Unterschiede zwischen MS und NMO .....	55
4.3	Histopathologische Beobachtung in den NMO-Läsionen.....	55
4.4	Rolle und Art der Remyelinisierung .....	56
4.5	Was ist die Schwanzzelle? .....	56
4.6	Schwanzzell-Remyelinisierung im peripheren Nervensystem .....	57
4.7	Schwanzzell-Remyelinisierung im ZNS .....	59
5	Zusammenfassung .....	63
6	Literaturverzeichnis.....	64

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gadolinium-anreichernde Läsionen des Rückenmarks bei MS und NMO .....	6
Abbildung 2: Pathogenese der NMO .....	12
Abbildung 3: Biotin-Avidin-Komplex (aus Dianova FAQ o. D.).....	22
Abbildung 4: Schema der fluoreszenzbasierten Doppelmarkierung (aus Hoyt 2021) .....	27
Abbildung 5: Gescannter Objektträger eines Rückenmarksquerschnitts einer NMO-Patientin.....	33
Abbildung 6: Ausgedehnte Reduktion der AQP-4-Immunreaktivität in einer NMO-Läsion	34
Abbildung 7: Aspekte aktiver NMO-Läsionen.....	34
Abbildung 8: Aktive NMO-Läsion.....	35
Abbildung 9: Inaktive NMO-Läsion .....	35
Abbildung 10: Übergang Spinalnerv – Schwanzzell-remyelinisiertes Läsionsareal .....	37
Abbildung 11: Darstellung kleiner SZR-Areale in der P0-Färbung.....	38
Abbildung 12: Subpiale Ausdehnung von P0-positiven Zellen .....	38
Abbildung 13: Perivaskulär betonte Schwanzzell-Remyelinisierung .....	39
Abbildung 14: Schwanzzell-remyelinisiertes Areal in den unterschiedlichen Färbungen ..	40
Abbildung 15: Verlust von Myelin im Läsionsareal in der LFB/PAS-Färbung .....	42
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung geschädigter Oligodendrozyten und transportgestörter Axone in einem NMO-Läsionsareal .....	42
Abbildung 17: Oligodendrozytenreduktion in einem SZR-Areal im Vergleich zur NAWM..	43
Abbildung 18: Vereinzelt vorliegende NogoA-positive Zelle in einem SZR-Areal .....	43
Abbildung 19: Vergleich der P0- und NogoA-positiven Zellen in einem Schwanzzell-remyelinisierten Areal .....	44
Abbildung 20: Dichte der Astrozyten und SZR-Areale .....	46
Abbildung 21: Reaktive Astroglieose am Rand von SZR-Arealen .....	47
Abbildung 22: Unvollständige <i>Glia limitans</i> in der fluoreszenzmikroskopischen Doppelfärbung GFAP/P0 einer NMO-Läsion .....	47
Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Doppelfärbung von P0- und GFAP-positiven Zellen zur Veranschaulichung der Dichtereduktion von Astrozyten sowie Störung der <i>Glia limitans</i> .....	48
Abbildung 24: Axonale Schädigung in einer NMO-Läsion .....	50
Abbildung 25: Axone in SZR-Arealen im Vergleich zur NAWM .....	51

Abbildung 26: Axondichte in SZR- und nicht SZR-Arealen einer NMO-Läsion .....	52
Abbildung 27: Fluoreszenzbasierte Färbung eines SZR-Areals am Übergang vom PNS zum ZNS .....	52
Abbildung 28: Fluoreszenz-Doppelfärbung (P0/NF200) zur Darstellung der remyelinisierten Axone in einem SZR-Areal und der regelrecht myelinisierten Axone in einem Spinalnerv .....	52

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Verlaufsformen der NMO .....	5
Tabelle 2: <i>Red-Flag</i> -Symptome der NMO-Diagnostik .....	8
Tabelle 3: Vergleich von NMO und multipler Sklerose.....	9
Tabelle 4: Diagnosekriterien von NMOSD .....	10
Tabelle 5: Patientendaten der untersuchten NMO-Fälle .....	18
Tabelle 6: Verwendete Primär-Ak.....	23
Tabelle 7: Verwendete Sekundär-Ak .....	24
Tabelle 8: Krankheitsdauer, Läsionsstadium und Größe des SZR-Areals. ....	54

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Dichte NogoA- und p25-positiver Zellen in SZR-Arealen und nicht SZR-Arealen verglichen zur NAWM .....	41
Diagramm 2: Dichte GFAP-positiver Zellen in SZR-Arealen .....	44
Diagramm 3: Relative axonale Dichte in SZR- Arealen .....	49
Diagramm 4: Größe des SZR- Areals nach Läsionsstadium .....	53
Diagramm 5: Schwannzell-Remyelinisierung in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer ...	54

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym ( <i>angiotensin converting enzyme</i> )
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein ( <i>amyloid precursor protein</i> )
AQP	Aquaporine
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser ( <i>aqua bidestillata</i> )
Auto-Ak	Autoantikörper
BCAS1	Brustkarzinom-amplifizierte Sequenz 1 ( <i>breast carcinoma-amplified sequence 1</i> )
BMP	Knochenmorphogenetische Proteine ( <i>bone morphogenetic protein</i> )
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauteil ( <i>charge-coupled device</i> )
ENA	Autoantikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene
ErbB2/B3	Rezeptor-Tyrosinprotein-Kinase
ERK	Serin/Threonin-Kinase ( <i>extracellular-signaled regulated kinases</i> )
Fab	Antigen-bindendes Fragment ( <i>fragment antigen binding</i> )
Fc	Kristallisierbares Fragment ( <i>fragment crystallizable</i> )
GFAP	Saures Gliafaserprotein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JNK/c-Jun	C-Jun-N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
LETM	Langstreckige transverse Myelitis ( <i>longitudinally extensive transverse myelitis</i> )
LFB	<i>Luxol fast blue</i>

MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein ( <i>myelin-associated glycoprotein</i> )
MBP	Myelin-basisches Protein ( <i>myelin-basic protein</i> )
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein ( <i>myelin-oligodendrocyte glycoprotein</i> )
MRP-14	<i>Myeloid-related protein 14</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NAWM	Normal erscheinende weiße Substanz ( <i>normal appearing white matter</i> )
NF-H	Schweres Neurofilament Polypeptid ( <i>neurofilament heavy polypeptide</i> )
NF200	Neurofilament 200 kDa
NG2	Neural/glial Antigen 2 ( <i>Neural/glial antigen 2</i> )
NMOSD	Erkrankungen aus dem Spektrum der <i>Neuromyelitis optica</i> ( <i>neuromyelitis optica spectrum disorders</i> )
NogoA	Neuriten-wachstumshemmendes Protein ( <i>neurite outgrowth inhibitory protein</i> )
Notch	Notch-Rezeptor
ON	Optikusneuritis
OPC	Oligodendrozytenvorläuferzelle ( <i>oligodendrocyte precursor cell</i> )
P0	P0-Myelin-Rezeptor
P25	P25-Myelin-Rezeptor
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
P75	P75-Neurotrophin-Rezeptor
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion ( <i>periodic acid Schiff-reaction</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PDGFRA	Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor A ( <i>platelet-derived growth factor receptor A</i> )
PLP	Proteolipid Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
RM	Rückenmark
SBB	Sudanschwarz B

SZR	Schwanzzell-Remyelinisierung
SZR-Areal	Schwanzzell-remyelinisiertes Areal
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 2 Einleitung

*Neuromyelitis optica* (NMO) ist eine chronische, autoimmun-entzündliche, Astrozyten-depletierende und -entmarkende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und betrifft typischerweise das Rückenmark (*Myelitis*) und die Sehnerven (*Neuritis nervi optici*). Die Erkrankung verläuft meist schubförmig und betrifft überwiegend Frauen. Bei über zwei Drittel der Patientinnen und Patienten lassen sich IgG gegen den Wasserkanal Aquaporin-4 (AQP-4) im Serum nachweisen. Des Weiteren kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Dichte von Astrozyten und Oligodendrozyten. Astrozyten gehören zu den Gliazellen des ZNS. Sie kommunizieren mit anderen Gliazellen, haben eine Stützfunktion im ZNS, sind beteiligt an der Blut-Hirn-Schranke und bilden eine Glianarbe – beispielsweise im Rahmen von autoimmun-entzündlichen Erkrankungen. Bei NMO kommt es zur pathologischen Veränderung und Reduktion der Astrozyten. Zudem ist eine Reduktion der Dichte der Oligodendrozyten zu beobachten. Oligodendrozyten sind ebenso Gliazellen des ZNS und bilden die Myelinscheide der Axone. Wahrscheinlich aufgrund der Schädigung der Oligodendrozyten und des Myelins kommt es nachfolgend auch zu einer axonalen Schädigung und zur Axondegeneration. Schwannzellen spielen bei der NMO ebenso eine wichtige Rolle. Schwannzellen sind Gliazellen des peripheren Nervensystems (PNS), die die Myelinscheide der Axone im PNS bilden. Sie haben die Möglichkeit zur Remyelinisierung nach einem Verlust der Myelinscheide. Sie sind auch im Stande, in das ZNS einzuwandern und auch dort Axone zu remyelinisieren. Aktuell gibt es keine kausale Therapie für die NMO. Im akuten Schub erfolgen eine Kortisonstoßtherapie sowie ggf. eine Plasmapherese. Zur Erhaltungstherapie werden Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Rituximab eingesetzt, um weitere Schübe zu verhindern. Weitere Wirkstoffgruppen wie ein IL-6-Rezeptorinhibitor sind in klinischer Erprobung, jedoch liegt aktuell noch keine Zulassung vor. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Vorgänge der Schwannzell-Remyelinisierung im Rahmen der Läsionsbildung bei der NMO aufzuzeigen und die Pathophysiologie dahinter besser zu verstehen.

### 2.1 Definition

NMO (auch Devic-Syndrom) ist eine autoimmun-entzündliche Astrozyten-depletierende und demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die charakteristisch mit einer Entzündung der Sehnerven (*Neuritis nervi optici*) und des Rückenmarks (*Myelitis*) einhergeht. Im schlimmsten Falle kann die Erkrankung zu einer Lähmung der Extremitäten und zur

Erblindung führen. Bei etwa 70 % der Patientinnen und Patienten ist NMO-IgG, welches sich gegen AQP-4-Kanäle richtet, im Serum nachweisbar. Neben der NMO gibt es weitere entzündlich-entmarkende Erkrankungen, die das ZNS betreffen, wie die multiple Sklerose (MS). MS tritt wesentlich häufiger auf als die NMO. Lange Zeit ging man davon aus, dass die NMO eine klinisch schwere Unterform der MS sei. Doch nach der Identifizierung der spezifischen anti-AQP-4-Antikörper (Ak) wird die NMO nun als eigenständige Erkrankung klassifiziert.

## **2.2 Epidemiologie**

Die Inzidenz variiert in Abhängigkeit des jeweiligen Landes. Die geringste Inzidenz zeigt sich mit 0,052 auf 100.000 Einwohnerinnen und Einwohner in Kuba und die höchste mit 0,40 auf 100.000 Einwohnerinnen und Einwohner in Dänemark. Die weltweite Prävalenz ist ebenfalls abhängig von der geographischen Lage. Auch hier zeigt sich in Kuba mit 0,52 die geringste Rate, wobei die Prävalenz in Dänemark bei 4,4 liegt (Marrie und Gryba 2013). Es gibt je nach geographischer Lage Unterschiede bezüglich des Alters beim erstmaligen Auftreten der Erkrankung. So erkranken afroamerikanische Menschen aus dem karibischen Raum in einem vergleichsweise jungen Alter, zwischen dem 16. und 30. Lebensjahr (Kitley et al. 2012). Im Vergleich dazu nimmt die Häufigkeit der NMO bei Kaukasierinnen und Kaukasier meist ab dem 46. Lebensjahr zu, und in der restlichen asiatischen Bevölkerung liegt der Krankheitsbeginn in über 40 % der Fälle zwischen dem 31. und 45. Lebensjahr (Kitley et al. 2012). Patientinnen und Patienten afrikanischer Abstammung erleiden zudem meist eine aggressivere Form der NMO, die unter anderem mit einer erhöhten Schubfrequenz und mehr Hirnläsionen einhergeht (Cabrera-Gómez et al. 2009; Palace et al. 2019). Auch ist in der nicht-weißen Bevölkerung das Sehvermögen häufig stärker eingeschränkt. Das Auftreten einer ON im vergleichsweise jüngeren Alter in der weißen Bevölkerung geht allerdings ebenso mit einer ausgeprägten Visusminderung einher. Dagegen leiden ältere Patientinnen und Patienten mit einer Myelitis ungeachtet ihrer Herkunft verstärkt an motorischen Dysfunktionen. Insgesamt tritt die NMO bei nicht-europäischen Bevölkerungsgruppen gehäuft auf.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Frauen deutlich häufiger von der NMO betroffen sind als Männer. Dabei spielt der ethnische Hintergrund bezüglich der erhöhten Prävalenz bei Frauen keine Rolle (Wingerchuk 2009). Frauen scheinen des Weiteren einem erhöhten Risiko für einen schubförmigen Verlauf der Erkrankung ausgesetzt zu sein. Ferner sind Frauen häufiger von einer transversen Myelitis betroffen als Männer (Palace et al.

2019). Die Schwere der Erkrankung bzw. die Mortalität scheinen jedoch nicht geschlechterspezifisch zu sein (Wingerchuk 2009). Das mediane Alter bei Krankheitsbeginn liegt bei 39 Jahren (Wingerchuk et al. 2007). Nichtsdestoweniger können auch Kinder und ältere Menschen von der NMO betroffen sein (Wingerchuk et al. 1999). Die NMO im Kindesalter verläuft dabei in der Regel mit mildereren motorischen Funktionseinschränkungen, mehr Hirnbeteiligung und einer früher eintretenden Behinderung des Sehvermögens (Kitley et al. 2012).

### **2.3 Symptome**

Die Symptomatik bei der NMO kann sehr plötzlich auftreten. Dabei kommt es zu einer Myelitis, die von einer unilateralen oder bilateralen ON begleitet sein kann (Wingerchuk et al. 1999). Myelitis und ON müssen nicht gleichzeitig auftreten. Weitere charakteristische Symptome der NMO sind Erbrechen, Übelkeit und ein permanenter Schluckauf; Symptome, die auf eine Läsion in der *Area postrema* zurückzuführen sind und eher im Rahmen einer akuten Myelitis als im Rahmen der ON auftreten (Misu et al. 2005). Die ON kann sich entweder in Form eines plötzlich auftretenden Gesichtsfeldausfalls in einem oder mehreren Quadranten bemerkbar machen oder auch in Form einer Diplopie (Wang et al. 2011). Darüber hinaus können plötzliche Sensibilitätsstörungen in den Extremitäten auftreten. Bei manchen Patientinnen und Patienten mit schubförmigem Verlauf werden zudem das positive Lhermitte-Zeichen, radikuläre Schmerzen und paroxysmaler tonischer Spasmus beobachtet (Wingerchuk et al. 1999).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Hauptmanifestationsorte der NMO das Rückenmark, die Sehnerven, der Hirnstamm und das Großhirn sind (Wingerchuk et al. 1999).

### **2.4 Krankheitsverlauf**

Vor dem 20. Jahrhundert ging man davon aus, dass die NMO lediglich eine monophasisch verlaufende Erkrankung sei, die sich durch eine simultane bilaterale ON und eine transverse Myelitis auszeichnet. Im 20. Jahrhundert kristallisierte sich heraus, dass die NMO überwiegend als schubförmig verlaufende Erkrankung auftritt (Jarius und Wildemann 2013). Die Ausprägung der Symptomatik und die Auswirkungen auf die Patientinnen und Patienten hängen davon ab, welche der beiden Verlaufsformen die Erkrankung annimmt (Wingerchuk et al. 1999). Dabei kommt der schubförmige Verlauf deutlich häufiger vor als der monophasische (Wingerchuk et al. 1999). Die Zeitspanne vom Erstereignis bis zur

vollständigen Entfaltung der Symptomatik bei ON und Myelitis ist bei Patientinnen und Patienten mit schubförmigem Verlauf größer als bei Patientinnen und Patienten mit einem monophasischen Verlauf. Kommt es vier Wochen nach dem ersten Schub zu einem weiteren Schub, spricht man von einem schubförmigen Verlauf der NMO. Allerdings ist die Schwere der Schübe bei der letztgenannten Gruppe gravierender, was sich u. a. in der Häufigkeit einer Paraplegie zeigte (Wingerchuk et al. 1999). Somit ist bei Patientinnen und Patienten mit Auftreten einer bilateralen ON und einer Myelitis innerhalb eines Monats von einem monophasischen Verlauf auszugehen (Wingerchuk et al. 1999). Charakteristisch für einen schubförmigen Verlauf sind außerdem noch das weibliche Geschlecht, erstmaliger Schub im höheren Lebensalter und das Vorhandensein von weiteren systemischen Autoimmunerkrankungen (Wingerchuk et al. 1999).

Patientinnen und Patienten mit einem monophasischen Verlauf zeigen im Langzeitvergleich einen günstigeren Erkrankungsverlauf als Patientinnen und Patienten, die mehrere Schübe erlitten haben. Patientinnen und Patienten, die an einer schubförmig verlaufenden NMO leiden, versterben häufiger an einer respiratorischen Insuffizienz (Wingerchuk et al. 1999). In diesem Falle treten die Entzündungen im Rückenmark und im Sehnerv nacheinander innerhalb weniger Stunden bis weniger Tage auf. Die Prognose ist von mehreren Faktoren abhängig: Einen negativen Einfluss auf die Prognose haben eine hohe Anzahl an Schüben in den ersten zwei Jahren und die Schwere des ersten Schubes. Hierbei weiß man, dass das Auftreten von zwei Schüben im Sinne einer ON in den ersten zwei Jahren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für weitere Schübe – meist ON – einhergeht (Palace et al. 2019). Somit steigt hiermit auch die Wahrscheinlichkeit zu erblinden (Palace et al. 2019). Des Weiteren hat eine Komorbidität mit systemischen Erkrankungen wie dem systemischen *Lupus erythematosus* oder anderen Autoimmunerkrankungen einen prognostisch ungünstigen Einfluss (Wingerchuk und Weinshenker 2003; Ghezzi et al. 2004).

In Tabelle 1 sind die Unterschiede des monophasischen und des schubförmigen Verlaufs zusammengefasst.

**Tabelle 1: Vergleich der Verlaufsformen der NMO**

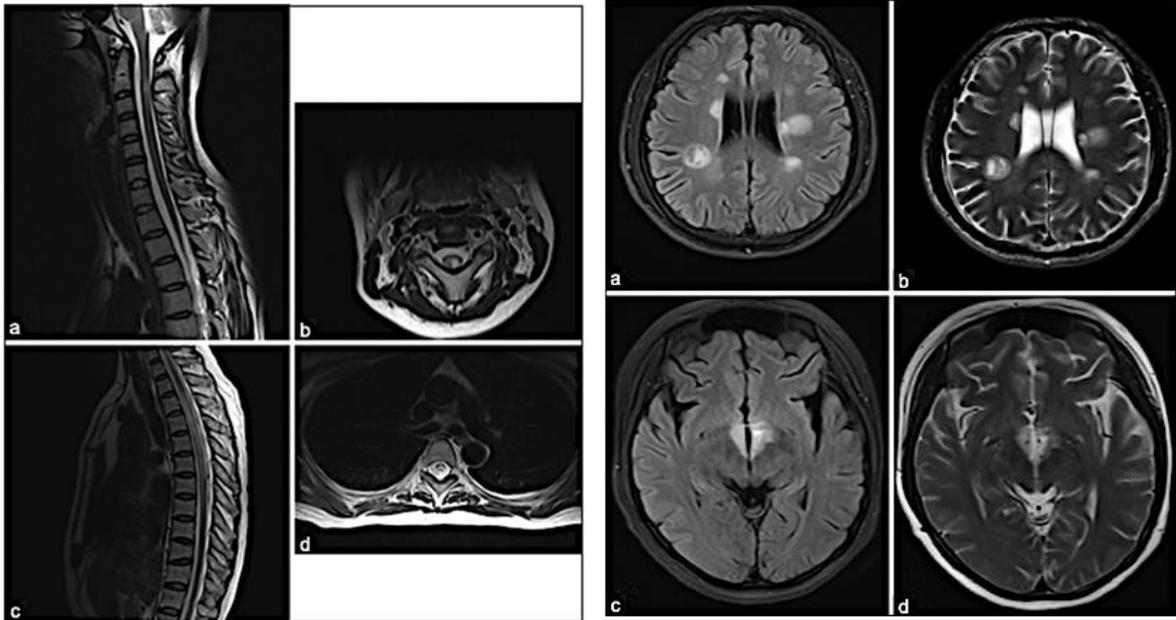
nach (Wingerchuk et al. 1999; Wingerchuk 2009; Jarius et al. 2012; Wingerchuk und Weinshenker 2012)

	<b>monophasisch</b>	<b>schubförmig</b>
<b>Geschlecht</b>	m = w	w >> m, dabei Erstereignis bei Frauen im höheren Alter
<b>Ereignis</b>	einmalig oder innerhalb eines Monats	schubweise, mind. 2 x lange Zeitspanne zwischen den Ereignissen
<b>Optikusneuritis</b>	oft bilateral	unilateral
<b>Myelitis</b>	simultan mit ON	isoliert vorkommend
<b>bilaterale ON + Myelitis</b>	typisch	so gut wie nicht vorkommend
<b>Begleitsymptomatik (paroxysmaler tonischer Spasmus, pos. Lhermitte-Zeichen, radikuläre Schmerzen)</b>	selten bis nicht vorkommend	häufig
<b>systemische Autoimmunerkrankung</b>	selten	häufig
<b>Besserung der Symptomatik</b>	wenig Besserung der Sphinkterfunktion & Motorik	Besserung deutlich
<b>Langzeitverlauf (Sehschärfe, Motorik, Sensorik)</b>	günstiger, gute ambulante Versorgung möglich	ungünstig
<b>NMO-IgG im Serum</b>	selten	häufig

## 2.5 Diagnostik

Die Kriterien für das Vorliegen eines „klassischen Devic-Syndroms“, das 1884 von Eugène Devic beschrieben wurde, beinhalteten ursprünglich das simultane Auftreten einer ON und einer Rückenmarksentzündung. Allerdings wurden die Kriterien der NMO über die Jahre hinweg modifiziert. Mit der Entdeckung des hochspezifischen NMO-IgGs haben Lennon und Kolleginnen und Kollegen zu einem bedeutenden Fortschritt in der Diagnostik der NMO beigetragen (2004). Das NMO-IgG richtet sich gegen den Wasserkanal AQP-4 (Wingerchuk et al. 2006). Die Hauptkriterien für das Vorliegen der NMO sind weiterhin eine Entzündung der Sehnerven und eine langstreckige Myelitis. Zwei von drei weiteren Kriterien müssen zudem erfüllt sein: Dazu zählen eine in der T2-Wichtung der Magnetresonanztomographie (MRT) sichtbare langstreckige, im Querschnitt ggf. ringförmige Läsion im Rückenmark, die sich über drei oder mehr Segmente erstreckt (Pittock et al. 2006; Sechi et al. 2019). Abbildung 1 zeigt MS- und NMO-typische Rückenmarksläsionen. Weitere Kriterien sind ein Ausschluss MS-spezifischer Hirnläsionen anhand einer kranialen MRT-Aufnahme oder ein

seropositiver Status der NMO-IgG-Ak. Eine Liquorpleozytose oder Liquorneutrophilie und das Auftreten von Paresen nach einem schweren Schub stellen weitere Kriterien für das Vorliegen einer NMO dar. Bei wenigen NMO-Patientinnen und -Patienten sind darüber hinaus Läsionen des Gehirns zu beobachten, was früher ein Ausschlusskriterium für die Diagnosestellung bedeutete. Diese Hirnläsionen entwickeln sich jedoch häufig erst im späteren Krankheitsverlauf und sind klinisch meist unauffällig (Pittock et al. 2006).



**Abbildung 1: Gadolinium-anreichernde Läsionen des Rückenmarks bei MS und NMO**

links (a), (b): MS-typische kurzstreckige Läsion. Hierbei typisch hyperintens in T2 (a), ringförmig in T1/Gd (b) und axial. Die Hirnläsionen in der rechten Abbildung bei (a) und (b) sind typisch für MS und periventriculär angeordnet.

links (c) und (d): NMOSD-typische langstreckige Läsion. Hierbei hyperintens in T2 (c), ringförmig in T1/Gd (d). Die Hirnläsionen in der rechten Abbildung unter (c) und (d) können bei NMOSD auftreten und kommen überwiegend periependymal vor (aus Chen et. al 2016).

Lizenzangabe: Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License

## 2.6 Serologie

Das wohl wichtigste diagnostische Kriterium ist das Vorliegen von anti-AQP-4-Ak, die erstmals von Lennon und Kolleginnen und Kollegen beschrieben wurden. NMO-Ig zeigte bei Patientinnen und Patienten mit typischem optiko-spinalen Befall eine Sensitivität von 73 % und eine Spezifität von 91 %. Das bedeutet allerdings, dass es auch Patientinnen und Patienten mit den Symptomen einer NMO gibt, die keine Auto-Ak gegen AQP-4 aufweisen (2004). In einigen Studien konnte kürzlich gezeigt werden, dass manche anti-AQP4-seronegativen NMO-Patientinnen und -Patienten Ak gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) im Serum bilden (Kitley et al. 2014). Mit der Testung auf Ak gegen MOG steigt somit die Wahrscheinlichkeit, Patientinnen und Patienten mit einer NMO zu identifizieren, die kein NMO-Ig im Serum aufweisen. In Anbetracht der Korrelation von

NMO und anderen nicht-organspezifischen Autoimmunerkrankungen, wie dem Sjögren-Syndrom oder dem systemischen *Lupus erythematoses*, ist es zudem wichtig, spezifisch auf extrahierbare nukleäre (ENA) und antinukleäre (ANA) Ak zu untersuchen (Pittock et al. 2008).

Wie bereits oben angesprochen, beobachtet man bei der NMO eine ausgeprägte Liquorpleozytose mit einer Zellzahl von über  $50 \times 10^6$  WBC/L (Wingerchuk et al. 2007). Dabei ist das Verhältnis der Leukozyten in Richtung der Neutrophilen ( $>5/\text{mm}^3$ ) und Eosinophilen verschoben. Dagegen liegen nur bei 30 % der Patientinnen und Patienten mit NMO oligoklonale Banden vor (de Seze et al. 2002).

## 2.7 NMO-Kriterien

Die diagnostischen Kriterien der *Neuromyelitis optica*-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD) wurden 2013 vom internationalen Gremium für NMO-Diagnostik aktualisiert. Ziel war es, Patientinnen und Patienten zu identifizieren, die zwar Symptome einer NMO zeigten, jedoch nicht den gesamten definitionsgemäßen Kriterienkatalog der NMO erfüllten. So gibt es nun eine Liste mit Kriterien für die Diagnostik der NMO mit und ohne oder mit unklarem AQP-4-IgG-Status. Hinzu kommt eine Liste mit *Red-Flag*-Symptomen, die untypisch für eine NMOSD sind, sie aber nicht ausschließen. In Tabelle 2 sind diese nochmals zusammengefasst. Ein Überblick über die Unterschiede zwischen der NMO und der MS sind in Tabelle 3 aufgelistet. Schließlich sind in Tabelle 4 die Diagnosekriterien der NMO dargestellt.

Tabelle 2: *Red-Flag-Symptome der NMO-Diagnostik*

<b>Red Flags (klinisch)</b>		
<b>Klinisch/laborchemisch</b>	<b>Mögliche Differentialdiagnose</b>	<b>Neurologische Syndrome und assoziierte Komorbiditäten, die die NMOSD nachahmen (klinisch/laborchemisch/bildgebend)</b>
Verschlechterung des neurologischen Zustandes unabhängig von Schüben	MS	<u>Sarkoidose</u> – geht einher mit mediastinaler Adenopathie, Fieber, Nachtschweiß, Anstieg des Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE) oder Interleukin-2 im Serum
Untypisches Auftreten der Schübe < 4 Stunden	Ischämischer Infarkt im Bereich des Rückenmarks	<u>Tumorleiden</u> – kann einhergehen mit paraneoplastischen Syndromen oder Lymphom ( <i>Collapsin mediator-protein 5</i> assoziiert mit Optikusneuropathie/Myelopathie oder anti-Ma-assoziertes Diencephalon-Syndrom)
Kontinuierliche Verschlechterung des Zustandes innerhalb > vier Wochen nach dem ersten Schub	Sarkoidose oder paraneoplastisch	<u>Chronische Infektion</u> – z. B. Humanes Immundefizienz-Virus (HIV), Syphilis
Partielle transverse Myelitis – v. a., wenn bildgebend eine LETM ausgeschlossen worden ist	MS	
Oligoklonale Banden	MS (in > 80% positiv, bei NMO in < 20 %)	
<b>Red Flags (bildgebend)</b>		
<b>Bildgebend (MRT/T2-Sequenz, die MS-typische Läsionen darstellt)</b>		
Gehirn		Fingerförmige, in den Balken einstrahlende Läsionen
		Ventrikel-nahe Läsionen im unteren Temporallappen
		Juxtakortikal gelegene Läsionen, die sich subkortikal ausbreiten und die U-Fasern einbinden
		Kortikale Läsionen
Rückenmark		Läsion, die < 3 Vertebraalsegmente einbezieht
		Läsionen, die überwiegend (> 70 %) peripher gelegen sind
		Diffuse Signalveränderung in der T2-Sequenz

**Tabelle 3: Vergleich von NMO und multipler Sklerose**  
nach (Weinshenker 2007; Wingerchuk et al. 2007; Brück et al. 2012)

	<b>Neuromyelitis optica</b>	<b>Multiple Sklerose</b>
<b>Definition</b>	Transverse Myelitis und ON und zwei der vier Kriterien:  Rückenmarksläsion > 3 Segmente, NMO-IgG seropositiv, nicht MS-spezifische Hirnläsionen	ZNS-Symptomatik und Zeichen der Beteiligung der weißen Substanz;  Beweis für Progredienz der Entmarkungsherde mittels MRT
<b>Verlauf</b>	80-90 % schubförmig  10-20 % monophasisch	85 % schubförmig  15 % primär-progredient
<b>medianes Alter beim Erstauftreten</b>	39	29
<b>Verhältnis w:m</b>	9:1	2:1
<b>Rückenmark</b>	langstreckige Läsion > 3 Segmente	kurzsegmentale periphere, asymmetrische Läsion < 3 Segmente
<b>Gehirn</b>	normal oder unspezifische Läsion(en) der weißen Substanz; bevorzugte Lokalisationen: Hypothalamus, <i>Corpus callosum</i> , periventrikulär, Hirnstamm	periventrikuläre Läsionen der weißen Substanz
<b>Liquor-/Serumdiagnostik</b>		
<b>Oligoklonale Banden</b>	15-30 % positiv	85 % positiv
<b>Liquorserologie</b>	ausgeprägte Pleozytose mit Eosinophilen und Neutrophilen	milde Pleozytose, mononukleäre Zellen
<b>AQP-4-IgG im Serum</b>	70 % positiv	negativ
<b>Systemische Autoantikörper (Auto-Ak)</b>	häufig, oft mehrere Auto-Ak simultan vorhanden	Selten

Tabelle 4: Diagnosekriterien von NMOSD

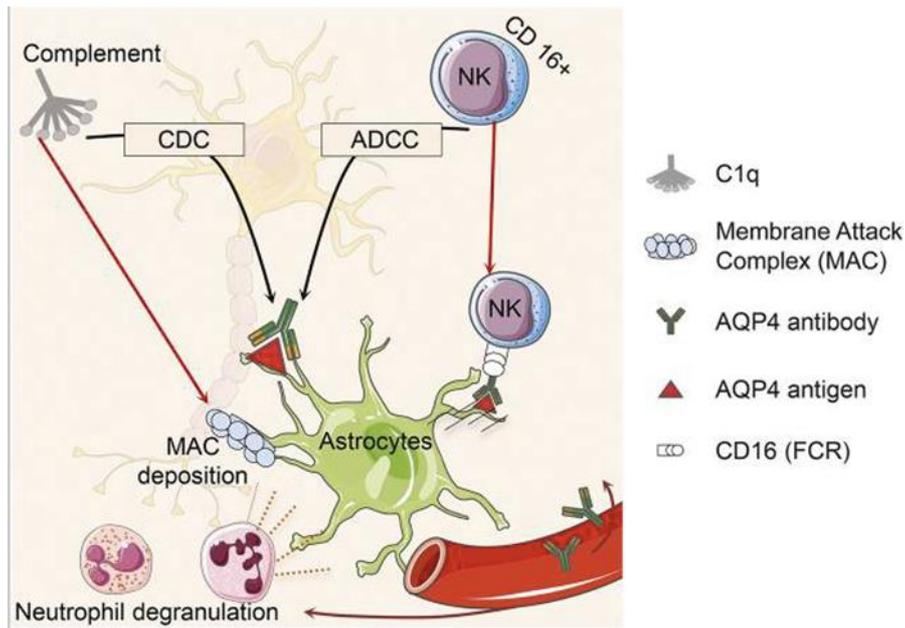
NMOSD mit AQP-4-IgG-Nachweis	NMOSD ohne Nachweis von AQP-4-IgG bzw. mit unklarem AQP-4-IgG-Status	Hauptkriterien	Ergänzende MRT-Befunde für NMOSD ohne Nachweis bzw. mit unklarem Status von AQP-4-IgG
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorhandensein von mind. 1 Hauptsymptom</li> <li>• seropositiv für AQP-4-IgG</li> <li>• Ausschluss anderer Diagnosen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorhandensein von mind. 2 Hauptsymptomen mit Erfüllen weiterer Kriterien:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ mind. 1 Hauptsymptom muss sein: ON, langstreckige Remyelinisierungsläsion oder <i>Area Postrema</i>-Syndrom</li> <li>○ räumliche Trennung der Symptome</li> </ul> </li> <li>○ Erfüllen der MRT-Kriterien</li> <li>• seronegativ für AQP4-IgG</li> <li>• Ausschluss anderer Diagnosen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NMO-IgG seropositiv</li> <li>• Akute Myelitis mit langstreckiger Rückenmarksläsion &gt; 3 Segmente in der T2-gewichteten MRT-Aufnahme</li> <li>• <i>Area postrema</i>-Syndrom (Schluckauf, Erbrechen, Übelkeit unklarer Ursache)</li> <li>• akutes Hirnstamm-Syndrom</li> <li>• symptomatische Narkolepsie oder akutes Diencephalon-Syndrom mit NMO-spezifischem MRT-Befund</li> <li>• symptomatisches zerebrales Syndrom mit NMO-spezifischen Hirnläsionen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• akute ON               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ ohne Nachweis von Hirnläsionen</li> <li>oder</li> <li>○ Läsion im <i>Nervus opticus</i></li> </ul> </li> <li>• Läsion im <i>Chiasma opticum</i></li> <li>• akute Myelitis               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ langstreckige Läsion &gt; 3 Segmente</li> <li>oder</li> <li>○ fokale Läsion von &gt; 3 Segmenten</li> </ul> </li> <li>• <i>Area postrema</i>-Syndrom               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Läsion in der <i>Medulla oblongata</i></li> <li>oder</li> <li>○ Läsion in der <i>Area postrema</i></li> </ul> </li> <li>• akutes Hirnstamm-Syndrom</li> <li>• peripendymale Hirnstammläsion</li> </ul>

## 2.8 Pathogenese der NMO

Die Pathogenese der NMO beruht auf einer autoimmunen Astrozytopathie (Lennon et al. 2005; Lucchinetti et al. 2014a), bedingt durch IgG-Ak gegen AQP-4-Wasserkanäle, die an den perivaskulären Astrozytenfußfortsätzen lokalisiert sind. Diese wiederum umgeben die Kapillaren und tragen zur Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke, zur Interaktion zwischen Hirnparenchym und perivaskulärem Raum und zur Koordination des Wasseraustausches zwischen dem Gehirn und dem Liquorraum bei (Nicchia et al. 2004).

Die Bindung von NMO-IgG an AQP-4 führt zu einer Immunreaktion, die mit Komplementaktivierung einhergeht (Lucchinetti et al. 2014a; Soltys et al. 2019). Infolgedessen beobachtet man häufig eine vaskulozentrische Ig-Ablagerung sowie Produkte der Komplementaktivierung (Lucchinetti et al. 2002; Soltys et al. 2019). Daneben kommt es bei der NMO zu einer Lymphozyteninfiltration, die je nach Läsionsstadium variiert (Lucchinetti et al. 2002). Typisch für NMO-Läsionen ist zudem eine Granulozyteninfiltration mit Neutrophilen und Eosinophilen, die vor allem in frühen Läsionsstadien auftritt (Lucchinetti et al. 2002; Brück et al. 2012). Die Beteiligung von Eosinophilen an der perivaskulären Entzündungsreaktion im Rahmen einer aktiven Läsion scheint mit einer Progredienz der Erkrankung einherzugehen (Almekhlafi et al. 2011). Ein weiterer gewichtiger Aspekt ist die Lokalisation der Läsionen. Dabei fällt auf, dass Rückenmarksläsionen tendenziell zentral liegen und zu 59 % die graue Substanz betreffen (Misu et al. 2007). Im Gegensatz zur früheren Annahme, dass Hirnläsionen eine NMO ausschließen (Wingerchuk et al. 1999), ist heutzutage empirisch belegt, dass Hirnläsionen bei vielen NMO-Patientinnen und -Patienten vorkommen (Pittock et al. 2006). Die primär betroffenen Hirnareale sind der Hypothalamus, das *Corpus callosum*, periventrikuläre Regionen sowie AQP-4-reiche Regionen des Hirnstamms (Pittock et al. 2006). Häufig ist die *Area postrema* betroffen, was die Symptome wie den persistierenden Schluckauf, Übelkeit und Erbrechen erklärt. Diese Symptome sind als Früh-Symptome der NMO anerkannt (Popescu et al. 2011). Auch die *Area postrema* zeigt eine erhöhte Dichte an AQP-4-Expression (Pittock et al. 2006).

In Abbildung 2 ist dargestellt, wie AQP-4-IgG in das ZNS eindringen und an den AQP-4-Kanal binden. Es kommt zur Komplementaktivierung, woraufhin Monozyten, Eosinophile und Neutrophile ins ZNS einwandern. Die daraus resultierende Inflammation führt zur Schädigung der Astrozyten, zum Verlust von Oligodendrozyten, zur Demyelinisierung, zum Verlust von Axonen und Neuronen und schließlich zu neurologischen Ausfällen.



**Abbildung 2: Pathogenese der NMO**

Die Abbildung zeigt die Bindung zwischen dem AQP-4-IgG, dem AQP-4-Ak und einem Astrozyten. Infolge dieser Bindung kommt es zum einen durch die Komplementaktivierung und zum anderen durch eine zelluläre Antwort der Killerzellen infolge der Ak-Bindung zu einer Zytotoxizität aus (Davoudi et al. 2016).

Lizenzangabe: Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND)

Legende:

C1q = Feedbackuntereinheit des Komplementfaktor C1.  
 MAC = Membrane Attack Complex (Membranangriffskomplex).  
 AQP 4 antibody = AQP-4-Ak .  
 AQP 4 antigen = AQP -4-Ag.  
 CD16 = Oberflächenprotein aus der Gruppe der Fc-Rezeptoren.

CDC = complement-dependent-cytotoxicity (komplementabhängige Zytotoxizität).  
 ADCC = antibody-dependent-cytotoxicity (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität).  
 Neutrophil degranulation = neutrophile Degranulation

**2.9 Aktive NMO-Läsionen**

Eine frühe aktive Läsion ist gekennzeichnet durch akuten Astrozytenuntergang, Astrozytenverlust und Demyelinisierung, die fokal betont perivaskulär oder meist konfluierend auftreten. Weitere Merkmale sind der Verlust von Oligodendrozyten sowie die akute axonale Schädigung. Der Verlust von AQP-4-Immunreaktivität ist häufig deutlicher ausgeprägt als der Verlust von Zellen, die positiv auf das saure Gliafaserprotein (GFAP) sind. Zudem findet sich betont perivaskulär ein entzündliches Infiltrat, an dem schaumzellige Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, Eosinophile und Neutrophile beteiligt sein können (Lucchinetti et al. 2014a). Immunhistochemisch lassen sich insbesondere perivaskulär Ablagerungen von IgG, IgM und Produkten der Komplementaktivierung mit Nachweis von C9-neo finden (Lucchinetti et al. 2002; Roemer et al. 2007). Darüber hinaus sind Makrophagen, die Myelin und ggf. Astrozytenbestandteile enthalten, zu sehen (Misu et al. 2013).

## 2.10 Inaktive NMO-Läsionen

Inaktive NMO-Läsionen zeigen Charakteristika der Reorganisation. Neben biopolaren, regenerierenden Astrozyten sind aktivierte Mikrogliazellen zu erkennen (Parratt und Prineas 2010; Lucchinetti et al. 2014b). Die Chronifizierung der Läsion ist anhand der Gliose am Rand und der zystisch degenerativen und atrophischen Veränderung der betroffenen Rückenmarksareale und des Sehnervs zu erkennen (Lucchinetti et al. 2014a). Gewebedefekte sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz des Rückenmarks können vorkommen (Lucchinetti et al. 2014a). Zudem finden sich Blutgefäße mit verdickten, hyalinisierten Wänden.

## 2.11 Therapie

Es gibt derzeit für NMOSD keine kurative Therapie. Vielmehr richtet sich die Therapie nach Behandlungskonzepten, die bei anderen Autoimmunerkrankungen wie z.B. der MS angewandt werden. Neue Medikamente wie der Komplementinhibitor Eculizumab sind mittlerweile zugelassen (Pittock et al. 2013). Lauenstein et al. berichten von einer Patientin, die von der Therapie mit dem Interleukin-6-Rezeptorantagonist Tocilizumab profitierte (Lauenstein et al. 2014). In einem Mausmodell wurde bereits ein Ak gegen den AQP-4-Ak erfolgreich erprobt (Tradtrantip et al. 2012). Zu beachten ist, dass eine Interferon-beta-Therapie, die typischerweise bei der MS angewandt wird, den Verlauf der NMO verschlechtert (Kim et al. 2012). Auch der monoklonale  $\alpha$ 4-Integrin-Ak Natalizumab zeigt zwar gute Ergebnisse bei der MS-Therapie, führt jedoch sowohl bei AQP-4-Ak-positiven als auch bei AQP-4-Ak-negativen NMO-Patientinnen und -Patienten zu vermehrten Hirnläsionen und dies sogar bereits nach einmaliger Gabe (Kleiter et al. 2012; Kitley et al. 2014). Eine beta-Interferontherapie hat in Studien ebenfalls zu einer deutlichen Progression des Erkrankungsverlaufs geführt und wird demnach nicht empfohlen (Kim et al. 2012). Ein frühzeitiger Beginn mit einer immunsuppressiven Therapie ist entscheidend, da damit weniger Schübe im Erkrankungsverlauf festgestellt wurden (Palace et al. 2019).

Bei einem akuten Schub ist der zügige Beginn einer Kortisonstoßtherapie wichtig (Beck et al. 1992). Dabei ist die initiale intravenöse Gabe von 1 g/Tag Methylprednisolon für fünf Tage der Behandlungsstandard. Danach ist die Umstellung auf eine perorale Gabe (Methylprednisolon 1 mg/kg Körpergewicht (KG)) möglich. Synergistisch zur Kortikosteroidtherapie sollte eine Plasmapherese durchgeführt werden, um die Auto-Ak

aus dem Körper zu eliminieren. In einer großen randomisierten Studie konnte die Wirksamkeit der Plasmapherese gezeigt werden (Bonnar und Cabre 2012).

Für die Erhaltungstherapie stehen einige Medikamente zur Verfügung, die das Ziel verfolgen, einen weiteren Schub zu verhindern. Ein fester Bestandteil eines häufig verwendeten Behandlungsmodells ist die orale Gabe von Kortikosteroiden (z. B. 1 mg/kg KG Prednison), die eine schnelle Wirksamkeit und Effizienz bezüglich einer langfristigen Vermeidung weiterer Schübe zeigt (Flanagan und Weinshenker 2014). Es gibt allerdings auch kortikoidsparende immunsuppressive Medikamente wie Azathioprin, die sich als effektive Therapie erwiesen haben (Costanzi et al. 2011).

Als Alternative dazu steht das immunsuppressive Medikament Mycophenolatmofetil, das in Studien mit einer Reduktion der Schübe einherging, zur Verfügung (Jacob et al. 2009). Beide genannten Medikamente entfalten ihre volle Wirkung nach einer Latenzzeit von etwa sechs Monaten. Ein weiteres Medikament ist der monoklonale anti-CD-20-Ak Rituximab, der die Anzahl der Schübe erfolgreich reduziert (Jacob et al. 2008). In mehreren Studien war die Therapie mit Rituximab einer Therapie mit Azathioprin überlegen (Nikoo et al. 2017). Insbesondere wurden unter Rituximab weniger Schübe beobachtet (Palace et al. 2019).

Nach jetzigem Stand ist eine Therapie mit Azathioprin oder Rituximab die erste Wahl (Stellmann et al. 2017). Im Falle eines Therapieversagens von Mycophenolatmofetil, Rituximab oder Azathioprin erweist sich eine Medikamentenumstellung innerhalb der genannten Gruppe als vorteilhaft, da sie eine Remission begünstigt (Mealy et al. 2014).

Neben den genannten typischen Medikamenten gibt es eine Reihe von neuen Medikamenten, die zumindest in Studien vielversprechende Ergebnisse erzielt haben. Eines dieser Medikamente ist der IL-6-Rezeptorinhibitor Tocilizumab, der die AQP-4-IgG-Produktion und die Zahl der zirkulierenden Plasmablasten verringert (Araki et al. 2014). In einem Mausmodell wurde zudem die Effizienz des monoklonalen Ak Aquaporin-4 gezeigt, der sich gegen AQP-4 richtet und die Bindung der pathogenen anti-AQP-4-Ak verhindert (Tradtrantip et al. 2012).

## **2.12 Remyelinisierung**

1906 beschrieb Otto Marburg erstmals Regenerationsmechanismen bei Patientinnen und Patienten mit MS, die als spontane Remyelinisierung interpretiert wurden. Heute weiß man, dass die Remyelinisierung bei den Demyelinisierungserkrankungen des ZNS von den Oligodendrozyten ausgeht (Prineas und Connell 1979). Gerade in frühen MS-Läsionen

findet man Remyelinisierungsherde in Form von hauchdünnen Myelinscheiden, die sich histochemisch mithilfe der Färbung mit Luxol fast blue (LFB) einfärben lassen und eine erhöhte oder regelrechte Dichte an Oligodendrozyten und ihrer Vorläuferzellen zeigen.

Auch am Rande von komplett entmarkten chronischen Läsionen von Patientinnen und Patienten mit langer MS-Vorgeschichte sind vollständig remyelinisierte MS-Areale beschrieben worden, die auch *Shadow plaques* genannt werden (Patrikios et al. 2006). Den größten Anteil der Remyelinisierung machen jedoch die Läsionen aus, die unvollständig remyelinisiert sind (Patani et al. 2007). Der limitierende Faktor für die vollständige Remyelinisierung scheint dabei der Verlust von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in demyelinisierten Herden zu sein (Prineas et al. 1993). Dennoch gibt es neural/glial antigen 2 (NG2)-positive Vorläuferzellen der Oligodendrozyten am Rande chronischer MS-Läsionen, die für die Remyelinisierung verantwortlich sein können (Chang et al. 2000). Des Weiteren konnte eine Subpopulation der Oligodendrozyten identifiziert werden, die das Protein *Breast cancer-amplified sequence 1* (BCAS1) exprimieren und in aktiv remyelinisierenden *shadow plaques* im humanen Gehirn nachweisbar sind (Fard et al. 2017).

In NMO-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die systemische Gabe von Clobetasol, einem bislang topisch bei Hauterkrankungen verwendeten Kortikosteroid, die Remyelinisierung unterstützt. Zum einen induziert es die Reifung der Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPC) in Kulturen und zum anderen führt es bei einem herbeigeführten Astrozytenschaden und einer Demyelinisierung zu einer Remyelinisierungsreaktion (Yao et al. 2016). Im Vorfeld wurde ferner eine Schwanzzellvermittelte Myelinisierung im peripheren Nervensystem (PNS) nach Clobetasol-Gabe im Mausmodell beobachtet (Morisaki et al. 2010; Liu et al. 2018).

### **2.13 Rolle der Oligodendrozyten**

Abey und Kolleginnen und Kollegen haben 1983 erstmals von einer glialen Vorläuferzelle berichtet, die je nach Medium in einen Astrozyten oder über eine Oligodendrozyten-Vorläuferzelle in einen Oligodendrozyten differenzieren kann (1983). Die OPC nehmen eine wichtige Rolle in der Remyelinisierung entmarkter Areale ein. Dabei werden die Differenzierung und Einwanderung dieser OPCs von vielen von Astrozyten freigesetzten Faktoren beeinflusst, wie bestimmten Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Williams et al. 2007). Die Ausreifung und Differenzierung der OPCs ist entscheidend für die Remyelinisierung, die wiederum von weiteren lokalen Faktoren abhängt. Ein wichtiger

Faktor scheint hier die Interaktion mit Astrozyten zu sein (Lohrberg et al. 2020). Zudem sind neonatale OPCs in der Lage, mit einer höheren Geschwindigkeit demyelinisierte Areale zu remyelinisieren als adulte OPCs (Blakemore 2008).

## **2.14 Rolle der Astrozyten**

Astrozyten nehmen im ZNS und gerade in Bezug auf die Remyelinisierung eine entscheidende Rolle ein. Im physiologischen Kontext kommunizieren Astrozyten mit anderen Gliazellen, mit Neuronen und untereinander (Stadelmann et al. 2019). Ihre Fortsätze haben Kontakt zu neuronalen Synapsen, den Ranvierschen Schnürringen und zur Blut-Hirn-Schranke (Winkler et al. 2021a). Sie tragen zudem zur Aufrechterhaltung der Ionenzusammensetzung des Extrazellulärraums bei. Eine weitere wichtige Funktion liegt in ihren Reparaturmechanismen und in der Bildung von Glianarben. Sie scheinen paradoxerweise auch zur Degeneration und Demyelinisierung beizutragen, indem sie Entzündungsprozesse fördern sowie die Funktion der Oligodendrozyten negativ beeinflussen (Williams et al. 2007). Auf der anderen Seite schaffen sie mithilfe der oligodendroglialen Vorläuferzellen die Voraussetzung für die Remyelinisierung. Weiterhin fördern sie die Ausdifferenzierung und Einwanderung der Oligodendrozyten in Herde, die remyelinisiert werden müssen (Williams et al. 2007).

## **2.15 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Remyelinisierungsprozesse bei der NMO zu untersuchen, die im Gegensatz zur MS noch nicht gut beschrieben und verstanden sind. Mittels immunhistochemischer Färbungen wird die Dichte der Astrozyten, der Schwannzellen, der Oligodendrozyten und der Axone in remyelinisierten und nicht-remyelinisierten NMO-Arealen untersucht mit dem Ziel, die Rolle der genannten Strukturen und deren Zusammenspiel beim Remyelinisierungsprozess zu eruieren. Außerdem wird das Ausmaß der Schwannzell-Remyelinisierung bestimmt und zum Läsionsstadium und zur Krankheitsdauer in Bezug gesetzt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patientinnen und Patienten

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde autoptisch gewonnenes Gewebe von acht NMO-Patientinnen und Patienten untersucht. Bei allen Fällen handelte es sich um Paraffinblöcke überwiegend aus dem Bereich des Rückenmarks. Die Patientinnen und Patienten hatten deutsche, afro-amerikanische und kanadische Wurzeln. Das Durchschnittsalter der Patientinnen und Patienten lag bei 53,75 Jahren. Wie bereits in internationalen Studien beschrieben, ist das Auftreten der NMO beim weiblichen Geschlecht mit einem Verhältnis von  $> 3:1$  überrepräsentiert (Wingerchuk 2009). In unserer Kohorte belief sich das Verhältnis der Geschlechterverteilung auf 7:1 (w:m).

Zum Krankheitsverlauf ist anzumerken, dass vier Patientinnen und Patienten unter einem schubförmigen und zwei Patientinnen und Patienten unter einem schubförmig-progredienten Verlauf litten. Zum Verlauf der Erkrankung der restlichen zwei Patientinnen und Patienten lagen keine Informationen vor. Wie Tabelle 5 zu entnehmen ist, lagen bei drei Patientinnen und Patienten im Serum AQP-4-Ak vor; bei den verbleibenden fünf Patientinnen und Patienten war der AQP-4-Serumstatus nicht bekannt. Die Krankheitsdauer belief sich bei den hier untersuchten Patientinnen und Patienten auf wenige Monate bis wenige Jahre (Min. = 4 Monate, Max. = 24 Monate). Eine Ausnahme stellt eine Patientin dar, die 24 Jahre lang erkrankt war. Schwere Schübe der Erkrankung, die beispielsweise mit einer Hirnstammbeteiligung einhergingen, hatten für zwei Patientinnen und Patienten den Tod zur Folge. Zwei der Patientinnen verstarben aufgrund von kardiovaskulären Ereignissen, wohingegen eine Patientin an den Folgen eines Hirnödems verstarb. Bei den Komorbiditäten der Patientinnen fiel die arterielle Hypertonie auf, die bei zwei Patientinnen auftrat. Die unten abgebildete Tabelle 5 fasst die wichtigsten klinischen Informationen zu den hier untersuchten NMO-Patientinnen und -Patienten zusammen.

Tabelle 5: Patientendaten der untersuchten NMO-Fälle

Patientinnen und Patienten	A 106/09	A 158/11	A 206/04	SN 51/96	AN 05/99	M 43/80	L 66/62	A 99/11
Verlauf	schubförmig	schubförmig	schubförmig	n. b.	schubförmig-progredient	schubförmig	schubförmig-progredient	n. b.
Symptome	erhebliche Visuseinschränkung, sensible Querschnittssyndromatik	bds. Optikusatrophy, inkomplettes Querschnittssyndrom	Optikusneuritis, sensibles Querschnittssyndrom	n. b.	Optikusneuritis bds.; inkomplettes Querschnittssyndrom	Neuritis nervi optici, Paralyse der unteren Extremitäten	Optikusneuritis, Tetraparalyse	n. b.
Krankheitsdauer	24 Jahre	3 Jahre	1,5 Jahre	n. b.	n. b.	4 Monate	5 Monate	9 Monate
Herkunft	Deutschland	Deutschland	Deutschland	Deutschland	Afroamerikanisch	Kanada	Kanada	Deutschland
Geschlecht	weiblich	weiblich	weiblich	weiblich	weiblich	weiblich	weiblich	männlich
Alter	77	60	44	43	16	49	69	72
AQP-4-Serum-AK	ja	ja	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	ja

Legende: n. b. = nicht bekannt

### 3.2 Gewebe

Die untersuchten Präparate entstammen dem Archiv des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen. Insgesamt wurde mit 29 Paraffinblöcken aus dem Rückenmarksgewebe von acht Patientinnen und Patienten mit NMO gearbeitet. Alle hier beschriebenen neuropathologischen Studien wurden gemäß den nationalen ethischen Richtlinien bezüglich des Gebrauchs von archiviertem Post-Mortem-Gewebe durchgeführt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (19-9-10).

### 3.3 Histologische Färbungen

Die autopsisch gewonnenen Gewebeproben wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit einem Mikrotom 2-3 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl histologische Standardfärbungen in der Neuropathologie wie die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE), LFB/PAS-Färbung (Luxol fast blue/Perjodsäure-Schiff) und Bielschowsky-Versilberung als auch immunhistochemische Färbungen durchgeführt, eine Vorgehensweise, die im Folgenden detaillierter beleuchtet wird.

Die HE-Färbung dient als Standardfärbung dazu, sich einen Überblick über das Präparat zu verschaffen. Das Gewebe wird insbesondere auf eine Infiltration von Entzündungszellen hin untersucht. Hämatoxylin ist für die blaue Färbung der Zellkerne verantwortlich, welche auf einer Bindung an die sauren oder basophilen Zellkernbestandteile basiert. Eosin wiederum färbt extra- und intrazelluläre Proteine, die basisch oder azidophil sind, rot. Die HE-Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die Schnitte wurden dreimal mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen, für 8 Minuten in Mayers Hämalunlösung inkubiert und danach kurz ausgewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für ca. eine Minute in 0,1 %ige HCl-Alkohollösung getunkt und für 10 Minuten unter laufendes Leitungswasser gehalten, bis die Blaufärbung zu sehen war. Anschließend wurden die Schnitte für 6 Minuten in 1 %ige Eosinlösung gestellt, mit H<sub>2</sub>O ausgewaschen, dehydriert und in einem wasserfreien Medium, d. i. *DePex mounting medium*, eingedeckelt.

Bei der LFB/PAS-Färbung werden Myelinscheiden türkisblau und die Zellkerne blauviolett gefärbt, was auf die LFB-Komponente der Färbung zurückzuführen ist. Die PAS-Komponente ist verantwortlich für die rote Färbung der nicht myelinisierten bzw. demyelinisierten Areale des Parenchyms, der grauen Substanz sowie der Polysaccharide.

Um den LFB-Teil der Färbung durchzuführen, müssen die Schnitte nach Abschmelzen des Paraffins im Wärmeschrank bei 58 °C für 30 Minuten durch vier aufeinanderfolgende Bäder in Xylol für jeweils drei Minuten entparaffiniert werden. Anschließend werden die Schnitte zuerst in 100 %igem und danach 90 %igem Isopropanol inkubiert. Danach werden die Schnitte über Nacht bei 60 °C in eine LFB-Lösung gestellt. Das überschüssige LFB wird als nächstes durch ein kurzes Eintauchen in 90 %igem Isopropanol entfernt. Danach wird das Myelin selektiv durch Bäder in Lösung aus 0,05 % Lithiumcarbonat und zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest.) sowie 70 %igem Isopropanol gefärbt. Abschließend wird die Färbung durch Tunken der Schnitte in destilliertes H<sub>2</sub>O gestoppt. Um die PAS-Reaktion zu beginnen, wurden die Schnitte 5 Minuten in 1 %ige Perjodsäurelösung gestellt und im Anschluss 5 Minuten unter laufendem Leitungswasser und 5 Minuten in destilliertem H<sub>2</sub>O ausgewaschen. Danach folgte die 20-minütige Inkubation in der Schiffschens Lösung, woraufhin wieder das Spülen unter laufendem Leitungswasser für 5 Minuten folgte. Anschließend wurden die Kerne gefärbt. Dafür wurden die Schnitte für 2 Minuten in eine Hämaunlösung gestellt und anschließend wieder kurz in H<sub>2</sub>O eingetaucht. Nachfolgend kam die Differenzierung in 1 %iger HCl-Alkohol-Lösung, wobei die Schnitte dreimal eingetaucht wurden. Die Schnitte wurden dann unter fließendem Leitungswasser 5 Minuten geblät. Als nächster Schritt folgte die Dehydrierung der Schnitte durch kurzes Eintauchen in 50 %, 70 %, 90 %- und 100 %iger Isopropanol- sowie 100 %iger Isopropanol/Xylol (1:1)-Lösung. Es folgte dann das dreimalige, jeweils 5-minütige Baden der Schnitte in Xylol. Zum Schluss wurden die Schnitte in DePex eingedeckelt.

Die Versilberung nach Bielschowsky dient zur Beurteilung der Morphologie der Axone und der Axondichte. Dabei färben sich die Axone schwarz und das restliche Gewebe färbt sich hellbraun.

Nach der Entparaffinierung und Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte 20 Minuten in eine 20 %ige Silbernitratlösung gelegt und anschließend mit Aqua bidest. gespült. Der zuvor verwendeten Silbernitrat-Lösung wurde, bis sich der entstandene Niederschlag klärte, tropfenweise 32 %iges Ammoniak hinzugefügt. Die Schnitte wurden daraufhin für 15 Minuten im Dunkeln in der zuvor hergestellten Silbernitrat-Ammoniak-Lösung inkubiert und anschließend in mit einigen Tropfen Ammoniak versetztem H<sub>2</sub>O gespült. Zur Silbernitrat-Ammoniak-Lösung wurden 10 Tropfen Entwicklerlösung zugegeben und die Schnitte in der Lösung belassen, bis sich die Nervenfasern schwarz und das Parenchym braun färbten. Die Objektträger wurden erneut

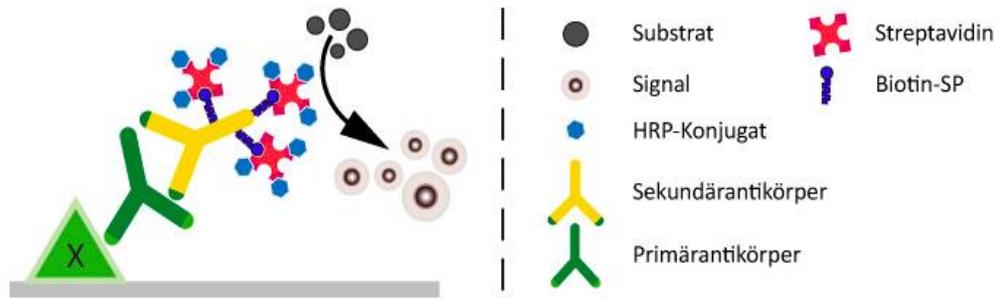
mit Aqua bidest. gespült sowie für 2 Minuten in 2 %iger Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Abschließend erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, wobei die verwendeten Objektträger zuvor mit Leitungswasser abgespült wurden.

### 3.4 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, mit dem man molekulare Strukturen eines Gewebes nach dem Prinzip der Ag-Ak-Reaktion und mithilfe eines Farbstoffes, der diese Bindung sichtbar macht, darstellen kann.

Prinzipiell bestehen Ak aus einem fragmentkristallisierbarem (Fc) und aus zwei Ag-bindenden (Fab) Fragmenten, die man mithilfe von Papain enzymatisch spalten kann. Die Fab-Regionen sind im Stande, an Fc-Teile anderer Ak zu binden. Es lässt sich zudem eine Signalverstärkung hervorrufen, indem mehrfach verschiedene Ak jeweils aneinander binden. Weiterhin lassen sich Ak anhand ihrer Isotypen unterscheiden. Es gibt monomere Ak wie IgE und IgG und polymere Ak wie IgA und IgM. Die hier eingesetzten Ak wurden in Mäusen, Ratten oder Kaninchen gegen spezifische Ag generiert. Das Prinzip der einzelnen immunhistochemischen Färbungen wird im nachfolgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

Der applizierte Primär-Ak (z. B. anti-Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG)) bindet mit seiner Fab-Domäne spezifisch an das Ag, d.i. MAG. An die Fc-Domäne des Primär-Aks bindet ein zweiter spezifischer Sekundär-Ak, an dessen Fc-Domäne kovalent Biotin gekoppelt ist, das eine prosthetische Gruppe vieler Enzyme darstellt (auch Vitamin H genannt). Biotin besitzt eine starke Affinität zum basischen Hühnereiweiß Avidin. Folglich binden die hinzugefügten Avidin-Peroxidase-Komplexe an die biotinylierten Sekundär-Ak. Der Elektronendonator Diaminobenzidin (DAB) oxidiert nach Zugabe von  $H_2O_2$  genau dort, wo der Primär-Ak an das spezifische Ag im Gewebe gebunden hat. Das oxidierte DAB präzipitiert, was zu einem braunen Niederschlag führt und so das zu detektierende Molekül sichtbar macht. Dieses Signal wird zum einen dadurch verstärkt, dass mehrere Sekundär-Ak an einen Primär-Ak binden können, zum anderen dadurch, dass ein Biotin-Molekül vier Avidin-Moleküle binden kann. Um die Bindungen, die mit der Methode Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) detektiert wurden, zu visualisieren, wurden als Chromogene *Fast Red* und *Fast Blue* verwendet. In der Abbildung 3 sind die oben beschriebenen Schritte anhand des Avidin-Biotin-Schemas nochmals dargelegt.



**Abbildung 3: Biotin-Avidin-Komplex**  
(aus Dianova FAQ o. D.)

**Lizenzangabe:** Mit freundlicher Genehmigung von Dianova.

**Legende:**

HRP-Konjugat = Streptavidin-Meerrettichperoxidase.

Biotin-SP= Biotin long spacer (6 Atome)

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um ein Ausbleichen der Chromogene bei Fluoreszenzfärbungen zu vermeiden, waren diese lichtundurchlässig. Auch bei immunhistochemischen Färbungen ist es notwendig, die Paraffinschnitte mithilfe von Xylol-Bädern zweimalig zu entparaffinieren und in Bädern absteigender Isopropanolkonzentration für jeweils 5 Minuten zu hydrieren. Für die Ag-Demaskierung wurden die Schnitte anschließend fünfmal für je 3 Minuten abwechselnd in Citratpuffer (10 mM, pH 6) und zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O einer Mikrowellenbehandlung bei 800 Watt ausgesetzt. Die Abkühlung erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte dreimal mit einer 10 %igen Phosphatpufferlösung (PBS) und destilliertem H<sub>2</sub>O gespült. Um die endogene Peroxidase, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzymatisch spaltet und somit zu falsch-positiven Signalen führen kann, vorab zu hemmen, wurden die Schnitte für 20 Minuten bei 4 °C in eine mit 3 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzte PBS gegeben. Danach wurden die Schnitte wieder dreimal in PBS gewaschen. Als Nächstes erfolgte die Hemmung unspezifischer Ak-Bindungen mittels 10 %igem fetalen Kälberserum (FCS) in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Für die Fluoreszenz-basierenden Mehrfachfärbungen wurde 1 %iges FCS in PBS verwendet. Anschließend wurden die Schnitte mit 10 %igem FCS für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer vorinkubiert, um unspezifische Ag-Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Dekantieren von FCS wurde der jeweilige Primär-Ak aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurde der biotinylierte Sekundär-Ak aufgetragen und in 10 %igem FCS in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder in PBS gespült und mit 0,1 %igem Peroxidase-konjugierten Avidin in 10 %igem FCS in PBS für weitere 60 Minuten in einer feuchten

Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Spülung mit PBS wurden die Präparate in einer DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung entwickelt, wobei DAB von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert wird und einen dunkelbraunen Farbumschlag annimmt. Die Reaktion wurde abschließend mit der PBS-Spülung beendet. Um die Zellkerne darzustellen, wurde eine Hämalaun-Gegenfärbung, wie bereits oben bei der HE-Färbung beschrieben, durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen mit Ak durchgeführt, die gegen verschiedene Myelinbestandteile (basisches Myelinprotein (MBP), MAG, Proteolipid-Protein (PLP), P0), Makrophagen/Mikroglia (Kim1-P, MRP-14), Astrozyten (GFAP, AQP-4), Axone (Neurofilament 200 (NF200), Amyloid-Vorläuferprotein (APP)) und reife Oligodendrozyten (NogoA, p25) gerichtet waren. In Tabelle 6 sind alle verwendeten Primär-Ak und in Tabelle 7 alle verwendeten Sekundär-Ak aufgelistet.

**Tabelle 6: Verwendete Primär-Ak**

Ak	Herkunftsspezies	Klon	Zielstruktur/Ag	Verdünnung	Hersteller
Anti-APP	Maus	22C11	Amyloid-Vorläuferprotein	1:3000	Chemicon International Inc.
Anti-AQP-4	Ratte	pc	Wasserkanal der Astrozytenfortsätze	1:200	Sigma-Aldrich Corp.
Anti-GFAP	Ratte	pc	Saures Gliafaserprotein	1:1000	Dako A/S
Anti-IgG	Maus	pc	IgG	1:4000	Dako A/S
Anti-Ki67	Maus	Mib-1	Proliferationsmarker	1:100	Dako A/S
Anti-CD68 Äquivalent	Maus	Ki-M1P	Makrophagen, aktivierte Mikroglia	1:5000	Prof. Radzun, Göttingen, Deutschland
Anti-MAG	Kaninchen	pc	Myelin-assoziiertes Glykoprotein	1:1000	Prof. Schaeren-Wiemers, Basel, Schweiz
Anti-MOG	Ratte	pc	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	1:1000	selbst hergestellt
Anti-MBP	Ratte	pc	basisches Myelinprotein	1:2000	Dako A/S
Anti-MRP14	Maus	S36.48	Rezent invadierte Makrophagen	1:500	Acris/Origene Technologies
Anti-NogoA	Maus	11C7	Oligodendrozyten	1:20000	Prof. M. Schwab, Zürich, Schweiz
Anti-P0	Ratte	pc	Peripheres Myelin	1:400	Abcam
Anti-P25	Ratte	pc	Oligodendrozyten	1:500	Prof. P. H. Jensen, Aarhus, Dänemark

Ak	Herkunftsspezies	Klon	Zielstruktur/Ag	Verdünnung	Hersteller
Anti-NF200	Maus	N52	Axone	1:1000	Sigma-Aldrich Corp.
Anti-PLP	Maus	P11pc	Proteolipid Protein (Myelin)	1:500	Universität Oxford, UK

Legende:

Chemicon International GmbH, Temecula, Kalifornien, USA  
 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA  
 Dako A/S, Glostrup, Dänemark

Acris/Origene Technologies, Rockville, Maryland, USA  
 Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

**Tabelle 7: Verwendete Sekundär-Ak**

Ak-Bezeichnung	Konjugat	Katalog-Nr.	Verdünnung	Hersteller
Tyramide Signal Amplification Kit	Alexa Fluor® 555	T 30955	1:100	Molecular Probes Inc.,
Schaf-anti-Maus-Ig	Biotin	RPN 1001	1:200	Amersham Pharmacia Biotec Europe GmbH
Schaf-anti-Maus-IgG	Peroxidase	NA931	1:5000	Amersham Biosciences
Ziege-anti-Maus-Ig	Alkalische Phosphatase	D0486	1:40	Dako A/S
ExtrAvidin®	Peroxidase	E2886	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie Corp.
Streptavidin	Cy™3	016-160-084	1:100	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	-	K3955	1:10000	Molecular Probes Inc.

Legende:

Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA  
 Amersham Pharmacia Biotec Europe GmbH, Freiburg i. Breisgau, Deutschland  
 Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

Dako A/S, Glostrup, Dänemark  
 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Pennsylvania, USA  
 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA

**3.4.1 MBP, MAG, PLP, PO**

Um zu beurteilen, wie sich die einzelnen Myelinbestandteile in den Läsionen verhalten, wurden die Gewebeschnitte mit spezifischen Ak gegen MBP, MAG, PLP und PO immunhistochemisch untersucht.

Das etwa 19,6 kD schwere MBP macht etwa 30 % des Proteinanteils der Myelinscheide aus und kommt sowohl im PNS als auch im ZNS vor (Kies 1982). In der vorliegenden Arbeit nutze ich die Entmarkung in der MBP-Immunhistochemie sowie das Vorhandensein von MBP-positiven Makrophagen für die Einteilung in die verschiedenen Läsionsstadien.

Ein weiterer Bestandteil der Myelinscheide ist das MAG – ein ca. 100 kD schweres Membranprotein, das sowohl von Oligodendrozyten als auch von Schwannzellen generiert wird. MAG ist unmittelbar adaxonal lokalisiert und wichtig für die Myelin-Axon-Interaktion. Das PLP ist ein Hauptbestandteil des Myelins im ZNS und wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung der Myelinscheide.

Das Glykoprotein PO fungiert als Hauptbestandteil des Myelins im PNS und ist dort für dessen Bildung und Aufrechterhaltung von Bedeutung.

### **3.4.2 Kim1P, MRP14**

Der Kim1P-Ak ist ein Panmakrophagenmarker, der für die Detektion von Makrophagen und aktivierten Mikroglia geeignet ist. MRP14 (*myeloid-related protein 14*; calgranulin B) zeigt rezent aus dem Blutstrom invadierte Monozyten an.

### **3.4.3 GFAP, NogoA**

Das GFAP ist ein 50 kDa schweres filamentöses intrazytoplasmatisches Protein, das ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts von Astrozyten ist (Rutka et al. 1997). Das neuritenwachstumshemmende Protein NogoA wird im ZNS hauptsächlich von reifen Oligodendrozyten und Neuronen exprimiert.

### **3.4.4 NF200, APP**

NF200 gehört zur Untergruppe der schweren Neurofilament Polypeptide (NF-H) und ist ein Hauptbestandteil des neuronalen Zytoskeletts. Mithilfe des Ak gegen das APP ist es möglich, frühe Schädigungen von Axonen im Sinne von Transportstörungen und axonaler Durchtrennung zu erfassen (Koo et al. 1990).

## **3.5 Fluoreszenzmikroskopie**

Um die Gewebsschnitte für die Fluoreszenzmikroskopie zu färben, wurden diese mit dem Primär-Ak bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Um die Ak für die Inkubation zu verdünnen, wurden diese in eine Lösung aus 0,1 %igem Tween 20 mit 2 %igem bovinen Serumalbumin (BSA) und 1 %igem FCS in PBS versetzt. Als Sekundär-Ak wurde entweder ein Ziege-anti-Maus-Ak, der mit dem Fluorochrom Cy3 (Carbocyanin 3) konjugiert war oder ein biotinylierter Schaf-anti-Maus-Ak verwendet. Um die Reaktion zu verstärken, wurde dieser Sekundär-Ak (hier Schaf-anti-Maus-Ak) sodann über Nacht mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert, die anschließend das Fluorochromkonjugat Tyramid Alexa 555 enzymatisch umsetzte. Beide Farbstoffe zeigten eine rote Fluoreszenz. Bei den hier

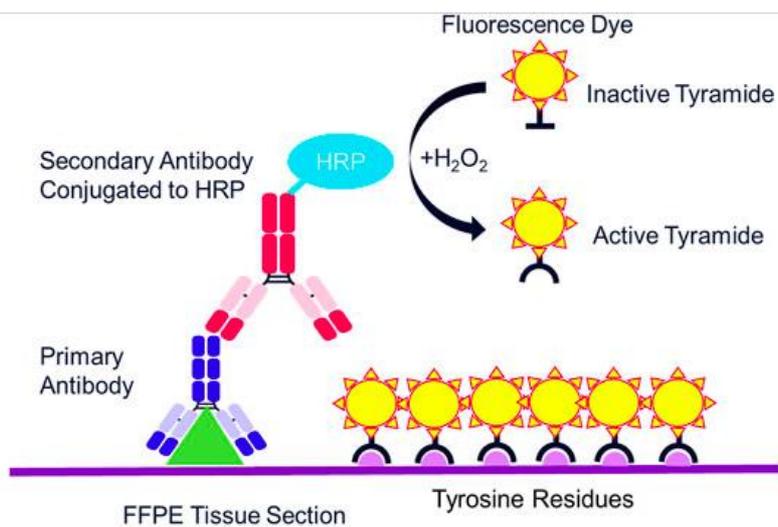
beschriebenen Färbungen wurde ein Tyramid Alexa 555-Chromogen benutzt (Verdünnung 1:100). Die Verdünnungen des biotinylierten Sekundär-Aks und der Avidin-Peroxidase entsprachen denen des lichtmikroskopischen Protokolls. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten mit dem Zellkernfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid; Verdünnung 1:10.000) gegengefärbt und mit dem Medium Fluoromount eingedeckelt.

Um die neurale Autofluoreszenz, die im Gewebe des humanen ZNS aufgrund der Lipofuszin-Ablagerung innerhalb der Neuronen, in Makrophagen, in Astrozyten und nach axonaler Durchtrennung vorkommt (Lee et al. 1988; Williams et al. 2001), zu minimieren, müssen die Gewebeschnitte weiter behandelt werden. So wurden die Gewebeschnitte, die mit Cy3 gefärbt waren, nach der Kernfärbung mit DAPI in eine Lösung mit Sudanschwarz B (SBB) und Kupfersulfat gegeben. Dafür wurden die Schnitte für 3 Minuten mit einer Lösung aus 0,5% SBB und 70 %igem Ethanol behandelt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal abwechselnd mit entionisiertem H<sub>2</sub>O und PBS gespült und anschließend für 20 Minuten mit der gepufferten 60 mM Kupfersulfatlösung behandelt. Die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen zur Maskierung der neuronalen Fluoreszenz reichten bei SBB von 0,00001 % bis zu 1 % in 70% Ethanol respektive bei Kupfersulfat von 1 µM bis zu 100 mM in 50 mM Ammoniumacetat-Pufferlösung von pH 5 (Romijn et al. 1999; Schnell et al. 1999; Modregger et al. 2002). Im Gegensatz dazu benötigten Schnitte, die mit Tyramid Alexa 555 als Fluorochrom gefärbt wurden, keine Blockierungen der neuronalen Autofluoreszenz. Ein Grund hierfür sind die deutlich niedrigeren benötigten Belichtungszeiten. Darüber hinaus scheint das Färbeprotokoll mittels Tyramid-Signalamplifikation die Autofluoreszenz grundsätzlich zu unterdrücken (Loup et al. 1998).

### **3.6 Lichtmikroskopische und Fluoreszenz-Doppelmarkierungen**

Das Ziel der Doppelmarkierungen war, die räumliche Beziehung zwischen jeweils zwei verschiedenen Zelltypen darzustellen. Die immunhistologischen Doppelfärbungen erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie die Einfachfärbungen. Der einzige Unterschied war die Verwendung zweier verschiedener Primär-Ak (Kombinationen: PO/GFAP; PO/NogoA; PO/NF200) basierend auf der indirekten Methode. Als Farbstoffe wurden entweder Chromogene eingesetzt, die nach enzymatischer Umsetzung lichtmikroskopisch (Fast Red oder DAB) oder fluoreszenzmikroskopisch anhand Tyramid Alexa 555 sichtbar waren oder respektive Fluoreszenzfarbstoffe (Cy2 und Cy3), die direkt mit dem Sekundär-Ak konjugiert waren. Im Prinzip wird bei der Tyramid-Amplifikations-Methode das Agvon einem Primär-

Ak erkannt und gebunden. Daraufhin folgt die Bindung des Ag-Primär-Ak-Komplexes mit einem HRP-gekoppelten Sekundär-Ak. Danach erfolgt die Umwandlung eines farbstoffmarkierten Tyramids in ein aktiviertes Tyramidderivat, das sehr kurzlebig ist und ein freies Radikal darstellt. Hierbei geht das freie Radikal rasch eine Verbindung mit dem HRP und eine kovalente Bindung mit der Seitenkette eines Proteins (vorzugsweise Tyrosin) ein. Die weiteren Schritte sind identisch mit den Vorgängen der Einfach-Fluoreszenzmarkierung. In der Abbildung 4 können die Schritte anhand einer graphischen Darstellung nachvollzogen werden.



**Abbildung 4: Schema der fluoreszenzbasierten Doppelmarkierung**  
(aus Hoyt 2021)

**Lizenzangabe:** Mit freundlicher Genehmigung von Clifford C. Hoyt.

**Legende:**

HRP = horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase). Tyrosine Residues = Tyrosinreste  
FFPE tissue section = formalin fixed, paraffin embedded (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes) Gewebe.

### 3.7 GFAP-P0 Fluoreszenz-Doppelfärbung

Im ersten Schritt ist auch hier die Entparaffinierung nach dem oben beschriebenen Schema notwendig. Hiernach erfolgte die Ag-Demaskierung durch Kochen in der Mikrowelle (800W) in Citratpuffer 10 mM, pH 6, fünfmal für 3 Minuten. Im Wechsel wurde mit Puffer oder Aqua bidest. aufgefüllt. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten abgekühlt, anschließend dreimal mit destilliertem H<sub>2</sub>O gespült und in PBS gestellt. Nach der Vorinkubation der Schnitte mit 100 µl 10 %igem FCS in einer feuchten Kammer wurde der Primär-Ak (in diesem Fall GFAP mk 1:300) auf den Schnitt gegeben und in der feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Schnitte wie weiter oben beschrieben mit dem spezifischen Cy3 (= rot)-gekoppelten Sekundär-Ak (anti-Maus) inkubiert. Danach folgte die Inkubation mit dem zweiten Primär-Ak (in diesem Fall P0, pk

Kaninchen, 1:200). Anschließend wurden die Schnitte mit dem spezifischen Alexa 488 (= grün)-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Ak für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt folgte die Gegenfärbung der Schnitte mit DAPI, woraufhin diese in *fluorescent mounting medium* eingedeckelt wurden.

### 3.8 Mikroskopie

Für die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte wurde ein Mikroskop vom Typ BX-51 (OLYMPUS Deutschland GmbH, Hamburg) verwendet, das Objektive mit 2-, 4-, 10-, 40-, und 100-facher Vergrößerung besitzt und für die Beurteilung sowohl von licht- als auch fluoreszenzoptisch gefärbten Präparaten geeignet ist. Die Okularvergrößerung war 10x. Zur Auszählung von Zellen diente ein separat einsetzbares Okular mit einem integrierten Zählgitter (OLYMPUS Deutschland GmbH, Hamburg). Axone wurden mit einem Okular mit integriertem Axonzählgitter ausgezählt (OLYMPUS Deutschland GmbH, Hamburg). Zudem wurden Fotoaufnahmen mittels einer 12,5-Megapixel CCD-Kamera vom Typ DP71 (OLYMPUS Deutschland GmbH, Hamburg) und mit der Software *analySIS* und *cell\** (Soft Imaging System GmbH, Münster) gemacht. Anschließend wurden die Aufnahmen mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., Mountain View, Kalifornien, USA) bearbeitet.

### 3.9 Morphometrie und Statistik

#### 3.9.1 Auswahl der Läsionen

Bei der Untersuchung auf NMO-Läsionen wurde zunächst der jeweilige Objektträger mit dem Rückenmarksquerschnitt in der LFB/PAS-Färbung oder der GFAP-Immunhistochemie makroskopisch betrachtet. Häufig konnte das Vorhandensein der Läsionen unmittelbar erkannt werden. Danach erhielt man mithilfe des 4x-Objektivs des Lichtmikroskops in der HE- und LFB-PAS-Färbung einen Überblick über das Gewebe (40x Vergrößerung). Ich versuchte dabei zuerst festzustellen, ob die physiologischen Strukturen des Rückenmarksquerschnittes noch zu erkennen waren. Als Orientierungshilfen dienten dabei die sog. Schmetterlingsform der grauen Substanz, der *Sulcus medianus*, die *Fissura mediana anterior* und die Motoneurone des Vorderhorns. Läsionen waren in der Regel durch einen Verlust an Myelin (LFB/PAS) bzw. Astrozyten (GFAP) identifizierbar.

Jede Läsion wurde auf dem Objektträger nummeriert. Je nach Sichtbarkeit der Läsionen geschah die Markierung makroskopisch oder mikroskopisch. Dabei erhielten nur diejenigen Läsionen in einem Rückenmarksquerschnitt eine Nummer, die sich vom Läsionsstadium

unterschieden. Falls mehrere Rückenmarksquerschnitte auf einem Schnitt vorhanden waren, wurden diese mit „RM 1“, „RM 2“ usw. beschriftet. Die Läsionsnummern wurden fortgesetzt und nicht pro Rückenmarksquerschnitt von vorne begonnen. Anschließend suchte ich bei 100-facher Vergrößerung (10x Objektiv) die Läsionen erneut und inspizierte das Ausmaß der Läsion und die Zerstörung der Strukturen. Danach wurde eine bestimmte Läsion vergrößert (200x) und schaumzellige Makrophagen detektiert, die Dichte der Myelinisierung und der Axone analysiert sowie nach dem Vorhandensein von Lymphozyten geschaut. Folglich wurden die verschiedenen spezifischen Färbungen verwendet, um die gezielt markierten Strukturen zu beurteilen.

Mit der Kim1-P Färbung konnte eine Aussage über die Makrophagendichte getroffen werden. Auch schaumzellige Makrophagen konnten damit identifiziert werden, deren Dichte semiquantitativ bestimmt und mit +, ++ oder +++ gekennzeichnet wurde. Die Ergebnisse wurden tabellarisch festgehalten.

Ein weiterer wichtiger Marker für die Einteilung der Läsionen war die MRP14-Immunhistochemie, die rezente aus dem Blut eingewanderte Monozyten sowie auch Granulozyten darstellen kann. Damit konnte ein sehr frühes Läsionsstadium identifiziert werden. Für die Beurteilung der Axondichte wurde die Bielschowsky-Versilberung zur Hand genommen. Hierbei lag das Augenmerk darauf, ob die Axone physiologisch oder pathologisch aussahen. Gesunde Axone waren anhand ihrer runden bis kantigen, sehr dichten Profile zu erkennen. Die pathologisch veränderten, transportgestörten Axone stellten sich als rundliche, aufgetriebene Strukturen, sog. Sphäroide, dar. Die Dichte der intakten Axone wurden anschließend mit einem Okulargitternetz bestimmt und in Beziehung zur normal erscheinenden weißen Substanz gesetzt.

Die Beurteilung der Astrozytendichte und -morphologie wurde mithilfe der GFAP-Immunhistochemie vorgenommen. Hier wurde im ersten Schritt auf die Dichte in den Läsionen geachtet. Des Weiteren war die Morphologie der Astrozytenkerne und des Zytoplasmas von Interesse. Die physiologischen Astrozyten enthielten einen rund-ovalen Kern. Das Zytoplasma zeigte eine leichte bräunliche Anfärbung (DAB) und teilweise waren zudem die sternförmigen Ausläufer der Astrozyten zu erkennen. Geschädigte Astrozyten wiesen häufig einen kondensierten Kern auf. Vor allem in frühen Läsionsarealen zeigten sich auch stark zytoplasmatisch kondensierte und dunkelbraun markierte Astrozyten. Im Bereich der NMO-Läsionen konnte man eindrücklich die ausgeprägte Reduktion der Astrozytendichte beobachten.

Ein weiterer Fokus lag auf der Morphologie und Dichte der Oligodendrozyten. Dazu wurde die NogoA-Färbung genutzt. Die Oligodendrozytendichte wurde beurteilt, indem das gesamte Präparat zuerst durchmikroskopiert wurde. Danach zoomte man in die Läsionen, um zu begutachten, ob die meist nur noch wenigen Oligodendrozyten intakt aussahen. Intakte Oligodendrozyten zeichneten sich durch einen rundlichen Kern mit einem schmalen, immunhistochemisch bräunlich-gefärbten Zytoplasma-Saum aus. Pathologisch veränderte, insbesondere apoptotische Oligodendrozyten wiesen einen kondensierten Kern auf und zeigten ein stark kondensiertes Zytoplasma. Alternativ waren reaktive Oligodendrozyten mit lockerem aktivierten Zellkern zu erkennen.

Der Myelinbesatz in den Läsionen wurde mittels der LFB-Färbung und durch den immunhistochemischen Nachweis von MBP, PLP und MAG bestimmt. Der Nachweis von Makrophagen mit MPB- und PLP-positiven Myelindegradationsprodukten im Zytoplasma zeigte ein Läsionsstadium mit aktiver Myelinphagozytose an.

Die PO-Immunhistochemie ermöglichte den eindeutigen Nachweis von peripherem Myelin im ZNS und diente somit dem Nachweis Schwanzzell-remyelinierter Läsionsareale. Bereits in der LFB/PAS-Färbung waren die Schwanzzell-remyelinierten Areale zu erkennen. Diese Bereiche hoben sich durch lilafarbene (im Gegensatz zu türkis = zentrales Myelin) Myelinscheiden vom Rest der Rückenmarksbestandteile ab. Die Größe des Schwanzzell-remyelinierten Areals wurde semiquantitativ in +, ++ und +++ eingeteilt.

### **3.9.2 Stadieneinteilung der Läsionen**

Ich habe versucht, die NMO-Läsionen hinsichtlich des Zeitpunkts ihrer Entstehung einzuordnen. Dabei wurde auf bereits publizierte Erkenntnisse zur Stadieneinteilung von MS und NMO-Läsionen zurückgegriffen (Brück et al. 1995; Brück et al. 2012; Misu et al. 2013; Winkler et al. 2021b). Als ein Kriterium für stattgehabte phagozytische Aktivität galt das Vorhandensein von schaumzelligen Makrophagen. Das früheste Läsionsstadium war durch Invasion von MRP14-positiven Monozyten und Granulozyten und aktive Astrozytenphagozytose gekennzeichnet; etwas später im Zeitverlauf konnten MBP-positiv Makrophagen nachgewiesen werden (*active*). Analog zu Schirmer et al. (2011) waren früh inaktive (*early inactive*) Läsionen anhand des Vorhandenseins von schaumzelligen Makrophagen definiert, die weder MBP-positiven Inhalt hatten noch MRP14-positiv waren. Als spät inaktiv (*late inactive*) wurden diejenigen Läsionen bezeichnet, die kaum noch schaumzellige Makrophagen aufwiesen. Die Stadien wurden in aktiv und inaktiv zusammengefasst.

### 3.9.3 Morphometrie

Um eine Quantifizierung bestimmter Zelltypen in den markierten Läsionsarealen mit und ohne Schwanzzell-Remyelinisierung (SZR) vorzunehmen, wurde mit dem Okular Nikon CFWN (Minato, Präfektur Tokio, Japan), das ein integriertes Zellzählgitter 10x/20 besaß, gearbeitet. Dabei wurde zuerst das interessierende Areal in der P0-Färbung dargestellt. Daraufhin wurde auf dem für den zu untersuchenden Zellmarker gefärbten Serienschnitt (z. B. GFAP oder NogoA) genau diejenige Fläche markiert, die dem Areal in der P0-Färbung entsprach. Die Werte wurden als Zellen/mm<sup>2</sup> angegeben. Für die Bestimmung der relativen axonalen Dichte im SZR-Areal der Läsionen wurden die immunhistochemische NF200-Färbung, die Neurofilament anfärbt, und ein spezielles 25-Punkte-Zählgitter der Firma Zeiss® (Carl Zeiss Sports Optics GmbH, Wetzlar) verwendet. Das Zählgitter enthielt 25 Kreuzungspunkte, deren Schnittmenge mit den NF200-positiven axonalen Strukturen bestimmt wurde. Je nach Größe der Läsion wurden im Vorfeld die Anzahl der mikroskopischen Felder mit einer 1000x-Vergrößerung festgelegt und die axonale Dichte als Ratio der Schnittpunkte von NF200-positiven Axonen mit Markierungen des okulären Axonzählgitters und in Prozent der Kontrollen angegeben. Insbesondere in der NF200-Immunhistochemie waren die SZR-Areale sehr gut vom restlichen Gewebe abgrenzbar. Die Schwanzzell-remyelinisierten Axone zeigten aufgrund der stärkeren Neurofilamentkompaktierung lichtmikroskopisch kleinere Durchmesser und dunkler angefärbte Axonquerschnitte.

### 3.9.4 Statistische Darstellung der Ergebnisse

Die Werte der mikroskopischen Ergebnisse wurden in Excel-Tabellen (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) eingetragen. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mithilfe des Programms GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen bei ordinaler Skalierung erfolgte die Berechnung der Signifikanz durch den gepaarten t-Test, da jeweils zwei Läsionsareale desselben Patienten bzw. derselben Patientin miteinander verglichen wurden. Dabei wurden jeweils GFAP- und NogoA/p25-positive Zellen sowie Bielschowsky- bzw. NF200-positive Axone in SZR- und in nicht-SZR-Läsionsarealen verglichen. Für die Datenanalyse von Bielschowsky-/NF200-positiven Axonen wurde zusätzlich der nicht parametrische Wilcoxon-Test verwendet, da nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte. Um die Signifikanz der Dichte der NogoA-

/p25-positiven Oligodendrozyten in drei abhängigen Gruppen zu prüfen, wurde eine *one-way-ANOVA* (Varianzanalyse) mit *Turkey's multiple comparison*-Test durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der relativen Ausdehnung des SZR-Areals mittels des Korrelationskoeffizienten nach Pearson und der Rangkorrelation nach Spearman untersucht. Abschließend wurden Unterschiede im prozentualen Anteil der SZR in den verschiedenen Läsionsstadien mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Tests geprüft.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der untersuchten Läsionen

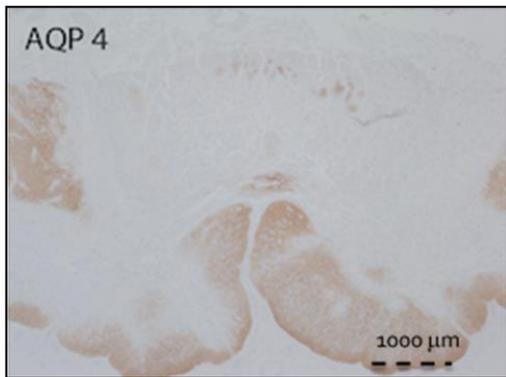
Untersucht wurden Rückenmarkpräparate von acht NMO-Patientinnen und -Patienten. Für jeden Fall standen mindestens ein Block und häufig sogar mehrere Gewebeblöcke zur Verfügung. Jeder Block enthielt ein oder mehrere Rückenmarkquerschnitte. Diese und die identifizierten Läsionen waren, wie oben beschrieben, markiert und durchnummeriert. Insgesamt ergaben sich so 14 Läsionen, die untersucht wurden. Auf einigen Blöcken waren die Läsionen bereits makroskopisch sichtbar. Die Abbildung 5 zeigt exemplarisch die makroskopisch sichtbare Läsion anhand der immunhistochemischen Färbung GFAP, die den Verlust an GFAP-positiven Astrozyten widerspiegelt.



**Abbildung 5: Gescannter Objektträger eines Rückenmarksquerschnitts einer NMO-Patientin**

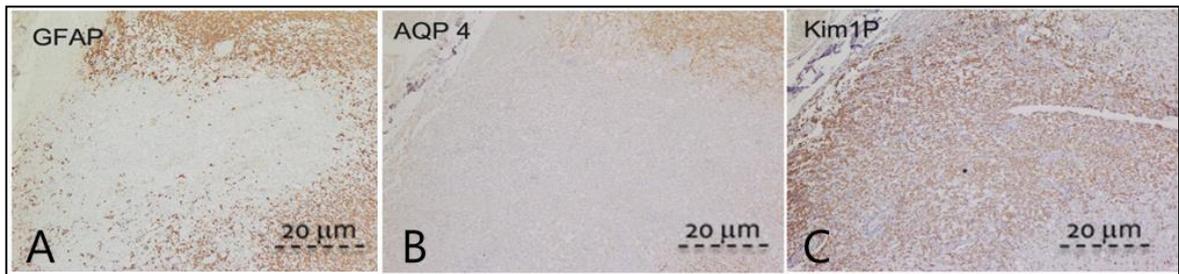
Bereits mit bloßem Auge sind in der GFAP-Immunhistochemie die Astrozyten-depletierten Läsionsareale zu erkennen.

Charakteristisch für NMO-Läsionen ist der Verlust an AQP-4-positiven Zellen, der in Abbildung 6 bereits in niedriger Vergrößerung beispielhaft nachvollzogen werden kann.



**Abbildung 6: Ausgedehnte Reduktion der AQP-4-Immunreaktivität in einer NMO-Läsion**

Diese Abbildung veranschaulicht den ausgeprägten Verlust an AQP-4-pos. Zellen in einer NMO-Läsion. 200-fache Vergr. Maßstab = 1000 µm.



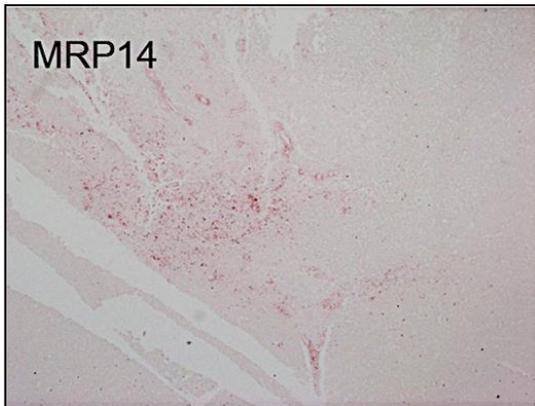
**Abbildung 7: Aspekte aktiver NMO-Läsionen**

(A): Ausgedehnter Verlust GFAP-positiver Zellen in einer aktiven NMO-Läsion, (B): Verlust an AQP-4-positiven Zellen, (C): Kim1P-positive Schaumzellen als Zeichen rezenter Phagozytose in der Akutphase. Auffallend ist, dass das Areal mit Verlust an AQP-4-Immunreaktivität (B) größer ist als der Verlust von GFAP-pos. Zellen. (A): 400-fache Vergr. Maßstab = 20 µm.

Mikroskopisch wurden die Läsionen in die zwei Stadien aktiv und inaktiv eingeteilt. Dabei waren innerhalb einer Patientin bzw. eines Patienten sowohl Läsionen gleichen als auch unterschiedlichen Alters zu beobachten. Einige der Fälle enthielten jedoch entweder nur aktive oder inaktive Läsionen. Insgesamt waren fünf aktive und neun inaktive Läsionen zu vermerken. Die aktiven Läsionen zeichneten sich u. a. durch eine erhöhte Dichte an Kim1P-positiven Schaumzellen aus, die in Abbildung 7 verdeutlicht wird.

Ergänzend ist in derselben Abbildung der Verlust von AQP-4- und GFAP-positiven Astrozyten ersichtlich. Wie in Abbildung 8 dargestellt, lassen sich darüber hinaus anhand der MRP14-Färbung rezente aus dem Blut invadierte Monozyten, Makrophagen und Granulozyten nachweisen, die ebenfalls als Zeichen eines akuten Entzündungsprozesses gelten. Passend hierzu enthalten einige schaumzellige Makrophagen GFAP-positives Material bzw. Myelinbestandteile wie MAG oder PLP als Zeichen der aktiven Phagozytose von Astrozyten und Myelin. Darüber hinaus zeigten diese Läsionsareale einen deutlichen Oligodendrozytenverlust, was in der Reduktion NogoA-positiver Zellen reflektiert wurde. Eine akute axonale Schädigung war in einigen dieser Läsionen durch die immunhistochemische APP-Färbung erkennbar. Verglichen mit der ausgeprägten

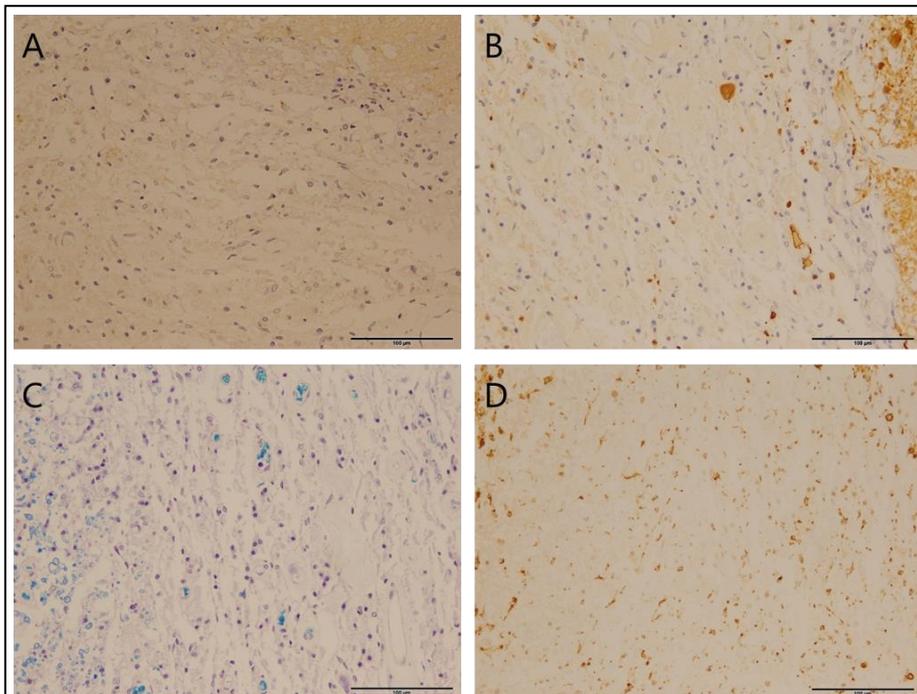
Schädigung der Astrozyten und Oligodendrozyten fiel das Ausmaß der axonalen Schädigung jedoch vergleichsweise gering aus. In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse quantifiziert.



**Abbildung 8: Aktive NMO-Läsion**

MRP14-positive Makrophagen und Granulozyten als Zeichen der akuten Inflammation, 400-fache Vergr.; Maßstab = 500 µm.

Die inaktiven Läsionen kennzeichneten sich durch ein nahezu völliges Fehlen von schaumzelligen Makrophagen, nachgewiesen durch Kim1-P-/und MRP14-Immunhistochemie, wie in Abbildung 9 D dargestellt. In Abbildung 9 A ist das vollständige Fehlen von AQP-4-positiven Astrozyten erkennbar. Weiterhin ist in der LFB/PAS-Färbung in der Abbildung 9 C der Verlust an oligodendrogialen Myelinscheiden im Läsionsareal verdeutlicht.



**Abbildung 9: Inaktive NMO-Läsion**

Dargestellt ist eine inaktive NMO-Läsion. Auffallend ist passend hierzu die geringe Dichte an Kim-1P-positiven Zellen (D). Die Läsion zeichnet sich zudem durch den Verlust an AQP-4-positiven Zellen (A) aus. In (B) ist eine allenfalls geringgradige Repopulation mit

GFAP-positiven Astrozyten in den peripheren Arealen der Läsion zu erkennen, wohingegen die Repopulation mit Oligodendrozyten, wie in der LFB/PAS-Färbung gezeigt, ausbleibt (C). 200-fache Vergr.; Maßstab = 100 µm.

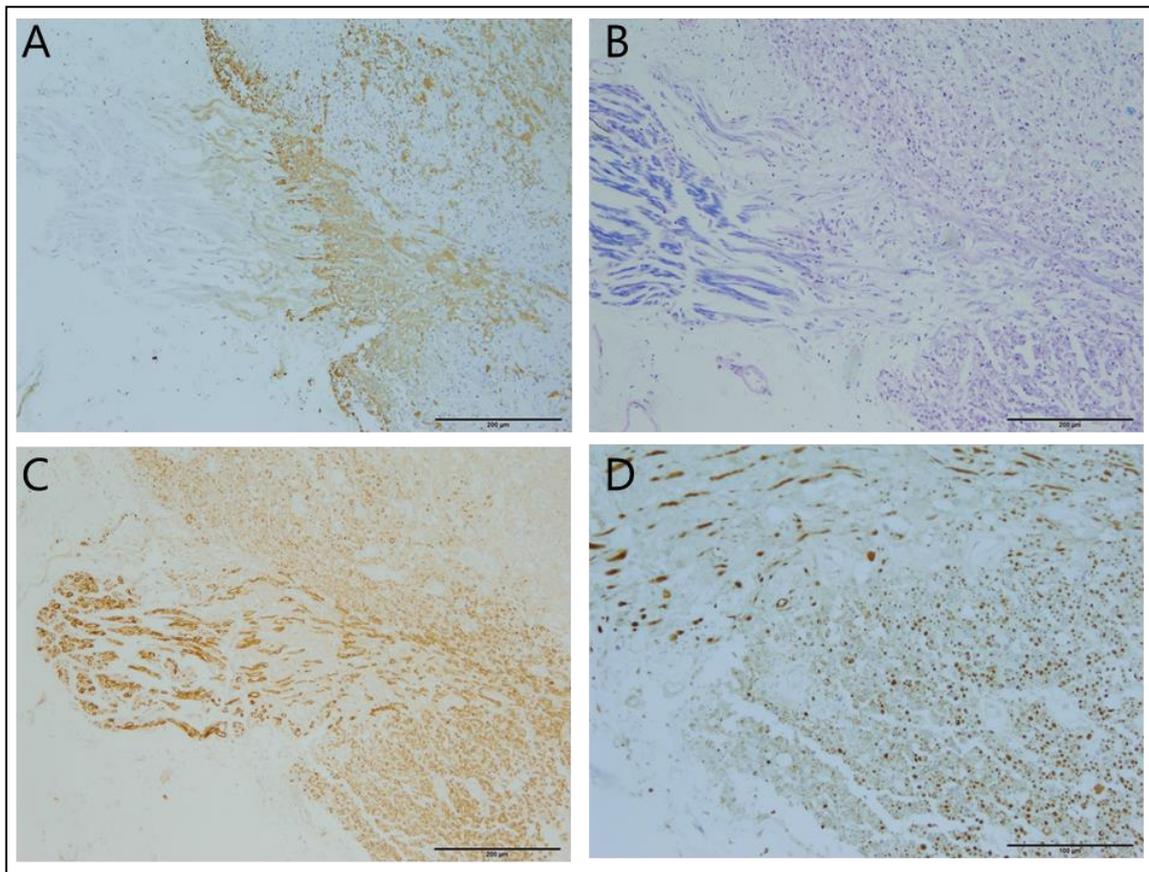
Auffallend in den inaktiven Läsionen waren zudem die repopulierten GFAP-positiven Zellen neben Arealen, in denen ein deutlicher Astrozytenverlust zu sehen war. Ein Beispiel hierfür zeigt die Abbildung 9 B, bei der zentral im Bild der Verlust und rechts lateral im Bild eine beginnende Repopulation mit Astrozyten erkennbar ist. Dagegen waren kaum NogoA-positive Zellen zu beobachten. Die Variabilität hinsichtlich der Axondichte war je nach Läsion beträchtlich, d.h. es fanden sich sowohl Läsionen mit hoher als auch mit geringer Axondichte.

Unabhängig vom Läsionsstadium waren Schwanzzell-remyelinierte Areale zu erkennen, die sich in der LFB/PAS-Färbung in Form von lilafarbenen – im Gegensatz zu türkisen – Myelinscheiden präsentierten.

#### **4.2 Schwanzzell-Remyelinisierung in NMO-Läsionen**

Mithilfe der immunhistochemischen P0-Färbung gelang es, ein zentrales Myelinprotein des PNS in den untersuchten Rückenmarkschnitten zu demonstrieren. Die P0-Färbung wurde demnach für die prozentuale Ausmessung des Schwanzzell-Areals bezogen auf die gesamte Läsion des betroffenen Rückenmarkabschnittes herangezogen. Insgesamt wurden 11 Schwanzzell-Areale begutachtet.

Dabei betrug der mittlere prozentuale Anteil der Schwanzzell-Remyelinisierung bezogen auf die Gesamtläsionen  $0,89 \pm 0,79\%$  (MW  $\pm$  SD). In einigen Läsionen war der Übergang von Spinalnerven in Schwanzzell-remyelinierte Läsionsareale im ZNS zu erkennen, wie in Abbildung 10 C gezeigt, was ggf. die Hypothese einer Migration der Schwanzzellen ausgehend von peripheren Nerven stützt. Abbildung 10 B zeigt die LFB/PAS-Färbung derselben Läsion, wobei auch hier die Schwanzzell-remyelinierten Areale in Form von dunkel-lila gefärbten Myelinscheiden erkennbar sind, die sich in demyelinierten (= nicht türkis gefärbten) Arealen befinden und von diesen gut abgrenzbar sind.



**Abbildung 10: Übergang Spinalnerv – Schwannzell-remyeliniertes Läsionsareal**

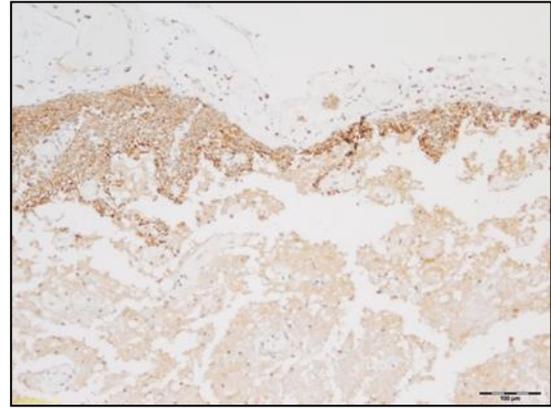
Die Abbildung zeigt den Übergang vom Spinalnerv in Schwannzell-remyelinierte Läsionsareale des ZNS. In der Immunhistochemie für GFAP (A) zeigt sich fehlende Reaktivität im Spinalnerv (links) und deutlich reduzierte Reaktivität im Bereich der NMO-Läsion (rechts). In der LFB/PAS-Färbung (B) stellen sich die Schwannzell-remyelinierten Areale in Form von dunkel-lila gefärbten Myelinscheiden – wie im Spinalnerv – dar. PO-positive Schwannzellen im PNS (Spinalnerv) und direkt angrenzend im ZNS in einer dicht Schwannzell-remyelinierten NMO-Läsion (C). (D) zeigt von Schwannzellen remyelinierte NF200-positive Axone. (A)-(C): 100-fache Vergr. Maßstab = 200 µm, (D): 200-fache Vergr. Maßstab = 100 µm.

Die größten Schwannzell-remyelinierten Areale fanden sich in der Peripherie der Rückenmarksquerschnitte, wie beispielsweise in Abbildung 12 anhand der PO-Immunhistochemie dargestellt. Subpial treten die Schwannzellen überwiegend in größeren Gruppen auf (Abbildung 12), doch es gibt vor allem zentral im Rückenmark durchaus auch Schwannzellen, die in kleinen Gruppen oder vereinzelt und diffus im Gewebe (Abbildung 11) auffindbar sind. Auch hier hilft die immunhistochemische PO-Färbung, um die wenigen isoliert auftretenden Schwannzellen darzustellen (vgl. Abbildung 11)



**Abbildung 11: Darstellung kleiner SZR-Areale in der P0-Färbung**

Auffallend ist hier die vor allem perivaskuläre Anordnung der P0-positiven Schwannzellen und remyelinierten Axone. 200-fache Vergr. Maßstab = 100 µm.

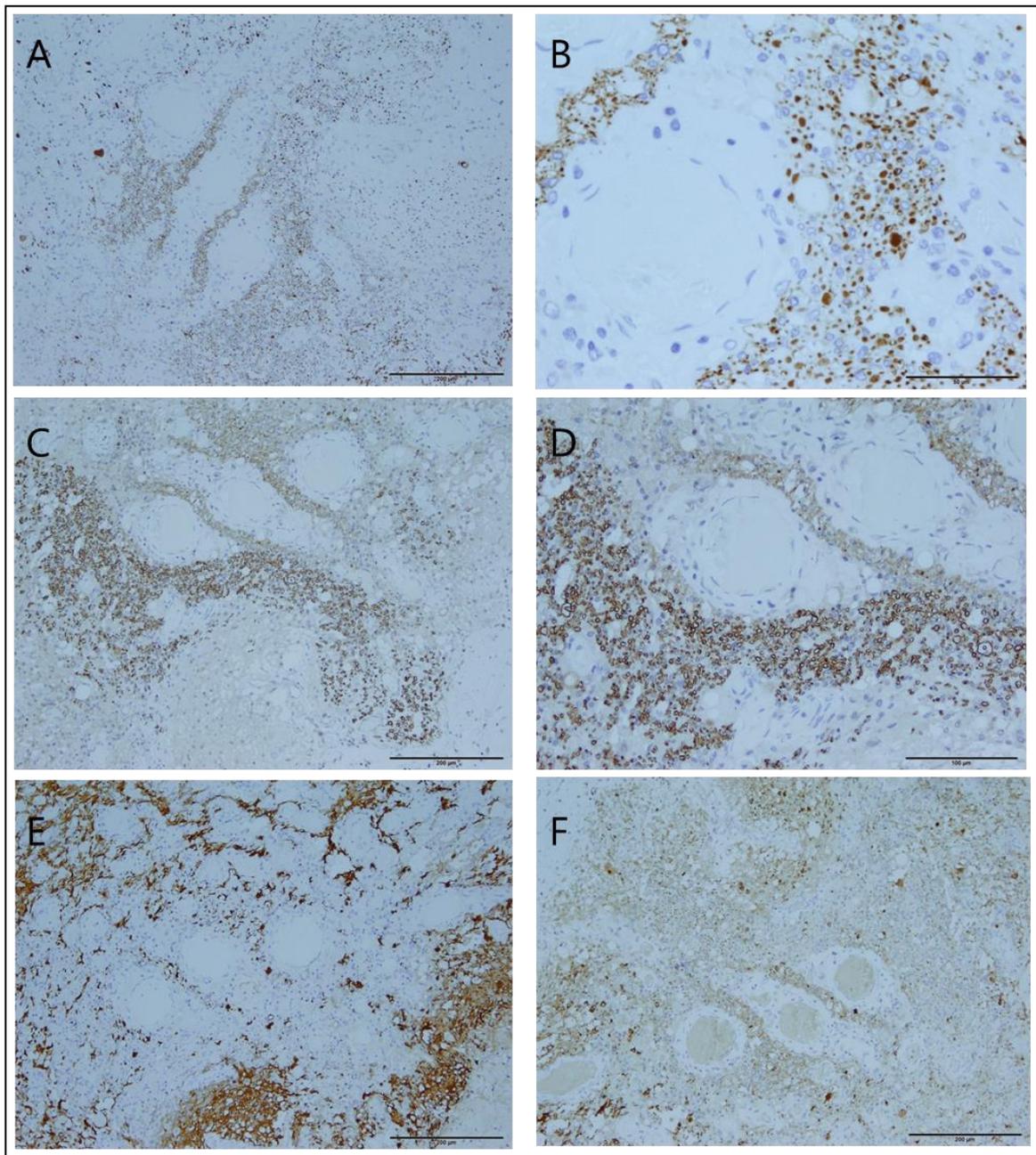


**Abbildung 12: Subpiale Ausdehnung von P0-positiven Zellen**

V. a. subpial zeigen sich dichte SZR-Läsionsareale. 100-fache Vergr. Maßstab = 100 µm.

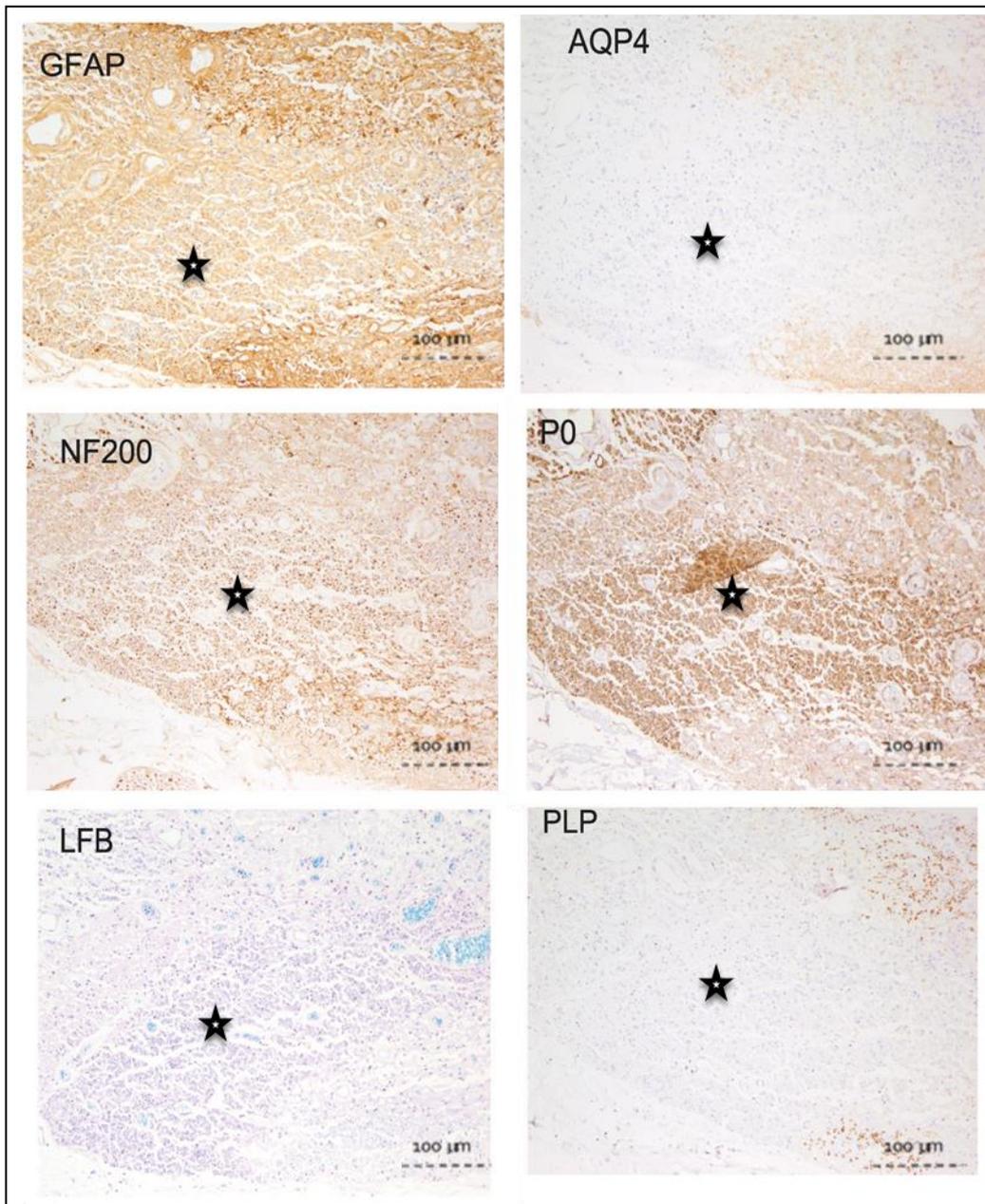
Weiterhin erstrecken sich Po-positive Schwannzell-remyelinisierte Areale in NMO-Läsionen gehäuft perivaskulär, ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 13 zu sehen. In den Abbildungen 13 A und B sind die durch Schwannzellen remyelinisierten NF200-positiven Axone derselben Region veranschaulicht. Die Abbildungen 13 B und 13 C zeigen die perivaskulär liegenden P0-positiven Schwannzellen. In Abbildung 13 E wird zudem die reaktive Gliose um das SZR-Areal ersichtlich. Im SZR-Areal selbst sind kaum GFAP-positive Zellen oder NogoA-positive Oligodendrozyten zu vermerken (vgl. Abbildung 13 F). Oligodendrozyten sind jedoch in der unmittelbaren Umgebung des SZR-Areals zu beobachten.

Die Dichte der SZR-Areale ist sehr variabel, sodass sowohl vereinzelt liegende als auch großflächig verteilte Schwannzellen (mit Sternchen markiert) vorzufinden sind. Abbildung 14 zeigt exemplarisch ein großflächiges P0-positives Areal in unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen (GFAP, AQP-4, NF200, P0, LFB, PLP). Der Verlust von AQP-4-positiven Zellen im SZR-Areal sowie von PLP, einem Myelinbestandteil des ZNS, geht insbesondere aus Abbildung 14 hervor.



**Abbildung 13: Perivaskulär betonte Schwanzzell-Remyelinisierung**

Ausgedehnte perivaskuläre und diffuse SZR-Areale bei einem Patienten mit einer Krankheitsdauer von 9 Monaten. In (A) und (B) sind die von Schwannzellen remyelinierten Axone sichtbar. (D) zeigt die Vergrößerung des SZR-Areals (C) in der P0-Immunhistochemie. Auffallend ist zudem die geringe Dichte an Astrozyten (E) und Oligodendrozyten (F) im SZR-Areal. (A): NF 200 (100-fache Vergr.), (B): NF 200 (400-fache Vergr.), (C): P0 (100-fache Vergr.), (D): P0 (200-fache Vergr.), (E): GFAP (100-fache Vergr.), (F): NogoA (10-fache Vergr.). (A), (C), (E), (F): Maßstab = 200 µm, (B): Maßstab = 100 µm, (D): Maßstab = 50 µm.



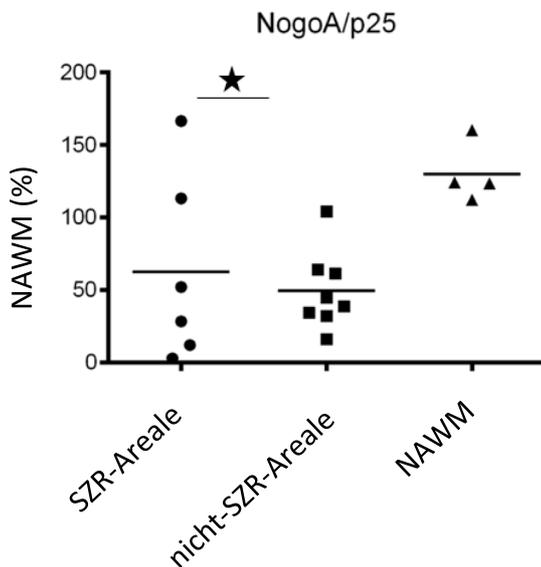
**Abbildung 14: Schwanzzell-remyeliniertes Areal in den unterschiedlichen Färbungen**

Aus dieser Abbildung geht insbesondere der Verlust an GFAP- und AQP-4-pos. Zellen sowie der Verlust des im ZNS befindlichen Myelinbestandteils PLP hervor. Dahingegen zeigt sich eine ausgeprägte, dichte Schwanzzell-Remyelinisierung in der LFB/PAS-Färbung und der P0-Immunhistochemie. In der NF200-Immunhistochemie zeigt sich die Neurofilament-Kompaktierung Schwanzzell-remyelinierter Axone. Das SZR-Areal ist mit Sternchen markiert. 100-fache Vergr. Maßstab = 100 µm.

### 4.3 Reduktion der Dichte an Oligodendrozyten in Schwanzzell-remyelinierten Arealen

Die Dichte der Oligodendrozyten in den SZR-Arealen, in nicht SZR-Arealen und in der normal-erscheinenden weißen Substanz (NAWM) wurde anhand der immunhistochemischen Färbungen für NogoA und p25 untersucht, die beide Markerproteine für reife Oligodendrozyten sind. Dabei wurden 17 Läsionen analysiert. Bis auf zwei Läsionen konnte die Dichte der Oligodendrozyten in den SZR-Arealen mit dem

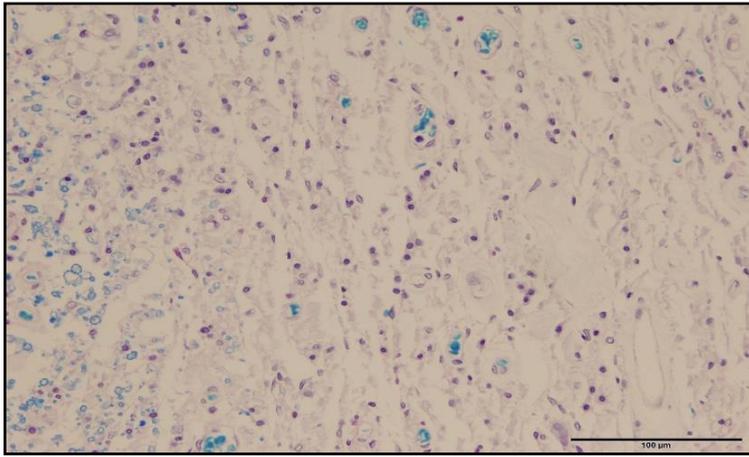
Okularzählgitter lichtmikroskopisch ermittelt werden. Der Mittelwert der NogoA- bzw. p25-positiven Zellen in den verbliebenen 14 untersuchten Läsionen belief sich in SZR-Arealen (n = 8) auf 62,4 +/- 64,3 Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD), im nicht-SZR-Areal (n = 6) auf 49,36 +/- 27,05 Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD) und in der NAWM (n = 4) auf 129,9 +/- 20,84 Zellen/mm<sup>2</sup> (MW +/- SD) (Diagramm 1). Es zeigte sich, dass die Dichte der Oligodendrozyten sowohl im SZR-Areal als auch im nicht-SZR-Areal gegenüber der NAWM deutlich reduziert ist. Mittels einer One-way ANOVA konnte sogar ein signifikanter Unterschied (p < 0,05) zwischen der Anzahl der Oligodendrozyten in nicht SZR-Arealen und der NAWM gezeigt werden. Die Variabilität der Oligodendrozytendichte ist in SZR-Arealen jedoch größer als in nicht-SZR-Arealen. Dennoch ist die Dichte an Oligodendrozyten im SZR-Areal nicht signifikant unterschiedlich von der in nicht-SZR-Arealen



**Diagramm 1: Dichte NogoA- und p25-positiver Zellen in SZR-Arealen und nicht SZR-Arealen verglichen zur NAWM**

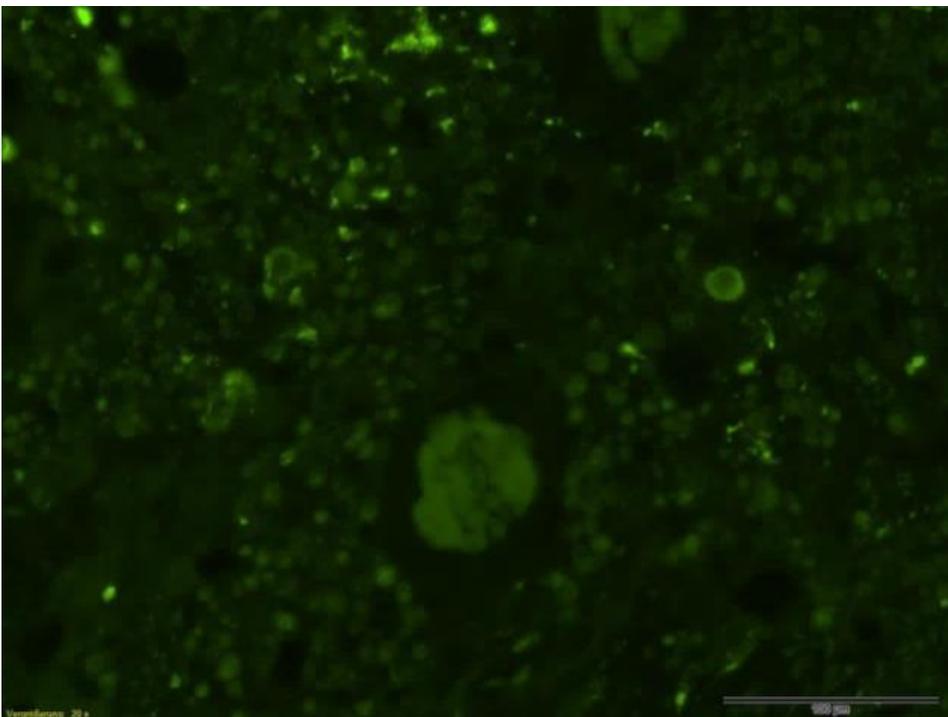
Graphische Darstellung der Dichte an NogoA- und p25-positiven reifen Oligodendrozyten in Schwanzzell-remyelinierten (SZR) und nicht Schwanzzell-remyelinierten Arealen im Vergleich zur NAWM. Es besteht ein signifikanter Unterschied (p < 0,05) zwischen der Dichte der Oligodendrozyten in nicht-SZR-Arealen (mit Sternchen markiert) gegenüber der NAWM. One-way ANOVA mit Turkey's multiple comparison-Test.

In Abbildung 15 ist das typische Bild des Oligodendrozyten- und Myelinverlusts in einer NMO-Läsion ohne wesentliche Schwanzzell-Remyelinisierung in der LFB/PAS-Färbung zu sehen. Im Zentrum des Bildes fällt die erhebliche Reduktion der blau gefärbten Myelinscheiden auf, die durch den oligodendrozytären Verlust hervorgerufen wird. In der immunhistochemischen Färbung mit dem NogoA-Ak fallen neben einer Reduktion reifer Oligodendrozyten auch axonale Sphäroide auf, da auch Neurone NogoA exprimieren und NogoA anterograd axonal transportiert wird.



**Abbildung 15: Verlust von Myelin im Läsionsareal in der LFB/PAS-Färbung**

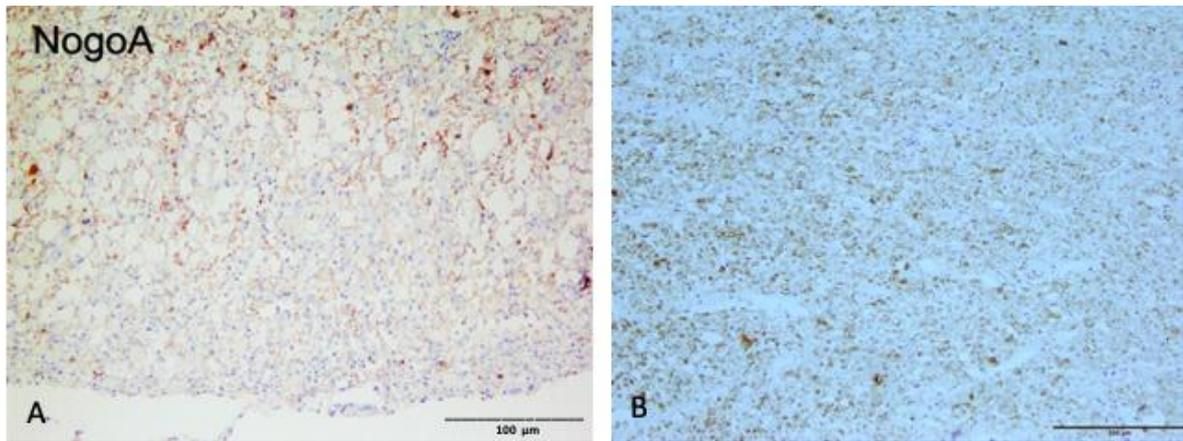
200-fache Vergr. Maßstab = 100 µm.



**Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung geschädigter Oligodendrozyten und transportgestörter Axone in einem NMO-Läsionsareal**

200-fache Vergr. Maßstab = 100 µm, Färbung: NogoA.

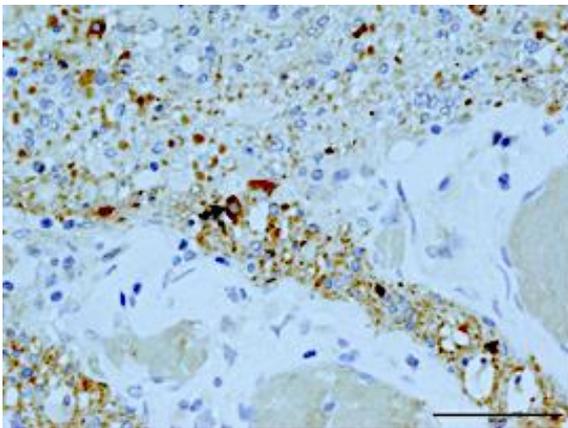
In der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung eines NMO-Läsionsareals in Abbildung 16 sind die pathologisch veränderten NogoA-positiven Oligodendrozyten sowie große axonale Sphäroide aufgezeigt.



**Abbildung 17: Oligodendrozytenreduktion in einem SZR-Areal im Vergleich zur NAWM**

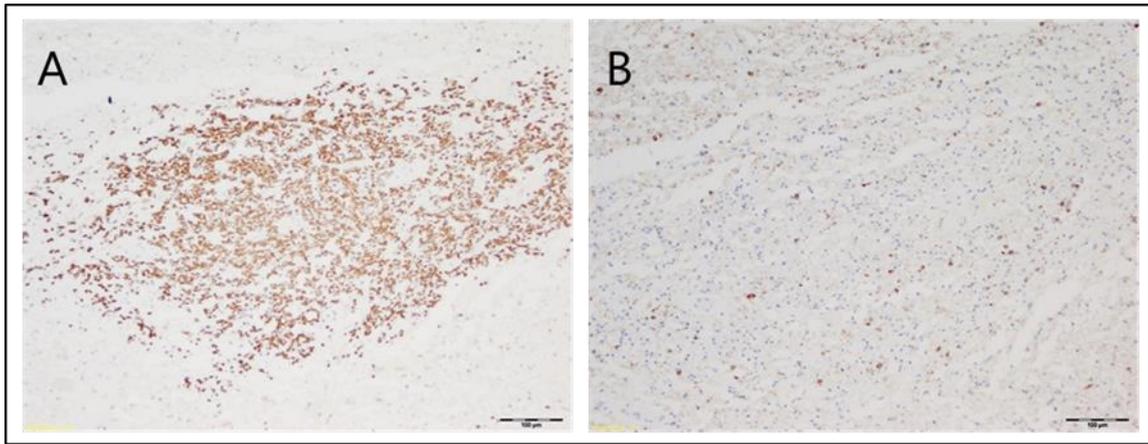
(A): Reduktion der Dichte von Oligodendrozyten in einem SZR-Areal, (B): intakte Oligodendrozyten in der NAWM  
100-fache Vergr. Maßstab = 100 µm, (A)-(B): NogoA.

Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die nur wenigen nachweisbaren Oligodendrozyten in Schwanzzell-remyelinierten Arealen. Hierbei sieht man in Abbildung 19 A ein SZR-Areal mit P0-positiven Zellen. Abbildung 19 B zeigt einen Serienschchnitt derselben Läsion, wobei hier die immunhistochemische NogoA-Färbung herangezogen wurde. Es fällt auf, dass die P0-positiven Areale nicht mit den NogoA-positiven Arealen korrespondieren. Es sind lediglich einzelne NogoA-positive Oligodendrozyten im SZR-Areal zu finden. In einigen SZR-Arealen sind keine Oligodendrozyten nachzuweisen.



**Abbildung 18: Vereinzelt vorliegende NogoA-positive Zelle in einem SZR-Areal**

Der Pfeil weist auf einen NogoA-positiven Oligodendrozyten in einem Schwanzzell-remyelinierten Areal. 400-fache Vergr.  
Maßstab = 50 µm

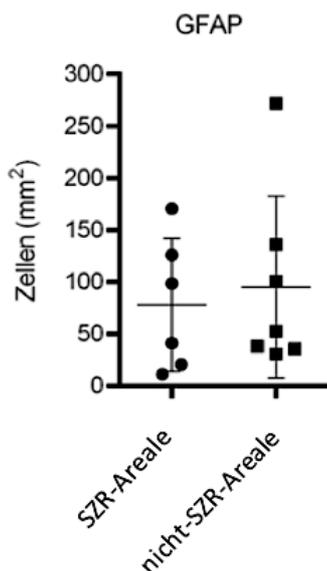


**Abbildung 19: Vergleich der P0- und NogoA-positiven Zellen in einem Schwanzzell-remyelinierten Areal**

In dieser Abbildung fällt die hohe Dichte an P0-positiven Schwanzzellen im SZR-Areal (A) gegenüber der niedrigen Dichte an NogoA-pos. Oligodendrozyten (B) ins Auge. (A) = P0-Immunhistochemie, (B) = NogoA - 100-fache Vergr. Maßstab = 100 µm.

#### 4.4 Astrozytendichte in SZR-Arealen

In 13 verschiedenen Läsionen mit und ohne SZR wurde mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung gegen GFAP die Dichte der Astrozyten in den jeweiligen SZR- und nicht-SZR-Arealen ermittelt. Der Mittelwert der GFAP-positiven Astrozyten in den SZR-Arealen betrug  $77,8 \pm 63,9$  Zellen/mm<sup>2</sup> (MW  $\pm$  SD). In nicht-SZR-Arealen betrug der Mittelwert der GFAP-positiven Zellen  $95,0 \pm 87,3$  Zellen/mm<sup>2</sup> (MW  $\pm$  SD). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (gepaarter t-Test;  $p = 0,744$ ). Die Dichte der Astrozyten in SZR- und nicht SZR-Arealen wird im Diagramm 2 veranschaulicht. Dabei handelt es sich um Daten von aktiven und inaktiven Läsionen.

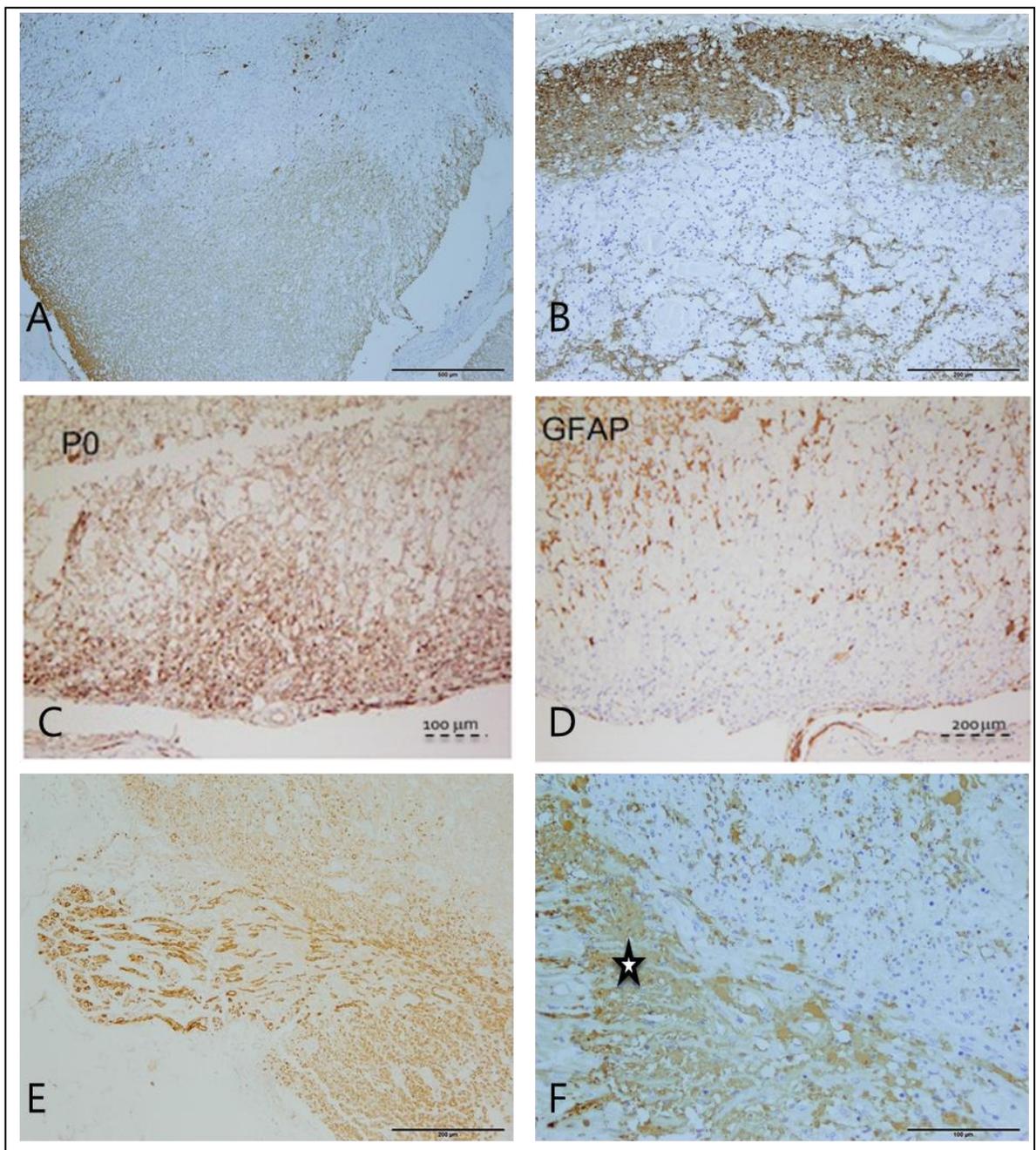


**Diagramm 2: Dichte GFAP-positiver Zellen in SZR-Arealen**

Das Diagramm veranschaulicht die Dichten GFAP-positiver Zellen innerhalb von SZR- und nicht-SZR-Arealen. Dabei fällt auf, dass sich die beiden Gruppen nicht signifikant unterscheiden ( $p = 0,744$ ; gepaarter t-Test).

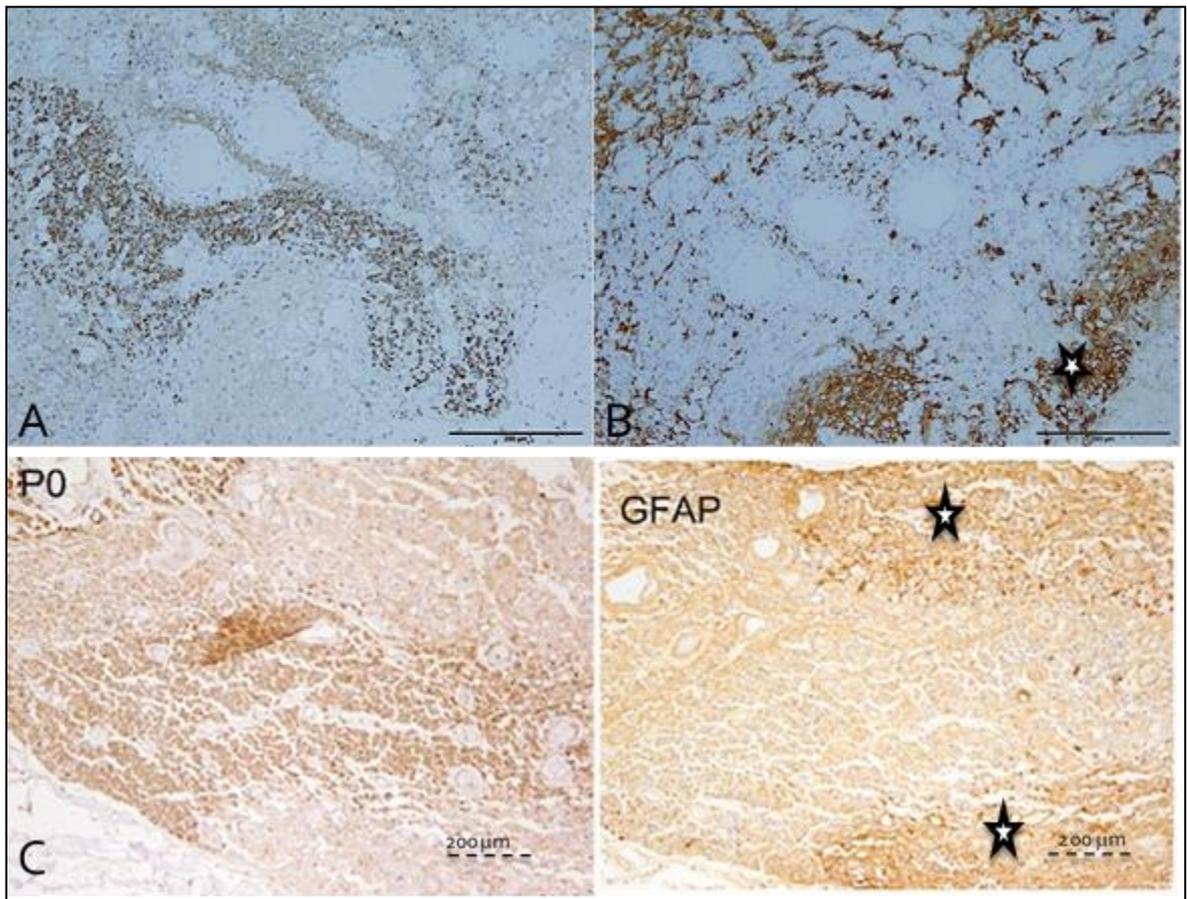
Um einen Eindruck von der Astrozytendichte zu bekommen, sind in den Abbildungen 20 A und B zwei NMO-Läsionen unterschiedlicher Patienten dargestellt, die keine SZR aufweisen. Abbildung 20 C zeigt ein SZR-Läsionsareal in der immunhistochemischen PO-Färbung. Korrespondierend hierzu ist in Abbildung 20 D die GFAP-Immunhistochemie derselben Läsion demonstriert, in der eine nur geringe Astrozytendichte im SZR-Areal zu erkennen ist. Die Abbildungen 20 E und F zeigen weitere SZR-Areale, bei denen ebenfalls im ersten Bild (Abbildung 20 E) die PO-positiven und im zweiten Bild (Abbildung 20 F) die GFAP-positiven Zellen aufgezeigt sind. Hier fällt nicht nur die niedrige Astrozytendichte, sondern auch ein dichtes, GFAP-positives Areal um das SZR-Areal auf (mit Sternchen markiert). Das Phänomen der erhöhten Dichte an GFAP-positiven Zellen um das SZR-Areal ist auch in anderen untersuchten NMO-Läsionen zu beobachten. Dies entspricht im Wesentlichen einer reaktiven Astroglie und deutet im vorliegenden Fall – bei stattgehabter Astrozytendepletion – auf eine effiziente Repopulation von GFAP-positiven Zellen hin. In den Abbildungen 21A-D sind zwei weitere Läsionen jeweils in den Färbungen PO und GFAP gezeigt, in denen wiederum die reaktive Astroglie um SZR-Areale (mit Sternchen markiert) zu erkennen ist. Vor allem inaktive Läsionen enthalten vermehrt repopulierte GFAP-positive Zellen, deren Dichte um das SZR-Areal am höchsten ist. In SZR-Arealen selbst sind so gut wie keine GFAP-positiven Astrozyten zu erkennen.

In Abbildung 22 A zeigt die fluoreszenzmikroskopische Doppelfärbung PO/GFAP den Verlust der *Glia limitans* an der Zirkumferenz eines Rückenmarkquerschnitts. Somit ist auch die zelluläre ‚Barriere‘ zwischen dem PNS und dem ZNS an den Eintritts- bzw. Austrittsstellen der Spinalnerven aufgehoben. (Abbildungen 23 A, B). Ausgedehnte SZR-Areale sind vor allem in der Peripherie des Rückenmarkquerschnitts und vor allem in der Nähe des Ein- bzw. Austritts der Spinalnerven zu finden (Abbildungen 20 E, F). Neben flächigen SZR-Arealen mit kaum interponierten Astrozyten (Abbildung 22A) sind auch lockere SZR-Areale mit einer ‚Vermischung‘ von Astrozyten und Schwannzellen zu beobachten (Abbildung 22B).



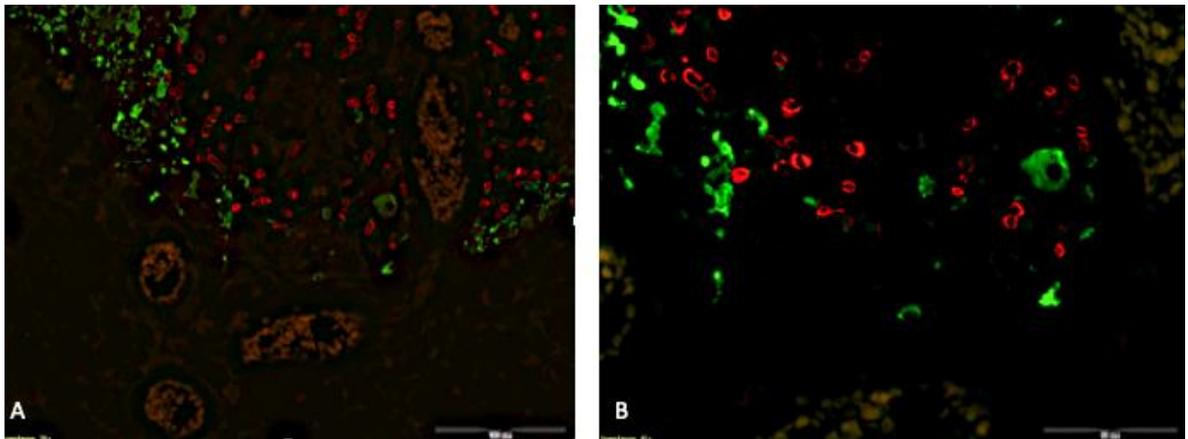
**Abbildung 20: Dichte der Astrozyten und SZR-Areale**

In den Abbildungen (A) und (B) ist die Reduktion der Dichte von Astrozyten in NMO-Läsionen von zwei Patientinnen ohne Schwannzell-Remyelinisierung dargestellt. Die Abbildungen (C) und (E) veranschaulichen zwei verschiedene SZR-Areale mit einer hohen Dichte an P0-positiven Schwannzellen. Dahingegen ist in den Abbildungen (D) und (F) die geringe Dichte an GFAP-positiven Astrozyten im gleichen SZR-Areal ersichtlich. Mit einem Stern ist die Repopulation der Astrozyten bzw. reaktive Astrogliose dargestellt (D), (F). – (A): 40-fache Vergr. Maßstab = 500 µm, (B), (D), (E): 100-fache Vergr. Maßstab = 200 µm, (C), (F): 100-fache Vergr. Maßstab = 100 µm. (A), (B), (D), (E), (F): GFAP-Färbung, (C): P0-Färbung.



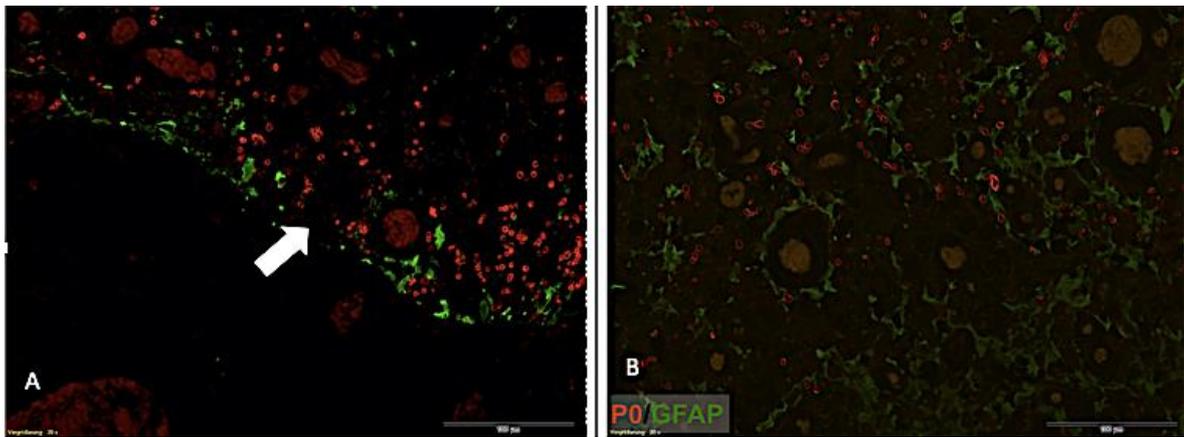
**Abbildung 21: Reaktive Astroglie am Rand von SZR-Arealen**

(A) zeigt die P0-positiven Zellen im SZR-Areal. (B) zeigt die Astroglie (Sternchen) in der Peripherie desselben SZR-Areals. In (C) und (D) ist eine weitere NMO-Läsion dargestellt, die die reaktive Astroglie (Sternchen) in der Peripherie des SZR-Areals (C) veranschaulicht. (A) = P0, (B) = GFAP, (C) = P0, (D) = GFAP – 100-fache Vergr. Maßstab = 200 µm.



**Abbildung 22: Unvollständige *Glia limitans* in der fluoreszenzmikroskopischen Doppelfärbung GFAP/P0 einer NMO-Läsion**

(A)= Gruppiert liegende GFAP- und P0-positive Zellen in der Peripherie eines Rückenmarkquerschnitts. Die normalerweise durchgehende *Glia limitans* erscheint fragmentiert bzw. aufgelöst. (B) = Vergrößerung derselben NMO-Läsion zur Veranschaulichung der räumlichen Nähe der P0-positiven Schwanzzellen sowie der GFAP-positiven Astrozyten. Es zeigt sich deutlich das Fehlen der *Glia limitans* an der Peripherie des Rückenmarkquerschnitts. grün = GFAP, rot = P0. (A): 200-fache Vergr. Maßstab = 100 µm, (B): 400-fache Vergrößerung. Maßstab = 50 µm.

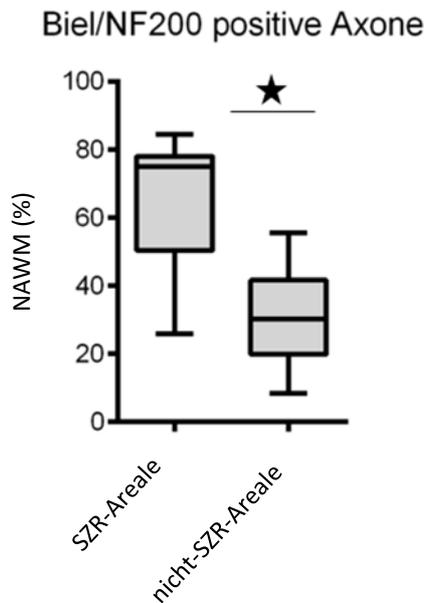


**Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Doppelfärbung von P0- und GFAP-positiven Zellen zur Veranschaulichung der Dichtereduktion von Astrozyten sowie Störung der *Glia limitans***

Der Pfeil in (A) zeigt die Unterbrechung der *Glia limitans*. (B) veranschaulicht die eher seltene Vermischung von GFAP- und P0-positiven Zellen in einer NMO-Läsion. Hierbei fällt insbesondere die geringe Dichte der Astrozyten mit z. T. bipolarer Morphologie auf, die möglicherweise repopulierten Astrozyten entsprechen. Rot = P0, grün = GFAP, (A): 200-fache Vergr. Maßstab = 100  $\mu$ m, (B): 200-fache Vergr. Maßstab = 100  $\mu$ m.

#### 4.5 Axone in den SZR-Arealen

Die Dichte der Axone wurde mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung gegen NF200 und Bielschowsky ermittelt. Schon morphologisch fällt auf, dass die Axone in den SZR-Arealen gut erhalten zu sein scheinen. Um die Axondichte zu quantifizieren, wurde ein Axonzählgitter verwendet, das 25 Kreuzungen enthielt, deren Kreuzungspunkte mit den NF200-positiven axonalen Strukturen ermittelt wurden. Um die relative Dichte der so gemessenen Axone zu ermitteln, wurde der Mittelwert der Axone in der NAWM dreier Fälle als 100 % festgelegt, um daraus den prozentualen Anteil der Axone in SZR-Arealen und nicht-SZR-Arealen zu berechnen. Es ergab sich ein mittlerer Prozentsatz von 65,0  $\pm$  20,0 % (MW  $\pm$  SD) erhaltenen Axonen in SZR-Arealen verglichen mit einer Axondichte von 30,7  $\pm$  14,6 % (MW  $\pm$  SD) in nicht-SZR-Arealen. Für die statistische Auswertung wurden der gepaarte t-Test und der nichtparametrische Wilcoxon-Test angewandt, da man anhand der Daten nicht von einer Normalverteilung ausgehen kann. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ; gepaarter t-Test) zwischen der Axondichte in SZR-Arealen und in nicht-SZR-Arealen (Diagramm 3). Auch im Wilcoxon-Test war der Unterschied signifikant ( $p < 0,05$ ). Schlussfolgernd ist anzumerken, dass die Dichte der Axone im SZR-Areal zwar immer noch deutlich niedriger ist als die Dichte in der NAWM, die als 100 % gesetzt wurde. Allerdings ist diese fast doppelt so hoch wie die Dichte in Arealen, die keine Schwannzellen und somit auch keine von Schwannzellen remyelinisierten Axone aufweisen. Der Anteil vitaler Axone in P0-positiven Arealen ist demnach höher als in nicht-SZR-Arealen.

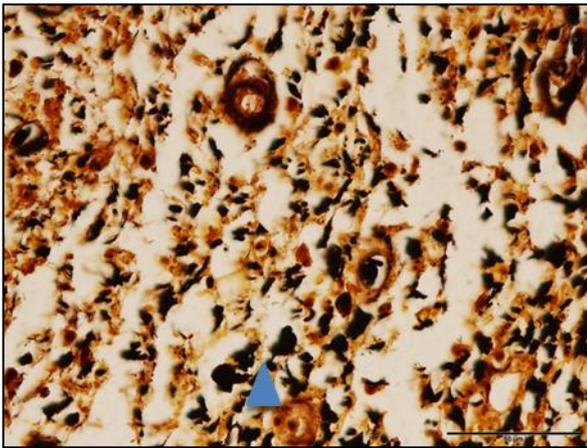


**Diagramm 3: Relative axonale Dichte in SZR-Arealen**

Hier wird die signifikant höhere Dichte (markiert mit Sternchen) an Axonen in SZR-Arealen gegenüber den nicht SZR-Arealen deutlich ( $p < 0,05$ ; gepaarter t-Test, Wilcoxon-Test).

In einem weiteren Schritt wurden in der immunhistochemischen Färbung mit NF200 und mithilfe der Bielschowsky-Versilberung eventuelle morphologische Veränderungen der Axone beurteilt. Dabei zeigten sich beispielsweise Axone mit vergrößertem Axondurchmesser, sog. Sphäroide, wie in Abbildung 24 veranschaulicht. Dabei sind drei verdickte Axone in der Umgebung der Markierung zu erkennen. Die Abbildungen 25 A, B zeigen zum einen die Areale, die eine erniedrigte Axondichte aufweisen und zugleich sind speziell in SZR-Arealen NF200-positive Axone zu sehen. Eine vergrößerte Darstellung an NF200-positiven Axone, die von Schwannzellen remyelinisiert sind, sind in den Abbildungen 25 C, D veranschaulicht. Die intakten, von Schwannzellen remyelinisierten Axone weisen überwiegend kein freies Lumen auf und sind vom Durchmesser kleiner als Axone, die von Oligodendrozyten myelinisiert sind. Hinzu kommt, dass diese Axone dunkler gefärbt sind. Zum Vergleich sind in den Abbildungen 25 E, F mittels der immunhistochemischen Bielschowsky-Färbung intakte von Oligodendrozyten myelinisierten Axone in der NAWM dargestellt. Dabei fällt zum einen ein größerer Axondurchmesser und zum anderen ein überwiegend freies Lumen der Axone auf. Abbildung 26 demonstriert zwei verschiedene Läsionen, bei denen die Axondichte eines SZR-Areals der Axondichte in einem nicht-SZR-Areal gegenübergestellt ist. Hierbei wird deutlich, welche Rolle die Schwannzellen in der Remyelinisierung der NMO-Läsionen spielen. Neben den lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden ergänzend fluoreszenzmikroskopische angefertigt. In Abbildung 27 A ist die Wanderung der

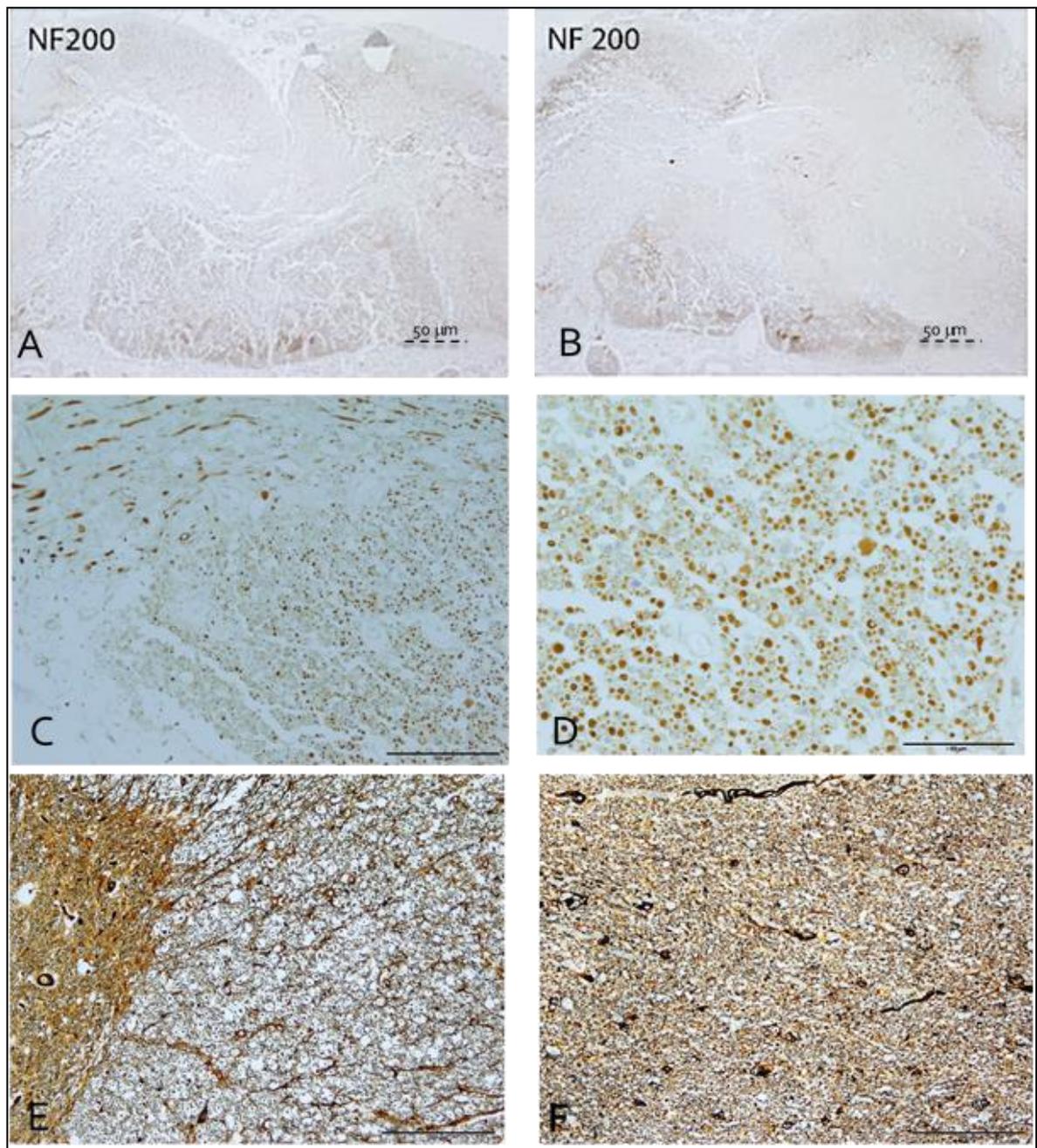
Schwanzzellen vom peripheren Nerv ins Rückenmark ersichtlich, in Abbildung 27 B die NF200-positiven Axone, die ebenso vom PNS ins ZNS einwandern. Um den Ursprung des Myelins zu verdeutlichen, wurden fluoreszenzmikroskopische Doppelfärbungen mit PO/NF200 durchgeführt. Infolgedessen ist in Abbildung 28 A ein Abschnitt des peripheren Nervs mit Schwanzzellen (rot) zu sehen, die von NF200-positiven regelrechten Axonen (grün) myelinisiert sind. Abbildung 28 B zeigt ein SZR-Areal einer NMO-Läsion, die ebenso NF200-positive Axone remyelinisieren. Insofern ist zu sehen, dass die Remyelinisierung seitens der Schwanzzellen hervorgeht und diese vom PNS abstammen.



**Abbildung 24: Axonale Schädigung in einer NMO-Läsion**

Diese Abbildung zeigt Beispiele von verdickten, in erster Linie transportgestörten Axonen (blauer Pfeil) in einer NMO-Läsion, die mittels Bielschowsky-Versilberung veranschaulicht sind. 400-fache Vergr. Maßstab = 50 µm.

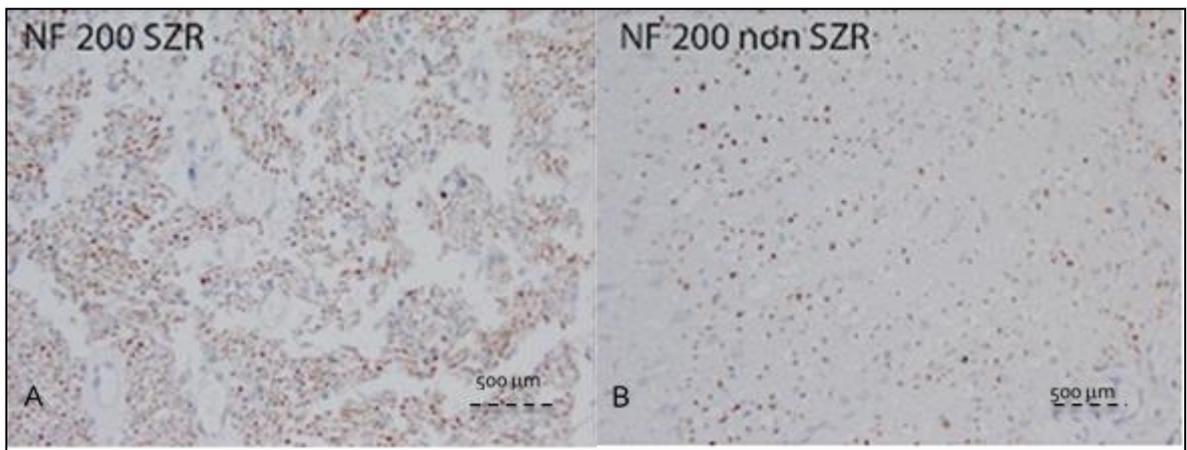
Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass die Axone in NMO-Läsionen nur in einem geringen Ausmaß beschädigt sind. In SZR-Arealen erreicht die Dichte der Axone sogar etwa zwei Drittel der Axondichte in der NAWM.



**Abbildung 25: Axone in SZR-Arealen im Vergleich zur NAWM.**

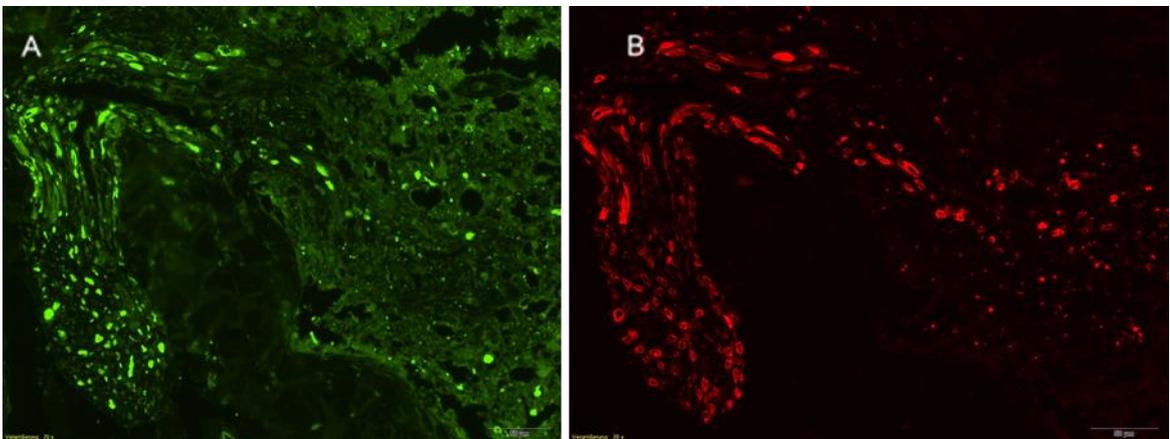
(A)-(D): NF200 – Immunhistochemie, (E)-(D): Bielschowsky-Versilberung

(A) und (B) zeigen Übersichtsaufnahmen von NF-positiven Axonen in SZR-Arealen derselben Patientin. (C) und (D) zeigen vergrößerte Aufnahmen von Schwannzellen remyelinierten Axonen. (E) und (F) zeigen Axone in der NAWM. Hier fällt die höhere Axondichte auf. (A): 100-fache Vergr. Maßstab = 100 µm, (B): 200-fache Vergr. Maßstab = 50 µm, (C): 200-fache Vergr. Maßstab = 100 µm, (D): 400-fache Vergr. Maßstab = 50 µm, (E): 100-fache Vergr. Maßstab = 200 µm, (F): 100-fache Vergr. Maßstab = 200 µm.



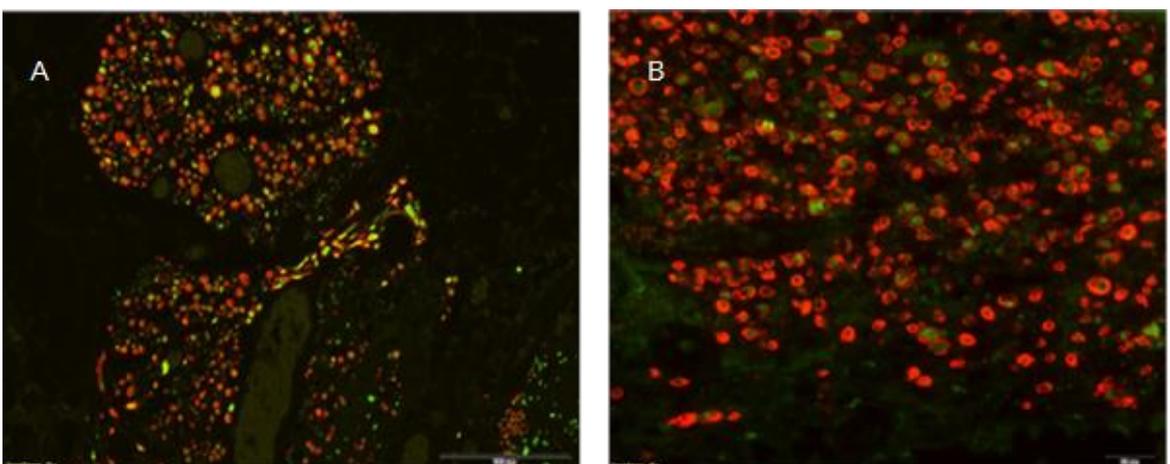
**Abbildung 26: Axondichte in SZR- und nicht SZR-Arealen einer NMO-Läsion**

In dieser Abbildung fällt die erhöhte Axondichte in einem SZR-Areal (A) verglichen mit einem nicht SZR-Areal derselben NMO-Läsion auf. (B): 200-fache Vergr. Maßstab = 500 µm.



**Abbildung 27: Fluoreszenzbasierte Färbung eines SZR-Areals am Übergang vom PNS zum ZNS**

(A) zeigt NF 200-positive Axone eines SZR-Areals am Übergang vom PNS (links: Spinalnerv) zum ZNS. In (B) sind die PO-positiven Schwannzellen desselben SZR-Areals zu erkennen, die sich vom PNS ins ZNS erstrecken. (A): NF 200, (B): PO, 200-fache Vergr. Maßstab = 50 µm.



**Abbildung 28: Fluoreszenz-Doppelfärbung (PO/NF200) zur Darstellung der remyelinierten Axone in einem SZR-Areal und der regelrecht myelinisierten Axone in einem Spinalnerv**

(A) zeigt regelrecht myelinisierte Axone in einem Spinalnerv. (B) ist eine Nahaufnahme von remyelinierten Axonen eines SZR-Areals einer NMO-Läsion. PO = rot, NF200 = grün. (A): 200-fache Vergr. Maßstab = 100 µm, (B): 400-fache Vergr. Maßstab = 50 µm.

#### 4.6 Ausmaß der Schwanzzell-Remyelinisierung bezogen auf das Läsionsstadium

Meine Annahme war, dass das Läsionsstadium eine Rolle für das Ausmaß der Schwanzzell-Remyelinisierung spielt. Die Vorstellung war dabei, dass ältere Läsionen besser remyelinisiert sind. Meine Untersuchungen ergaben, dass die inaktiven, späteren Läsionsstadien mehr SZR-Areale aufweisen als die aktiven Läsionen. Insgesamt waren in der hier untersuchten Kohorte allerdings auch mehr inaktive als aktive Läsionen auffindbar. Demzufolge ist in Diagramm 4 zu sehen, dass sowohl der Anteil der inaktiven Läsionen höher ist als auch der prozentuale Anteil an SZR-Arealen in inaktiven Läsionen. Allerdings ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (Mann Whitney U-Test;  $p = 0,45$ ).

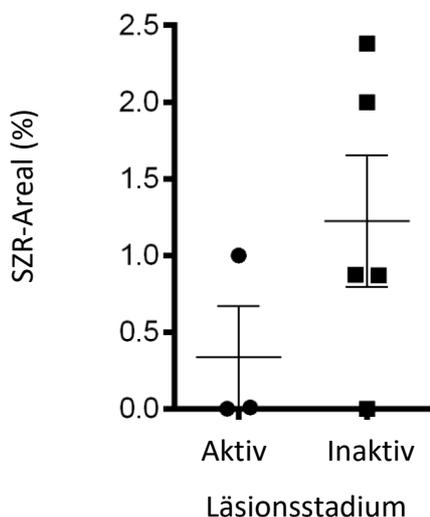


Diagramm 4: Größe des SZR-Areals nach Läsionsstadium

In diesem Diagramm ist der Mittelwert der Fläche des SZR-Areals in den aktiven und inaktiven Läsionen dargestellt. Auch wenn es den Anschein hat, dass das SZR-Areal in inaktiven Läsionen größer ist, ist der Unterschied nicht signifikant. Hierfür wurde der nicht parametrische Mann Whitney U-Test durchgeführt ( $p = 0,45$ ).

#### 4.7 Korrelation zwischen Ausmaß der Schwanzzell-Remyelinisierung und der Krankheitsdauer

Im Rahmen der Untersuchungen stellte sich die Frage, ob das Ausmaß der Schwanzzell-Remyelinisierung mit der Krankheitsdauer zusammenhängt. In der hier vorliegenden Kohorte ergab sich diesbezüglich keine Korrelation. Meine Untersuchung zeigte unterschiedliche Konstellationen: Auf der einen Seite gab es Fälle mit aktiven Läsionen, die verhältnismäßig große SZR-Areale und eine Krankheitsdauer von circa vier Monaten aufwiesen. Auf der anderen Seite fanden sich NMO-Fälle mit überwiegend inaktiven Läsionen, die sowohl große als auch kleinere SZR-Areale beinhalteten und eine

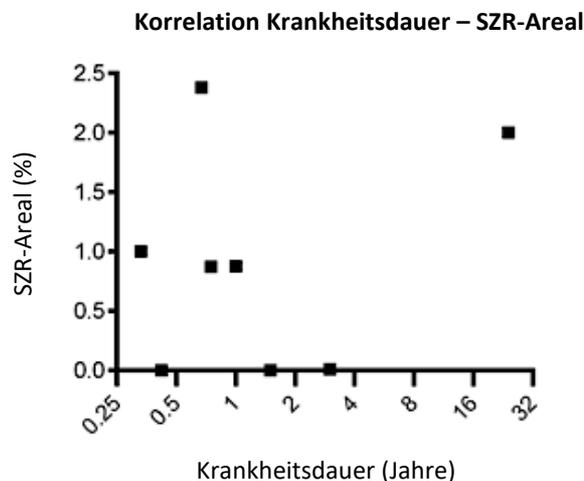
Krankheitsdauer zwischen fünf Monaten bis hin zu sogar 24 Jahren zeigten. In Tabelle 8 sind die untersuchten NMO-Fälle hinsichtlich ihrer Krankheitsdauer, der untersuchten Läsionsstadien und der Ausdehnung des SZR-Areals aufgelistet.

**Tabelle 8: Krankheitsdauer, Läsionsstadium und Größe des SZR-Areals.**

Diese Tabelle bildet das Läsionsstadium, die Krankheitsdauer und den Anteil des SZR-remyelinisierten Areals der untersuchten Fälle ab.

Fall	Läsionsstadium	Krankheitsdauer	SZR-Mittelwert Prozentualer Anteil
M43/80	Aktiv	Ca. 4 Monate	1 %
A206/04	Aktiv	1,5 Jahre	0 %
S 6/11	Aktiv	3 Jahre	0,01 %
L 66/62	Inaktiv	Ca. 5 Monate	0,875 %
AN 05/99	Inaktiv	Ca. 8 Monate	2,38 %
A 99/11	Inaktiv	Ca. 9 Monate	2 %
SN 51/96	Inaktiv	Ca. 1 Jahr	0 %
A 106/09	Inaktiv	24 Jahre	0,87 %

Im Diagramm 5 sind die prozentualen Anteile der SZR-Regionen in Korrelation zur Krankheitsdauer gesetzt. Der Korrelationskoeffizient betrug nach Pearson 0,26 und nach Spearman 0,96. Demnach besteht keine Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und dem prozentualen Anteil des SZR-Areals.



**Diagramm 5: Schwanzzell-Remyelinisierung in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer.**

In diesem Diagramm wird der prozentuale Anteil der SZR-Areale in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer gezeigt. Eine Korrelation zwischen Krankheitsdauer und dem prozentualen Anteil des SZR-Areals zeigt sich nicht. Hierbei wurden die Korrelationsanalysen nach Spearman ( $p=0,93$ ) und Pearson ( $p=0,26$ ) angewandt.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Ziele der Arbeit**

In der hiesigen Arbeit wurden NMO-Läsionen *post mortem* aus dem Rückenmark untersucht. Das Augenmerk lag hierbei auf den Remyelinisierungsprozessen der Schwannzellen in NMO-Läsionen. Hierbei wurde mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht, welche Rolle die Astrozyten, Oligodendrozyten und die Axone in diesem Prozess spielen. Eine weitere Fragestellung war, wie sich die Schwannzell-Remyelinisierung in aktiven und inaktiven Läsionen verhält. Das Ziel war es, aus diesen Beobachtungen Rückschlüsse auf mögliche Therapieoptionen zu ziehen.

### **5.2 Unterschiede zwischen MS und NMO**

Die NMO ist ebenso wie die MS eine entzündlich demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Lange Zeit wurde die NMO als eine akute Form der MS betrachtet. Diese Sichtweise hat sich geändert, nachdem viele klinische und pathophysiologische Unterschiede zwischen den beiden Erkrankungen festgestellt wurden. NMO ist charakterisiert durch meist schubförmig auftretende entzündliche Attacken der optischen Nerven und langstreckige Rückenmarksläsionen (Wingerchuk et al. 1999). Ein weiteres pathognomonisches Charakteristikum der NMO ist das Auftreten von NMO-IgG-Serum-Ak gegen AQP-4, einen Wasserkanal, der an den Astrozytenfortsätzen exprimiert ist (Lennon et al. 2004). NMO-IgG ist bei ca. 70 % der NMO-Patientinnen und -Patienten serologisch nachweisbar, wohingegen oligoklonale Banden im Gegensatz zur MS kaum nachweisbar sind. Hirnläsionen können bei der NMO zwar vorhanden sein, stellen aber im Gesamten eher eine Rarität dar (Wingerchuk et al. 2006).

### **5.3 Histopathologische Beobachtung in den NMO-Läsionen**

Wie bereits erwähnt ist die NMO eine Astrozytopathie, die durch den Verlust von AQP-4-Wasserkanälen hervorgerufen wird. Es kommt demnach zum Verlust von GFAP-positiven Zellen. Zudem konnte man eine deutliche Reduktion der Oligodendrozyten beobachten. Die Axone zeigten sich hingegen als überwiegend intakt. In den untersuchten Kohorten waren aktive und inaktive Läsionen zu sehen. Die aktiven Läsionen zeichneten sich u. a. durch das Vorhandensein von Kim1-positiven schaumzelligen Makrophagen und Eosinophilen aus. Zudem ist in den aktiven Läsionen eine überwiegend perivaskulär liegende Komplementaktivierung zu beobachten. Dahingegen waren in inaktiven Läsionen

überwiegend biopolare, regenerierende Astrozyten sowie aktivierte Mikrogliazellen zu finden. Insgesamt zeichneten sich diese Läsionen als sehr destruktiv ab. Einige dieser Läsionen wiesen Remyelinisierungsareale durch Schwannzellen auf, die überwiegend in den inaktiven Läsionen zu sehen waren. In diesen Arealen zeigten sich Brücken aus Schwannzellen zwischen den Eintritts- bzw. Austrittsstellen der Nervenwurzeln, vor allem in Bereichen, die am meisten von einer Depletion der Astrozyten betroffen waren. Daraus ableitend lässt sich mutmaßen, dass das Vorhandensein von Astrozyten ein Hindernis für die SZR darstellen könnte.

Bei der allerdings geringen Fallzahl ist daraus keine Korrelation zwischen Läsionsstadium und Remyelinisierungsrate zu schließen.

#### **5.4 Rolle und Art der Remyelinisierung**

In dieser Studie konnte ich zeigen, dass die Remyelinisierung bei der NMO von den Schwannzellen ausgeht. Diese sind in der Lage, in demyelinisierte Areale einzuwandern und dort Myelin zu produzieren, das normalerweise im PNS gefunden wird. Nur einzelne wenige Oligodendrozyten sind in inaktiven NMO-Läsionen vorzufinden; eine wesentliche Oligodendrozyten-Remyelinisierung konnte ich nicht nachweisen.

#### **5.5 Was ist die Schwannzelle?**

Schwannzellen sind die Gliazellen des PNS, die wie die Oligodendrozyten in der Lage sind, Myelin zu produzieren. Ihre Aufgabe liegt darin, Axone zu isolieren, indem sie ihre Fortsätze spiralförmig um die Axone winden und so die Myelinscheiden bilden. Zwischen den benachbarten durch Schwannzellen gebildeten Internodien befinden sich die Ranvierschen Schnürringe, die nicht myelinisiert sind und die saltatorische Reizleitung ermöglichen. Während ein einzelner Oligodendrozyt mehrere Axone parallel myelinisieren kann, liegt bei den Schwannzellen eine 1:1-Verschaltung mit Neuronen vor (Feltri et al. 2016). Entwicklungsgeschichtlich stammen die Schwannzellen von pluripotenten Stammzellen der Neuralleiste ab. Bei der Differenzierung spielen einige Wachstumsfaktoren sowie neuronale Signalwege eine Rolle, die die Neurogenese unterdrücken und zeitgleich die Differenzierung der Schwannzellen fördern (Stevens et al. 1998; Salzer 2015; Salzer und Zalc 2016). Einige Myelinproteine kommen sowohl im ZNS als auch im PNS vor, wie zum Beispiel das Myelinbasierte Protein (MBP), das besonders für die Kompaktierung des Myelins wichtig ist. Es gibt aber auch Myelinprodukte, die nur im PNS vorkommen, wie das Myelinprotein P0. P0 spielt eine wichtige Rolle bei der Myelinkompaktierung und beim

Myelinerhalt (Filbin et al. 1990). Für die Myelinisierung wird die Interaktion mit dem axonalen Neuroregulin 1 benötigt, das über den Rezeptor-Tyrosinprotein-Kinase ErbB2/B3-Rezeptor mit Schwannzellen in Verbindung steht (Kidd et al. 2013). Die Schwannzellen scheinen des Weiteren einen immensen Einfluss auf den Erhalt und auf die Regeneration der Axone zu haben. Auch gibt es Hinweise darauf, dass Axone entweder durch direkten Kontakt oder durch diffundierende Moleküle die Genexpression und Differenzierung von Schwannzellen beeinflussen (Maurel und Salzer 2000). In der hier vorliegenden Untersuchung fielen die erstaunlich gut erhaltenen Axone in Schwannzell-remyelinisierten Arealen auf, was wahrscheinlich auf eine frühe Schwannzell-Remyelinisierung zurückzuführen ist. Viele Forschungsgruppen haben experimentell Schwannzellen in Läsionen transplantiert mit dem Ziel der Remyelinisierung der Axone innerhalb der Läsion. Um dies effizienter zu gestalten, haben beispielsweise Kanno und Kolleginnen und Kollegen Schwannzellen zusammen mit dem Neurotrophin D15A und dem Enzym Chondroitinase ChABC, das die regenerationshemmende Wirkung auf die Axone aufhebt, transplantiert. Dies führte unter anderem zu einem Anstieg der Schwannzellen und von Schwannzellen remyelinisierten Axone und förderte die Fortbewegung der Schwannzellen in Richtung der Läsion (2014).

## **5.6 Schwannzell-Remyelinisierung im peripheren Nervensystem**

Schwannzellen sind geeignete Zellen im Rahmen der neuronalen Regeneration nach einer Nervenschädigung oder bei einer Neuropathie. Eine Nervenschädigung, die mit einer Axotomie einhergeht, führt zu komplexen pathophysiologischen Veränderungen. Damit verbunden zeigt sich das Phänomen der Wallerschen Degeneration, womit die distale, anterograde axonale Degeneration gemeint ist. Die ersten Anzeichen eines degenerativen Prozesses zeigen sich hierbei innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Verletzung (Navarro et al. 2007). Im Gegensatz zu Axonen im ZNS sind die Axone im PNS in der Lage, nach einer Schädigung auszusprossen und ihre volle Funktion wiederzuerlangen (Navarro 2009). Die Wallersche Degeneration begleitend finden viele Prozesse innerhalb der Schwannzellen statt. Als Erstes dedifferenzieren und phagozytieren sie Myelin im Bereich des geschädigten Nervs. Darüber hinaus rekrutieren sie Makrophagen, um die Phagozytose weiter voranzutreiben (Chen et al. 2007). Die axonale Regeneration und die Remyelinisierung unterliegen der Beteiligung einiger Signalstoffe wie JNK/c-Jun, ERK, Notch und p38 (Glenn und Talbot 2013). Der Transkriptionsfaktor c-Jun spielt beispielsweise eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des Reparaturprogramms der

Schwanzzellen (Arthur-Farraj et al. 2012). Die erneut produzierten Myelinscheiden sind wesentlich dünner als die herkömmlichen Myelinscheiden. Dies scheint an der Wirkung von Ng1-I zu liegen. Die Wirkung des Signalstoffes Ng1-III führt wiederum zu einer Überexpression von Myelin mit Bildung verdickter Myelinscheiden (Stassart et al. 2013). Die Remyelinisierung mittels Schwanzzellen findet unmittelbar nach der Axotomie statt, was wahrscheinlich durch die Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors ErbB2 initiiert wird (Guertin et al. 2005). Im distalen Abschnitt des Nerven werden Schwanzzellen durch die Transsektion des Axons und später durch Signalstoffe aus Makrophagen stimuliert (Navarro et al. 2007). Andere Autorinnen und Autoren fanden, dass die Proliferation von Schwanzzellen im distalen Abschnitt eines Nerven in der adulten Maus nicht maßgeblich für den Remyelinisierungsprozess oder für die Wiederherstellung der Funktion des Nerven ist (Yang et al. 2008). Des Weiteren ist zu beobachten, dass überschüssige S100-positive Schwanzzellen mittels Apoptose beseitigt werden, wenn sie keinen Kontakt zu Axonen haben (Yang et al. 2008). Das Phänomen der überschüssigen Zellproliferation während einer Reorganisation ist bekannt und dient der Sicherstellung der Regeneration anhand genügend vorhandener Zellen.

Ein erheblicher Faktor im Zusammenhang mit der Regeneration und dem Wachstum des peripheren Nerven ist die suffiziente Interaktion zwischen Axonen und Schwanzzellen (Chen et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die axonale Regeneration in einem höheren Ausmaß stattfindet, wenn die Schwanzzellen den Weg hierfür bereitet haben (Son und Thompson 1995). Wiederholte Nervenschädigung führt zu Reinnervation, sodass die Schwanzzellen an den Nervenendplatten mehr Zeit haben, Ausläufer zu bilden, was wiederum die Axonregeneration fördert (Son und Thompson 1995). Dabei spielt die Basallamina der Schwanzzellen insofern eine Rolle, als dass die Regeneration der Axone entlang der inneren Schicht der Basallamina der Schwanzzellen stattfindet, entlang der sog. Hanken-Büngner'schen Bänder (Ide et al. 1983). Interessant ist ferner die Beobachtung, dass sich die Axone entlang der inneren Schicht der Basallamina von Schwanzzellen regenerieren können, auch wenn keine neu eingewanderten Schwanzzellen vorhanden sind (Ide et al. 1983).

Experimentell wurde bereits bewiesen, dass man Schwanzzell-ähnliche Zellen aus mesenchymalen Stammzellen gewinnen kann. Teilweise ist es sogar möglich, die Stammzellen mittels nichtinvasiver Verfahren zu gewinnen. Beispielsweise sind Stammzellen aus Adipozyten oder aus der Nabelschnur gut erreichbar. Die Differenzierung

von mesenchymalen zu Schwannzell-ähnlichen Zellen unterliegt lediglich einer Zytokinbehandlung, die wie folgt abläuft: beta-mercaptoethanol -> retinoic acid -> bFGF + PDGF + Forskolin + Neuroregulin -> PO - positive Schwannzell-ähnliche Zellen

In einem nächsten Schritt sollten experimentelle klinische Studien durchgeführt werden, um mesenchymale Zellen therapeutisch nutzbar zu machen. Im Falle der NMO könnte dies bedeuten, Stammzellen der an NMO erkrankten Patientinnen und Patienten zur Proliferation und Ausschwemmung zu stimulieren. Anschließend könnte eine Zytokinbehandlung erfolgen. Anhand von klinischen Untersuchungen könnte die Wirksamkeit dieser Methode für die Remyelinisierung von NMO-Läsionen überprüft werden.

## **5.7 Schwannzell-Remyelinisierung im ZNS**

Die Remyelinisierung durch Schwannzellen im ZNS hat einen positiven Effekt auf die Aufrechterhaltung der Weiterleitung der Aktionspotenziale (Blight und Young 1989). Bereits 1976 wurde experimentell nach induzierter Läsion mittels lokal injiziertem Lysolecithin die Invasion der Schwannzellen ins Rückenmark beobachtet (Blakemore 1976). Blakemore und Kolleginnen und Kollegen zeigten zudem zehn Jahre später in einem Tiermodell die Remyelinisierung von demyelinisierten Arealen im ZNS nach Injektion von autolog kultivierten Schwannzellen (1985). Daraufhin folgten viele weitere experimentelle Modelle, die ähnliche Beobachtungen machten. Dabei wurde festgestellt, dass die injizierten Schwannzellen zwar Myelin produzieren, sie aber weniger im Stande sind zu migrieren und sich weiter zu differenzieren (Woodhoo et al. 2007). So wurden Vorläufer-Schwannzellen eingesetzt mit dem Ergebnis einer verstärkten und besseren Migration innerhalb der Läsion und einer soliden Interaktion mit vorhandenen Gliazellen (Woodhoo et al. 2007). Andere Forschungsgruppen konnten in einer experimentell herbeigeführten demyelinisierenden Enzephalitis feststellen, dass Schwannzellen sowohl in den Läsionen überleben als auch im Stande sind, diese Läsionen zu besiedeln und zu remyelinisieren (Zujovic et al. 2012). In einem nächsten Schritt wurde mit Stammzellen und OPCs gearbeitet. Zawadzka und Kolleginnen und Kollegen stellten in diesem Zusammenhang die Hypothese auf, dass die Mehrzahl der remyelinisierenden Schwannzellen aus den Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor A- (PDGFRA)- und Olig2-positiven Vorläuferzellen des ZNS (OPCs) hervorgehen und nicht ihren Ursprung in peripheren Nervenwurzeln haben (2010). Weiterhin wurde experimentell gezeigt, dass die Differenzierung der OPCs in Schwannzell-ähnlichen Zellen abhängig von den

knochenmorphogenetischen Proteinen (BMP) ist und in Abwesenheit von Noggin geschieht. Doch die Ausdifferenzierung in Schwanzzell-ähnliche Zellen findet nicht statt, wenn Astrozyten in die Läsionen transplantiert werden (Talbot et al. 2006). In der hier vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass die SZR- Areale ganz überwiegend in der Nähe der Eintritts- bzw. Austrittsstellen der Nervenwurzeln liegen. Auch waren die SZR- Areale an diesen Stellen am größten und eine „Schwanzzellbrücke“ zwischen peripherer Nervenwurzel und SZR-Areal ließ sich häufig nachweisen. Es ist trotzdem nicht auszuschließen, dass zusätzlich Schwanzzellen aus den zentralen Vorläuferzellen generiert werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit untersucht. In einer klinischen Studie berichteten Ikota und Kolleginnen und Kollegen vom Fall einer Patientin mit NMO, bei der sie Schwanzzell-Remyelinisierung in Rückenmarksläsionen nach langer Krankheitsdauer beobachteten. Die remyelinisierten Areale waren immunhistochemisch sowohl positiv für Schwann/2E als auch für MBP (2010). Itoyama und Kolleginnen und Kollegen berichteten bereits 1985 von akuten schweren Krankheitsverläufen einiger japanischer Patientinnen und Patienten mit damals diagnostizierter MS, bei denen sie *post mortem* große Läsionen im Rückenmark beobachteten. In der überwiegenden Anzahl der in der vorliegenden Studie untersuchten Fälle konnte die SZR in inaktiven Krankheitsverläufen beobachtet werden, allerdings bei geringen Fallzahlen. Doch einige der untersuchten Fälle stellten auch akute Krankheitsverläufe dar, die ebenfalls eine SZR aufwiesen, was sich somit mit den Beobachtungen von Itoyama und Kolleginnen und Kollegen deckt. Die heutigen Erkenntnisse sowie unsere Daten bestärken die Vermutung, dass es sich bei den Fällen von Itoyama et al. nicht um Patientinnen und Patienten mit MS, sondern mit NMO handelte. Sie stellten entsprechend auch fest, dass die Areale mit Schwanzzell-Remyelinisierung mit Arealen, die einen deutlichen GFAP-Verlust aufwiesen, korrelierten (1985).

Wie bereits ausgeführt, trat die SZR in meiner Untersuchung eher bei Patientinnen und Patienten mit chronischem Krankheitsverlauf und überwiegend inaktiven Läsionen auf. Die SZR-Areale in den untersuchten Läsionen enthielten so gut wie keine GFAP-positiven Zellen. Das passt zu experimentellen Daten, die zeigen, dass der Verlust von astrozytären Zellen und Fortsätzen den Weg für die Migration der Schwanzzellen in das demyelinisierte Areal bereitet. Die ausgeprägte Astrozytopathie bei NMO steht ganz klar in Zusammenhang mit den Serum-Auto-Ak gegen AQP-4 (Fujihara 2011). Castro und Kolleginnen und Kollegen betonten in ihrer Arbeit die Wichtigkeit der Rolle der Astrozyten im Rahmen der

Oligodendrozyten-Remyelinisierung. Der bei der NMO beobachtete Verlust von Astrozyten in den Läsionen verhindert also eine effiziente Rekrutierung von lokalen OPCs und deren Differenzierung zu reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten. Astrozyten scheinen somit auch einen wesentlichen Einfluss darauf zu haben, ob die Remyelinisierung aus den Zellen des ZNS oder des PNS hervorgeht; eine Reduktion der Aktivierung von STAT3 in Astrozyten ist die maßgebliche Voraussetzung für die aus dem PNS stammende Schwanzzell-Remyelinisierung (2015). Somit zeigt sich in der vorliegenden Studie die Parallele zu den Befunden von Castro und Kolleginnen und Kollegen. Auch andere Quellen betonen, dass reaktive Astrozyten, sofern sie keine Gliose verursachen, die oligodendrogliale Remyelinisierung fördern (Jasmin und Ohara 2002).

Eine weitere Beobachtung im Rahmen der vorliegenden Studie ist, dass die SZR-Areale häufig von aktiviert wirkenden GFAP-positiven Zellen umgeben sind, wobei eine klare Grenze zwischen den SZR-Arealen und den Arealen mit GFAP-positiven Zellen herrscht. Welche Signalstoffe nach erfolgter SZR zur Stimulation und lokalisierten Vermehrung und Aktivierung der Astrozyten führen, ist dabei unbekannt. Fakt ist, dass die Abwesenheit von Astrozyten einen determinierenden Einfluss auf den Remyelinisierungsprozess hat. Weiterhin stellt sich die Frage, warum in einigen der hier untersuchten Fälle die SZR bereits in aktiven Läsionen beginnt, aber in der überwiegenden Anzahl der Fälle erst in inaktiven Läsionsstadien nachweisbar ist. Ferner wäre es interessant zu untersuchen, welche Rolle die Oligodendrozyten bei der Aktivierung und Migration von Schwanzzellen spielen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte ich zeigen, dass in spinalen NMO-Läsionen ausgedehnte Areale von Schwanzzell-Remyelinisierung vorhanden sind. Auffällig war der gute axonale Erhalt in Schwanzzell-remyelinisierten NMO-Läsionen. Außerdem konnte ich zeigen, dass Brücken aus Schwanzzellen zwischen den Eintritts- bzw. Austrittsstellen der Nervenwurzeln und der Astrozyten-depletierten NMO-Läsionen im Rückenmark bestehen, was eine Einwanderung von Schwanzzell-Vorläuferzellen aus der Peripherie nahelegt. Die Fähigkeit zur Remyelinisierung der Schwanzzellen im ZNS ist seit Langem bekannt. So besteht auch die Fragestellung, wie man Schwanzzellen therapeutisch in demyelinisierenden Erkrankungen wie MS oder NMO einsetzen könnte, seit Langem. Brierley et al. (2001) haben sich beispielsweise mit dieser Frage befasst und in einer experimentellen Studie humane Schwanzzellen in akute Demyelinisierungsareale des Rückenmarks adulter Mäuse transplantiert. Das Ergebnis war insofern nicht vielversprechend, als dass die Überexpression von Fibroblasten den entscheidenden

---

limitierenden Faktor darstellte und eine Remyelinisierung verhinderte (Brierley et al. 2001). In Übereinstimmung mit zahlreichen experimentellen Arbeiten legt meine Arbeit nahe, dass eine effiziente therapeutische Schwanzzell-Remyelinisierung nur in Astrozyten-freien ZNS-Arealen erfolgen kann. Um die Effizienz der Schwanzzell-Remyelinisierung zu erhöhen, muss vor allem geklärt werden, wie Schwanzzell-Vorläuferzellen an den Läsionsort gebracht und zur Myelinisierung angeregt werden können.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Remyelinisierungsprozesse bei der NMO untersucht. Ich kann hier zeigen, dass im Gegensatz zur MS, bei der Oligodendrozyten entscheidend für die Remyelinisierung sind, dies bei der NMO nicht der Fall ist. Stattdessen konnte ich ausgedehnte Schwanzzell-remyelinisierte Areale im Rückenmark von Patientinnen und Patienten mit NMO nachweisen, die häufig mit den Nervenwurzeln in Verbindung standen. Sowohl in den Schwanzzell-remyelinisierten Arealen als auch im Bereich der *Glia limitans* – am Übergang zwischen PNS und ZNS – stellte sich bei erfolgreicher Schwanzzell-Remyelinisierung im ZNS regelhaft ein Verlust GFAP-positiver Astrozyten ein. Die Resultate dieser Arbeit zeigen auf, dass das Ausmaß der Schwanzzell-Remyelinisierung in NMO-Läsionen bedeutsam ist und von therapeutischer Bedeutung sein könnte.

## 7 Literaturverzeichnis

Abney ER, Williams BP, Raff MC (1983): Tracing the development of oligodendrocytes from precursor cells using monoclonal antibodies, fluorescence-activated cell sorting, and cell culture. *Dev Biol* 100, 166–171

Almekhlafi MA, Clark AW, Lucchinetti CF, Zhang Y, Power C, Bell RB (2011): Neuromyelitis Optica With Extensive Active Brain Involvement: An Autopsy Study. *Arch Neurol* 68, 508–512

Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T (2014): Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology* 82, 1302–1306

Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, Woodhoo A, Jenkins B, Rahman M, Turmaine M, et al. (2012): c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* 75, 633–647

Beck RW, Cleary PA, Anderson MM, Keltner JL, Shults WT, Kaufman DI, Buckley EG, Corbett JJ, Kupersmith MJ, Miller NR, et al. (1992): A Randomized, Controlled Trial of Corticosteroids in the Treatment of Acute Optic Neuritis. *N Engl J Med*. 326, 581–588

Blakemore WF (1976): Invasion of Schwann Cells into the Spinal Cord of the Rat Following Local Injections of Lysolecithin. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2, 21–39

Blakemore WF (2008): Regeneration and repair in multiple sclerosis: the view of experimental pathology. *J Neurol Sci* 265, 1–4

Blakemore WF, Crang AJ (1985): The use of cultured autologous Schwann cells to remyelinate areas of persistent demyelination in the central nervous system. *J Neurol Sci* 70, 207–223

Blight AR, Young W (1989): Central axons in injured cat spinal cord recover electrophysiological function following remyelination by Schwann cells. *J Neurol Sci* 91, 15–34

Bonnan M, Cabre P (2012): Plasma Exchange in Severe Attacks of Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Int*. 2012, e787630

Brierley CM, Crang AJ, Iwashita Y, Gilson JM, Scolding NJ, Compston DA, Blakemore WF (2001): Remyelination of demyelinated CNS axons by transplanted human schwann cells: the deleterious effect of contaminating fibroblasts. *Cell Transplant* 10, 305–315

Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmarch HA, Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions: Macrophages in MS. *Ann Neurol* 38, 788–796

Brück W, Popescu B, Lucchinetti CF, Markovic-Plese S, Gold R, Thal DR, Metz I (2012): Neuromyelitis optica lesions may inform multiple sclerosis heterogeneity debate. *Ann Neurol* 72, 385–394

- Cabrera-Gómez JA, Kurtzke JF, González-Quevedo A, Lara-Rodríguez R (2009): An epidemiological study of neuromyelitis optica in Cuba. *J Neurol* 256, 35–44
- Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp BD (2000): NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 20, 6404–6412
- Chen H, Liu SM, Zhang XX, Liu YO, Li SZ, Liu Z, Dong HQ (2016): Clinical Features of Patients with Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Chin Med J (Eng)* 129, 2079–2084
- Chen YY, McDonald D, Cheng C, Magnowski B, Durand J, Zochodne DW (2005): Axon and Schwann cell partnership during nerve regrowth. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 613–622
- Chen Z-L, Yu W-M, Strickland S (2007): Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 30, 209–233
- Costanzi C, Matiello M, Lucchinetti CF, Weinshenker BG, Pittock SJ, Mandrekar J, Thapa P, McKeon A (2011): Azathioprine: tolerability, efficacy, and predictors of benefit in neuromyelitis optica. *Neurology* 77, 659–666
- Davoudi V, Keyhanian K, Bove RM, Chitnis T (2016): Immunology of neuromyelitis optica during pregnancy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3, e288
- de Seze J, Stojkovic T, Ferriby D, Gauvrit JY, Montagne C, Mounier-Vehier F, Verier A, Pruvo J-P, Hache JC, Vermersch P (2002): Devic's neuromyelitis optica: clinical, laboratory, MRI and outcome profile. *J Neurol Sci* 197, 57–61
- Fard MK, van der Meer F, Sánchez P, Cantuti-Castelvetri L, Mandad S, Jäkel S, Fornasiero EF, Schmitt S, Ehrlich M, Starost L, et al. (2017): BCAS1 expression defines a population of early myelinating oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Sci Transl Med.* 9, eaam7816
- Feltri ML, Poitelon Y, Previtali SC (2016): How Schwann Cells Sort Axons: New Concepts. *Neuroscientist* 22, 252–265
- Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI (1990): Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344, 871–872
- Flanagan EP, Weinshenker BG (2014): Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 483
- Fujihara K (2011): Neuromyelitis optica and astrocytic damage in its pathogenesis. *J Neurol Sci* 306, 183–187
- Ghezzi A, Bergamaschi R, Martinelli V, Trojano M, Tola MR, Merelli E, Mancardi L, Gallo P, Filippi M, Zaffaroni M, et al. (2004): Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic's Neuromyelitis Optica. *J Neurol* 251, 47–52

- Glenn TD, Talbot WS (2013): Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Curr Opin Neurobiol* 23, 1041–1048
- Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA, Kim HA (2005): Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 25, 3478–3487
- Hoyt CC (2021): Multiplex Immunofluorescence and Multispectral Imaging: Forming the Basis of a Clinical Test Platform for Immuno-Oncology. *Front Mol Biosci* 8, 674747
- Ide C, Tohyama K, Yokota R, Nitatori T, Onodera S (1983): Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res* 288, 61–75
- Ikota H, Iwasaki A, Kawarai M, Nakazato Y (2010): Neuromyelitis optica with intraspinal expansion of Schwann cell remyelination. *Neuropathology* 30, 427–433
- Itoyama Y, Ohnishi A, Tateishi J, Kuroiwa Y, Webster HD (1985): Spinal cord multiple sclerosis lesions in Japanese patients: Schwann cell remyelination occurs in areas that lack glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Acta Neuropathol* 65, 217–223
- Jacob A, Weinshenker BG, Violich I, McLinskey N, Krupp L, Fox RJ, Wingerchuk DM, Bog-gild M, Constantinescu CS, Miller A, et al. (2008): Treatment of neuromyelitis optica with rituximab: retrospective analysis of 25 patients. *Arch Neurol* 65, 1443–1448
- Jacob A, Matiello M, Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Lucchinetti C, Shuster E, Carter J, Keegan BM, Kantarci OH, Pittock SJ (2009): Treatment of neuromyelitis optica with mycophenolate mofetil: retrospective analysis of 24 patients. *Arch Neurol* 66, 1128–1133
- Jarius S, Wildemann B (2013): The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation* 10, 797
- Jarius S, Ruprecht K, Wildemann B, Kuempfel T, Ringelstein M, Geis C, Kleiter I, Klein-schnitz C, Berthele A, Brettschneider J, et al. (2012): Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation* 9, 14
- Jasmin L, Ohara PT (2002): Remyelination within the CNS: do schwann cells pave the way for oligodendrocytes? *Neuroscientist* 8, 198–203
- Kanno H, Pressman Y, Moody A, Berg R, Muir EM, Rogers JH, Ozawa H, Itoi E, Pearse DD, Bunge MB (2014): Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 34, 1838–1855
- Kidd GJ, Ohno N, Trapp BD (2013): Biology of Schwann cells. *Handb Clin Neurol* 115, 55–79
- Kim SH, Kim W, Li XF, Jung IJ, Kim HJ (2012): Does interferon beta treatment exacerbate neuromyelitis optica spectrum disorder? *Mult Scler* 18, 1480–1483

Kitley J, Leite MI, Nakashima I, Waters P, McNeillis B, Brown R, Takai Y, Takahashi T, Misu T, Elson L, et al. (2012): Prognostic factors and disease course in aquaporin-4 antibody-positive patients with neuromyelitis optica spectrum disorder from the United Kingdom and Japan. *Brain* 135, 1834–1849

Kitley J, Evangelou N, Küker W, Jacob A, Leite MI, Palace J (2014): Catastrophic brain relapse in seronegative NMO after a single dose of natalizumab. *J Neurol Sci* 339, 223–225

Kleiter I, Hellwig K, Berthele A, Kämpfel T, Linker RA, Hartung H-P, Paul F, Aktas O, Neuromyelitis Optica Study Group (2012): Failure of natalizumab to prevent relapses in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 69, 239–245

Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL (1990): Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1561–1565

Lauenstein AS, Stettner M, Kieseier BC, Lensch E (2014): Treating neuromyelitis optica with the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab. *BMJ Case Rep* 2014

Lee MS, Kubota K, Iseki H, Shibanaï S, Nagae K, Chang CM, Ohkubo K, Sonoda Y, Narita N (1988): Degenerative changes of the primary trigeminal axons and neurons following infra-orbital nerve transection. *Anat Anz* 165, 351–369

Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG (2004): A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364, 2106–2112

Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR (2005): IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202, 473–477

Liu Y, Given KS, Owens GP, Macklin WB, Bennett JL (2018): Distinct patterns of glia re-pair and remyelination in antibody-mediated demyelination models of multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Glia* 66, 2575–2588

Lohrberg M, Winkler A, Franz J, van der Meer F, Ruhwedel T, Sirmipilatz N, Dadarwal R, Handwerker R, Esser D, Wiegand K, et al. (2020): Lack of astrocytes hinders parenchymal oligodendrocyte precursor cells from reaching a myelinating state in osmolyte-induced demyelination. *Acta Neuropathol Commun* 8

Loup F, Weinmann O, Yonekawa Y, Aguzzi A, Wieser HG, Fritschy JM (1998): A highly sensitive immunofluorescence procedure for analyzing the subcellular distribution of GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the human brain. *J Histochem Cytochem* 46, 1129–1139

Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, Trebst C, Weinshenker B, Wingerchuk D, Parisi JE, Lassmann H (2002): A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125, 1450–1461

Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BFG, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T (2014a): The pathology of an autoimmune astrocytopathy: lessons learned from neuromyelitis optica. *Brain Pathol* 24, 83–97

- Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BFGH, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T (2014b): The Pathology of an Autoimmune Astrocytopathy: Lessons Learned from Neuromyelitis Optica. *Brain Pathol* 24, 83–97
- Marrie RA, Gryba C (2013): The Incidence and Prevalence of Neuromyelitis Optica. *Int J MS Care* 15, 113–118
- Maurel P, Salzer JL (2000): Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci* 20, 4635–4645
- Mealy MA, Wingerchuk DM, Palace J, Greenberg BM, Levy M (2014): Comparison of relapse and treatment failure rates among patients with neuromyelitis optica: multicenter study of treatment efficacy. *JAMA Neurol* 71, 324–330
- Misu T, Fujihara K, Nakashima I, Sato S, Itoyama Y (2005): Intractable hiccup and nausea with periaqueductal lesions in neuromyelitis optica. *Neurology* 65, 1479–1482
- Misu T, Fujihara K, Kakita A, Konno H, Nakamura M, Watanabe S, Takahashi T, Nakashima I, Takahashi H, Itoyama Y (2007): Loss of aquaporin 4 in lesions of neuro-myelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1224–1234
- Misu T, Höftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, Nakashima I, Konno H, Bradl M, Garzuly F, et al. (2013): Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 125, 815–827
- Modregger J, DiProspero NA, Charles V, Tagle DA, Plomann M (2002): PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* 11, 2547–2558
- Monteiro de Castro G, Deja NA, Ma D, Zhao C, Franklin RJM (2015): Astrocyte Activation via Stat3 Signaling Determines the Balance of Oligodendrocyte versus Schwann Cell Remyelination. *Am J Pathol* 185, 2431–2440
- Morisaki S, Nishi M, Fujiwara H, Oda R, Kawata M, Kubo T (2010): Endogenous glucocorticoids improve myelination via Schwann cells after peripheral nerve injury: An in vivo study using a crush injury model. *Glia* 58, 954–963
- Navarro X (2009): Chapter 27: Neural plasticity after nerve injury and regeneration. *Int Rev Neurobiol* 87, 483–505
- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A (2007): Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82, 163–201
- Nicchia GP, Nico B, Camassa LMA, Mola MG, Loh N, Dermietzel R, Spray DC, Svelto M, Frigeri A (2004): The role of aquaporin-4 in the blood–brain barrier development and integrity: Studies in animal and cell culture models. *Neuroscience* 129, 935–944
- Nikoo Z, Badihian S, Shaygannejad V, Asgari N, Ashtari F (2017): Comparison of the efficacy

- of azathioprine and rituximab in neuromyelitis optica spectrum disorder: a randomized clinical trial. *J Neurol* 264, 2003–2009
- Palace J, Lin DY, Zeng D, Majed M, Elson L, Hamid S, Messina S, Misu T, Sagen J, Whit-tam D, et al. (2019): Outcome prediction models in AQP4-IgG positive neuromyelitis optica spectrum disorders. *Brain* 142, 1310–1323
- Parratt JDE, Prineas JW (2010): Neuromyelitis optica: a demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes. *Mult Scler* 16, 1156–1172
- Patani R, Balaratnam M, Vora A, Reynolds R (2007): Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 277–287
- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006): Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165–3172
- Pittock SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG (2006): Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 63, 390–396
- Pittock SJ, Lennon VA, de Seze J, Vermersch P, Homburger HA, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Zéphir H, Moder K, Weinshenker BG (2008): Neuromyelitis optica and non organ-specific autoimmunity. *Arch Neurol* 65, 78–83
- Pittock SJ, Lennon VA, McKeon A, Mandrekar J, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, O’Toole O, Wingerchuk DM (2013): Eculizumab in AQP4-IgG-positive relapsing neuro-myelitis optica spectrum disorders: an open-label pilot study. *Lancet Neurol* 12, 554–562
- Popescu BFG, Lennon VA, Parisi JE, Howe CL, Weigand SD, Cabrera-Gómez JA, Newell K, Mandler RN, Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF (2011): Neuromyelitis optica unique area postrema lesions: nausea, vomiting, and pathogenic implications. *Neurology* 76, 1229–1237
- Prineas JW, Connell F (1979): Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5, 22–31
- Prineas JW, Barnard RO, Revesz T, Kwon EE, Sharer L, Cho ES (1993): Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions. *Brain* 116 (Pt 3), 681–693
- Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, Mandler RN, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF (2007): Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1194–1205
- Romijn HJ, van Uum JF, Breedijk I, Emmering J, Radu I, Pool CW (1999): Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 47, 229–236
- Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K, Jung S, Tsugu A, Matsuzawa K (1997): Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J*

Neurosurg 87, 420–430

Salzer JL (2015): Schwann Cell Myelination. Cold Spring Harb Perspect Biol 7, a020529

Salzer JL, Zalc B (2016): Myelination. Curr Biol 26, R971–R975

Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW (1999): Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. J Histochem Cytochem 47, 719–730

Sechi E, Morris PP, McKeon A, Pittock SJ, Hinson SR, Weinshenker BG, Aksamit AJ, Krecke KN, Kaufmann TJ, Jolliffe EA, et al. (2019): Glial fibrillary acidic protein IgG related myelitis: characterisation and comparison with aquaporin-4-IgG myelitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 90, 488–490

Soltys J, Liu Y, Ritchie A, Wemlinger S, Schaller K, Schumann H, Owens GP, Bennett JL (2019): Membrane assembly of aquaporin-4 autoantibodies regulates classical complement activation in neuromyelitis optica. J Clin Invest 129, 2000–2013

Son YJ, Thompson WJ (1995): Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. Neuron 14, 125–132

Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M (2019): Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. Physiol Rev 99, 1381–1431

Stassart RM, Fledrich R, Velanac V, Brinkmann BG, Schwab MH, Meijer D, Sereda MW, Nave K-A (2013): A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination. Nat Neurosci 16, 48–54

Stellmann JP, Krumbholz M, Friede T, Gahlen A, Borisow N, Fischer K, Hellwig K, Pache F, Ruprecht K, Havla J, et al. (2017): Immunotherapies in neuromyelitis optica spectrum disorder: efficacy and predictors of response. J Neurol Neurosurg Psychiatry 88, 639–647

Stevens B, Tanner S, Fields RD (1998): Control of Myelination by Specific Patterns of Neural Impulses. J Neurosci 18, 9303–9311

Talbott JF, Cao Q, Enzmann GU, Benton RL, Achim V, Cheng XX, Mills MD, Rao MS, Whittemore SR (2006): Schwann cell-like differentiation by adult oligodendrocyte pre-cursor cells following engraftment into the demyelinated spinal cord is BMP-dependent. Glia 54, 147–159

Tradtrantip L, Zhang H, Saadoun S, Phuan PW, Lam C, Papadopoulos MC, Bennett JL, Verkman AS (2012): Anti-aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuro-myelitis optica. Ann Neurol 71, 314–322

Wang K-C, Lee CL, Chen SY, Lin KH, Tsai CP (2011): Prominent brainstem symptoms/signs in patients with neuromyelitis optica in a Taiwanese population. J Clin Neurosci 18, 1197–1200

- Weinshenker BG (2007): Neuromyelitis optica is distinct from multiple sclerosis. *Arch Neurol* 64, 899–901
- Williams A, Piaton G, Lubetzki C (2007): Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis? *Glia* 55, 1300–1312
- Williams KC, Corey S, Westmoreland SV, Pauley D, Knight H, deBakker C, Alvarez X, Lackner AA (2001): Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J Exp Med* 193, 905–915
- Wingerchuk DM (2009): Neuromyelitis optica: effect of gender. *J Neurol Sci* 286, 18–23
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG (2003): Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology* 60, 848–853
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG (2012): The emerging relationship between neuro-myelitis optica and systemic rheumatologic autoimmune disease. *Mult Scler* 18, 5–10
- Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG (1999): The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53, 1107–1114
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG (2006): Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66, 1485–1489
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG (2007): The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 6, 805–815
- Winkler A, Wrzos C, Haberl M, Weil MT, Gao M, Möbius W, Odoardi F, Thal DR, Chang M, Opdenakker G, et al. (2021a): Blood-brain barrier resealing in neuromyelitis optica occurs independently of astrocyte regeneration. *J Clin Invest* 131, e141694
- Winkler A, Wrzos C, Haberl M, Weil M-T, Gao M, Möbius W, Odoardi F, Thal DR, Chang M, Opdenakker G, et al. (2021b): Blood-brain barrier resealing in neuromyelitis optica occurs independently of astrocyte regeneration. *J Clin Invest* 131, e141694
- Woodhoo A, Sahni V, Gilson J, Setzu A, Franklin RJM, Blakemore WF, Mirsky R, Jessen KR (2007): Schwann cell precursors: a favourable cell for myelin repair in the Central Nervous System. *Brain* 130, 2175–2185
- Yang DP, Zhang DP, Mak KS, Bonder DE, Pomeroy SL, Kim HA (2008): Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 38, 80–88
- Yao X, Su T, Verkman AS (2016): Clobetasol promotes remyelination in a mouse model of neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol Commun* 4, 42

Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SPJ, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, Young K, Goncharevich A, Pohl H, Rizzi M, et al. (2010): CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 6, 578–590

Zujovic V, Doucerain C, Hidalgo A, Bachelin C, Lachapelle F, Weissert R, Stadelmann C, Linington C, Evercooren ABV (2012): Exogenous Schwann Cells Migrate, Remyelinate and Promote Clinical Recovery in Experimental Auto-Immune Encephalomyelitis. *PLoS One* 7, e42667

---

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Brück und Frau Prof. Dr. Stadelmann-Nessler für die Möglichkeit der Dissertation am Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen bedanken. Auch gilt mein Dank Herrn Dr. Erik Bahn, der mich in meinem Praktikum angeleitet, mich motiviert und in mir das Interesse für die Neuropathologie geweckt hat. Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. von Deimling vom neuropathologischen Institut der Universität Heidelberg für die Möglichkeit des Mikroskopierens in den Räumlichkeiten seines Instituts bedanken.

Ganz besonders möchte mich bei Frau Prof. Dr. Stadelmann-Nessler für ihre exzellente Unterstützung im Rahmen des wissenschaftlichen Arbeitens bedanken. Für ihre Offenheit und ihre Hilfsbereitschaft bezüglich jeglicher aufkommenden Fragen bin ich sehr dankbar. Ihr Enthusiasmus für die Thematik und für die Hypothesen, die wir gemeinsam erörtert haben, waren auch in schwierigeren Zeiten immer eine Motivation weiterzumachen. Am meisten wusste ich die zwischenmenschliche Beziehung mit Frau Prof. Dr. Stadelmann-Nessler zu schätzen, die trotz der vielen Projekte, auch immer ein offenes Ohr für persönliche Themen hatte. Nicht nur, dass sie sich für mich als ihre Doktorandin einsetzte, außerdem unterstützt und motiviert sie Frauen in Führungspositionen in der Medizin. In dem Sinne möchte ich mich auch für ihr Engagement und ihre vorbildliche Funktion bedanken.