

Neurodegenerative und neuroinflammatorische Prozesse im kombinatorischen Tiermodell „CupEAE“ der Multiplen Sklerose

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Miriam Scheld, Master of Science Biologie

aus

Mechernich

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Ludwig
Univ.-Prof. Dr. hum. biol. Cordian Beyer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2019

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic-inflammatory and demyelinating disorder of the central nervous system (CNS). Histopathological alterations in the CNS of MS patients are on one hand due to neurodegenerative processes such as demyelination, loss of myelin-producing oligodendrocytes and axonal damage and on the other hand are caused by neuroinflammatory processes such as gliosis, the infiltration of peripheral immune cells and the production of inflammatory signaling molecules. The current view that MS etiology is primarily based on autoimmune processes (Outside-In hypothesis) has recently been questioned by the opposing Inside-Out hypothesis. It postulates that the first events in MS lesion formation are neurodegenerative processes. These processes in combination with an immune system that is genetically predisposed for autoimmune dysregulations might then lead to the development of active demyelinating neuroinflammatory lesions. To date, the progressive and degenerative aspect of the disease is not targeted by any therapy and most treatments solely ameliorate the inflammatory responses within the CNS.

In this dissertation results of experiments using a newly established combinatory MS animal model named "CupEAE" are shown. This model combines the advantages of both the primary demyelinating cuprizone model and the autoimmune-inflammatory EAE model. The neurodegenerative and neuroinflammatory processes, the signature of signaling molecules and the role of oxidative stress in primary lesion formation were analyzed in the CupEAE model by means of immunohistological staining, gene expression studies, protein and FACS analysis, as well as genome-wide Affymetrix Arrays.

Like the human MS, the CupEAE model is characterized by demyelination, axonal damage, gliosis and an immune cell infiltration into the forebrain, cerebellum and spinal cord. Pathological alterations of the glia limitans perivascularis as a part of the blood-brain barrier were observed. The signaling molecules LCN2, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 and IL6 were identified as possible players in lesion formation. With GFAP-specific KEAP1-KO mice it was shown that the astrocytic transcription marker NRF2 protected the CNS against cuprizone-mediated neurodegeneration. Furthermore, NRF2 seems to play a role in oligodendrocytic stress management.

In conclusion, the new combinatory CupEAE model displays more parallels to the human MS than either Cuprizone or EAE model. On the basis of the similarities with the human MS, the CupEAE model is very suitable for investigating the link between neurodegeneration and neuroinflammation. Our results provide evidence that CNS-mediated processes may be initially involved in MS lesion formation and therefore support the relevance of the Inside-Out theory for this scenario.

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche und demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Histopathologische Veränderungen im ZNS sind zum einen durch neurodegenerative Prozesse wie Demyelinisierung, Verlust von Oligodendrozyten sowie axonalen Schaden, charakterisiert. Zum anderen zeigen sich neuroinflammatorische Prozesse wie Gliose, Infiltration peripherer Immunzellen und eine Produktion entzündlicher Signalmoleküle. Die bisherige Sichtweise, dass der MS eine autoimmun-Ätiologie zu Grunde liegt (*Outside-In* Hypothese), wird durch die oppositionelle *Inside-Out* Hypothese in Frage gestellt. Diese besagt, dass erste pathologische Prozesse der Läsionsentstehung neurodegenerative Prozesse sind. Diese Prozesse in Kombination mit einer genetischen Prädisposition für autoimmun-Dysfunktionen könnten daraufhin zur Entstehung von aktiven, demyelinisierenden, neuroinflammatorischen Läsionen führen. Dieser progressive degenerative Aspekt der MS wird bislang mit keiner Therapie anvisiert und derzeitige Medikamente behandeln hauptsächlich die Immunantwort innerhalb des ZNS.

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse von Experimenten mit dem neu entwickelten kombinatorischen „CupEAE-Modell“ präsentiert. Dieses Modell kombiniert die Vorteile des toxisch-demyelinisierenden Cuprizon-Modells und des autoimmun-entzündlichen EAE-Modells. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen, Genexpressionsstudien, Protein- sowie FACS-Analysen und genomweiten *Affymetrix Arrays* wurde das CupEAE-Modell hinsichtlich der neurodegenerativen und neuroinflammatorischen Aspekte, des oxidativen Stress und vor allem der Signalmolekül-Signatur bei der Läsionspathogenese untersucht.

Vergleichbar mit der humanen MS ist das CupEAE-Modell durch Demyelinisierung, axonalen Schaden, ausgeprägte Gliose sowie Immunzellinfiltration in das Großhirn, Kleinhirn und Rückenmark charakterisiert. Es konnten ebenfalls pathologische Veränderungen der Glia limitans perivascularis, ein Teil der Blut-Hirn-Schranke (BHS), festgestellt werden. Des Weiteren wurden die Signalmoleküle LCN2, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 und IL6 als mögliche Spieler der Läsionspathogenese identifiziert. Mittels GFAP-spezifischer KEAP1-KO-Mäuse wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor NRF2 in Astrozyten gegen eine Cuprizon-vermittelte Neurodegeneration protegiert. Ebenfalls scheint NRF2 bei der oligodendrozytären Stressbewältigung eine Rolle zu spielen.

Zusammengefasst weist das kombinatorische Modell mehr Parallelen zur humanen MS auf als das Cuprizon- oder EAE-Modell alleine. Aufgrund seiner Eigenschaften eignet es sich besonders gut für die Erforschung der Zusammenhänge zwischen Neurodegeneration und Neuroinflammation. Die Ergebnisse der Experimente mit dem CupEAE-Modell liefern Hinweise, dass bei der initialen MS-Läsionspathogenese ZNS-ständige Prozesse involviert sind und unterstützen die Bedeutung der *Inside-Out* Theorie.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	III
Zusammenfassung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Prävalenz und Inzidenz	1
1.1.2 Genetik	1
1.1.3 Verlaufsformen	2
1.1.4 Medikamentöse Therapie	3
1.2 Stand der Forschung	5
1.2.1 Die Funktion der Gliazellen im zentralen Nervensystem	5
1.2.2 Histopathologie der Multiplen Sklerose	7
1.2.2.1 Läsionstypen	7
1.2.2.2 Autoimmunität	10
1.2.2.3 Oxidativer Stress als mögliche Komponente der Läsionspathogenese	10
1.2.3 Ätiologie der Multiplen Sklerose: <i>Outside-In</i> versus <i>Inside-Out</i> Theorie	12
1.2.4 Reparaturprozesse des zentralen Nervensystems	13
1.2.5 Tiermodelle in der Multiple Sklerose Forschung	15
1.3 Ziele der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere und Zelllinien	19
2.1.1 Versuchstiere	19
2.1.2 Zelllinien	19

2.2	Versuchsgruppen und methodischer Überblick der Experimente	20
2.2.1	Tierexperimente (<i>in vivo</i>)	20
2.2.1.1	Versuchsgruppen	20
2.2.1.2	Klinisches Scoring	22
2.2.1.3	Gewebeaufarbeitung	23
2.2.1.4	Methodischer Überblick	23
2.2.2	Zellkultur Experimente (<i>in vitro</i>)	25
2.2.2.1	Versuchsgruppen	25
2.2.2.2	Methodischer Überblick	26
2.3	Proteinbiochemische Methoden	27
2.3.1	Histochemische Färbungen	27
2.3.2	Immunhistochemische Färbungen	28
2.3.1	Fluoreszenzfärbungen	30
2.3.2	ELISA	30
2.4	Zellkultur	31
2.4.1	Behandlung der OLN93 Zellen und OCM Gewinnung	31
2.4.2	Assay für Zellviabilität und metabolische Aktivität	31
2.4.3	Behandlung der BV2 Zellen	32
2.4.4	Zellmorphologische Analysen: Bipolarität und Ramifikation	32
2.5	Molekularbiologie	33
2.5.1	RNA Isolation, reverse Transkription, PCR und RT-qPCR	33
2.5.2	<i>Affymetrix GeneChip® Array</i>	36
2.5.3	Chemokin- und Zytokin-Array	36
2.5.4	<i>In situ</i> Hybridisierung	37
2.6	Durchflusszytometrie und FACS	38
2.7	Statistik	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Analyse der Tiermodelle Cuprizon, EAE und CupEAE	40
3.1.1	Vergleichende Analyse des Cuprizon- und EAE-Modells	40
3.1.1.1	Klinischer Phänotyp	40
3.1.1.2	Mikrogliose und Astrogliose	41

3.1.1.3	Oligodendrozytenanzahl, Myelinstatus und axonaler Schaden	43
3.1.2	Charakterisierung des CupEAE-Modells vergleichend mit dem Cuprizon- und EAE-Modell	45
3.1.2.1	Klinischer Phänotyp	45
3.1.2.2	Mikrogliose und Astrogliose	46
3.1.2.3	Oligodendrozytenanzahl, Myelinstatus und axonaler Schaden	47
3.1.2.4	Infiltration peripherer Zellen in Kleinhirn und Rückenmark	48
3.1.2.5	Infiltration peripherer Zellen in das Großhirn	49
3.1.2.6	Charakterisierung der Infiltrate	51
3.1.2.7	Charakterisierung peripherer immunologischer Organe	51
3.1.2.8	Einfluss der Cuprizon-Intoxikation auf das Immunzellrepertoire	53
3.1.2.9	Zeitliche Korrelation der Neurodegeneration und Immunzellinfiltration	53
3.1.2.10	Zusammenfassender Vergleich des CupEAE-Modells zum Cuprizon-, EAE-Modell und zur humanen MS	55
3.2	Die Rolle von Signalmolekülen bei der Läsionspathogenese	56
3.2.1	Auswertung des genomweiten <i>Affymetrix Arrays</i>	56
3.2.2	Expression von Signalmolekülen <i>ex vivo</i> isolierter Mikroglia	57
3.2.3	Einfluss gestresster Oligodendrozyten auf Mikroglia	58
3.2.3.1	Genexpressionsprofil gestresster OLN93 Oligodendrozyten <i>in vitro</i>	58
3.2.3.2	Aktivierungsstatus der Mikroglia <i>in vitro</i>	60
3.2.3.3	Relevanz der Zellkulturexperimente für <i>in vivo</i> Studien	62
3.3	Oxidativer Stress und die Rolle von NRF2 bei der Läsionspathogenese	64
3.3.1	Die Rolle des oligodendrozytären NRF2-KEAP1-ARE-Systems bei Stressreaktionen	64
3.3.2	Die Rolle des astrozytären NRF2-KEAP1-Systems bei Stressreaktionen <i>in vivo</i>	65
4	Diskussion	67
4.1	Neurodegenerative Aspekte von Multiple Sklerose Läsionen	68
4.1.1	Demyelinisierung	68
4.1.2	Verlust von Oligodendrozyten	69
4.1.3	Axonaler Schaden	71
4.2	Neuroinflammatorische Aspekte von Multiple Sklerose Läsionen	73
4.2.1	Astrogliose und Mikrogliose	73
4.2.2	Immunzellinfiltration	75
4.2.3	Signalmoleküle	78

4.3	Oxidativer Stress	83
4.4	Störungen der Blut-Hirn-Schranke	85
4.5	Schlussfolgerungen	86
5	Literaturverzeichnis	88
	Danksagung	119
	Eidesstattliche Erklärung	120
	Appendix	XIX
	Modifiziert übernommene Abbildungen und Textpassagen	XIX
	Reagenzien	XIX
	Geräte und Materialien	XXIII
	Lösungen	XXV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der MS-Verlaufsformen	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> Experimente	21
Abbildung 4: Hierarchische Darstellung der <i>in vivo</i> Experimente	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> Experimente	25
Abbildung 6: Hierarchische Darstellung der <i>in vitro</i> Experimente	27
Abbildung 7: Auswertungsstrategie der Bipolarität und Ramifikation	32
Abbildung 8: Klinisches Scoring, Krankheitsbeginn und maximaler Score von Cuprizon- und EAE-Tieren	40
Abbildung 9: Analyse der Mikroglia Aktivierung in Corpus callosum, Kortex und Kleinhirn von Cuprizon- und EAE-Tieren	41
Abbildung 10: Analyse der Astrozyten Aktivierung in Corpus callosum von Cuprizon- und EAE-Tieren	42
Abbildung 11: Analyse der Demyelinisierung in Corpus callosum, Rückenmark und Kleinhirn von Cuprizon- und EAE-Tieren	43
Abbildung 12: Zellansammlung und axonaler Schaden in Cuprizon- und EAE-Tieren	44
Abbildung 13: Klinisches Scoring, Krankheitsbeginn und maximaler Score von EAE- und CupEAE-Tieren	45
Abbildung 14: Analyse der Mikrogliose und Astrogliose in Corpus callosum, Kortex und Kleinhirn von CupEAE-Tieren	46
Abbildung 15: Analyse der Demyelinisierung und des axonalen Schadens in Corpus callosum, Rückenmark und Kleinhirn von CupEAE-Tieren	48
Abbildung 16: Analyse der Immunzellinfiltration im Rückenmark und Kleinhirn von CupEAE-Tieren	49
Abbildung 17: Analyse der Immunzellinfiltration im Großhirn von CupEAE-Tieren	50
Abbildung 18: Charakterisierung der PVCs im Großhirn von CupEAE-Tieren	52
Abbildung 19 Analyse der PVCs im Gehirn der AT-Experimente	54
Abbildung 20: <i>Affymetrix Array</i> Analyse der untersuchten Tiermodelle	56
Abbildung 21 FACS Analysen <i>ex vivo</i> isolierter Mikrogliazellen	58

Abbildung 22: Analyse der Zytokin und Chemokin Expression gestresster Oligodendrozyten	59
Abbildung 23: Analyse der Wirkung von OCM auf Mikrogliazellen.....	61
Abbildung 24: <i>In vivo</i> Lokalisation des Zytokins IL6 mittels ISH und Immunfluoreszenz.....	63
Abbildung 25 <i>In vivo</i> Analyse des Zytokins IL6 mittels Doppel-IHC.....	64
Abbildung 26: Analyse der Rolle von NRF2 in gestressten Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	66
Abbildung 27: Hierarchische Darstellung der Hauptaspekte von MS-Läsionen.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Primärantikörper, Sekundärantikörper und Sonden bei immunhistochemischen Färbungen, Fluoreszenzfärbungen und <i>in situ</i> Hybridisierungen mit entsprechendem Wirt in dem die Antikörper hergestellt wurden, der eingesetzten Konzentration sowie Bestellnummer und Hersteller.....	29
Tabelle 2: Bei Genexpressionsstudien verwendete Primersequenzen und die T _a . m = Maus, r = Ratte	35
Tabelle 3: Konjugierte Antikörper mit Wirt und Klon, die bei durchflusszytometrischen Analysen eingesetzt wurden.	39
Tabelle 4: Zusammenfassender Vergleich der verwendeten MS-Tiermodelle Cuprizon, EAE und CupEAE hinsichtlich der untersuchten Parameter mit der humanen MS. Grün = ist ein Kennzeichen dieser Erkrankung/dieses Modells, rot = ist kein Kennzeichen dieser Erkrankung/dieses Modells.....	55

Abkürzungsverzeichnis

μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
A. dest.	Aqua destillata
ACOD1	Aconitate decarboxylase 1
aIL6	Anti-IL6 Antikörper
AMCase	Acidic mammalian chitinase
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APC	Allophycocyanin (nur Kapitel 2.6 und Tabelle 3)
APC	Anti-adenomatus polyposis coli
APP	Amyloid precursor protein
AQP4	Aquaporin-4
ARE	Antioxidant response element
ARG1	Arginase 1
AT	Adoptiver Transfer
ATF3	Cyclic AMP-dependent transcription factor 3
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CC	Corpus callosum
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of differentiation

cDNA	Complementary DNA
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CNPase	2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
COX2	Cyclooxygenase-2
CSF1	Colony stimulating factor 1
CTB	CellTiter-Blue®
Cup	Cuprizon
CXCL	CXC-Chemokin Ligand
CXCR	CXC-Chemokin Rezeptor
CycloA	Cyclophilin A
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDIT3	DNA damage-inducible transcript 3
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated-cell sorting
FCRL5	Fc receptor-like 5, scavenger receptor
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FITC	Fluorescein isothiocyanate

FKS	Fötales Kälberserum
FOXP3	Forkhead-box-protein P3
FSC	Forward scatter
FSC-H	Forward scatter-hight
FSH-A	Forward scatter-area
G	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung als Maß der Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
GCLC	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GDF15	Growth differentiation factor 15
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde(n)
H2-Q8	Histocompatibility 2, Q region locus 8
HBSS	Hank's balanced salt solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA-DR	Human leukocyte antigen - DR isotype
HMOX1	Heme oxygenase 1
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
HRP	Horseradish peroxidase
IBA1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFF	Immunofluorescence anti-fading agent
IFN	Interferon
IGF1	Insulin-like growth factor 1

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IL12R β 1	Interleukin-12 Rezeptor Untereinheit beta-1
IL1RN	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
ISG20	Interferon-stimulated exonuclease gene 20
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
KEAP1	Kelch-Like ECH-associated protein 1
kg	Kilogramm
LCN2	Lipocalin-2
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LFB-PAS	Luxol fast blue/periodic acid Schiff
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	Lymphocyte antigen 6C
M	Stoffmengenkonzentration (mol/L)
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin basic protein
MHC	Major histocompatibility complex
miRNA	microRNA
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney murine leukemia virus

MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MRC1	Mannose Receptor 1
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
mtDNA	mitochondriale DNA
NAMW	Normal appearing white matter
ng	Nanogramm
NOS2	Inducible nitric oxide synthase 2
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) 1
Nr1h3	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
NRF2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
ns	Nicht signifikant
OCM	Oligodendrocyte-conditioned medium
OLIG2	Oligodendrocyte transcription factor 2
P2ry12	P2Y purinoceptor 12
PB	Pacific blue (3-Carboxy-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PIM1	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase 1
PLP	Proteolipid protein 1
PTX	Pertussis Toxin
PVC	Perivaskulärer Cuff

RAB20	Ras-related protein Rab-20
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RSC	Rapid sample concentrator
RT-qPCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
s	Sekunde(n)
SA	Sodiumazid
SATO	SATO Medium nach Bottenstein und Sato 1979 [1]
SHH	Sonic hedgehog
SJL	Swiss Jim Lambert
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
SSC	Sideward scatter
STAT-6	Signal transducer and activator of transcription 6
T	Tag(e)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TGF	Transforming growth factor
Th1	Typ-1-T-Helferzelle
Th17	IL17-produzierende T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFRSF12a	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1
UK	Uniklinik
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A

Veh	Vehikel
WT	Wildtyp
YM1	Chitinase-like 3
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Prävalenz und Inzidenz

Die Multiple Sklerose (MS) oder auch Encephalomyelitis disseminata ist eine chronisch-inflammatorische, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Anzahl aller Erkrankten weltweit wird auf ca. 2,5 Millionen geschätzt, wobei erste Symptome vor allem bei jungen Frauen zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr festgestellt werden [2]. Mit einer Prävalenz von 250 Erkrankten auf 100.000 Einwohner in Deutschland (Stand 2014) ist die MS neben der Epilepsie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter [3,4]. Laut aktuellen Forschungsergebnissen beläuft sich die Inzidenz in Deutschland auf 13 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und ist damit höher als bisher angenommen [5]. Die nördlichen USA, Kanada und Nordeuropa haben die höchste Inzidenz und Prävalenz weltweit [6].

1.1.2 Genetik

Über lange Zeit wurde beobachtet, dass blutsverwandte Familienmitglieder von MS-Patienten ein erhöhtes Erkrankungsrisiko haben. Bislang sind über 100 Gen-Loci identifiziert worden, deren Mutationen mit einer erhöhten Anfälligkeit an MS zu erkranken in Zusammenhang gebracht worden sind [7]. Die Wahrscheinlichkeit spontan an MS zu erkranken liegt bei 0,1 % [8]. Bei einem eineiigen Zwilling eines an MS-erkrankten Patienten beträgt das Risiko ebenfalls an MS zu erkranken bereits 25 % [8]. Dies ist ein starker Hinweis auf eine erhebliche erbliche Komponente der MS. Genomweite Assoziationsstudien haben gezeigt, dass vor allem Mutationen in antigenpräsentierenden Genen in der *major histocompatibility complex* (MHC)-Region eine große Rolle bei der genetischen Prädisposition spielen [9]. Darunter wurde der MHC-II-Rezeptor *Human leukocyte antigen - DR isotype* (HLA-DR) identifiziert, der auf der Zellmembran von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird und für die Aktivierung von Lymphozyten, vor allem T-Zellen, verantwortlich ist [10,11]. Kürzlich berichteten Wang und Kollegen einen Zusammenhang zwischen dem Gen *Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3* (*NR1H3*) und einem erhöhten Risiko an progredienter MS zu erkranken [12]. Dieses Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen der Inflammation und des angeborenen Immunsystems reguliert [13,14]. Eine Erbkrankheit ist dadurch definiert, dass sie schon zu Anfang durch untypisch veränderte Gene ausgelöst wird und von den Vorfahren auf ihre Nachkommen übertragen wird. Trotz der starken Assoziation von *HLA-DR*-Genmutationen mit dem

EINLEITUNG

gesteigerten Risiko an MS zu erkranken, zählt man die MS nicht zu den genetisch-vererbbaaren Erkrankungen. Zusammen mit multifaktoriellen Umwelteinflüssen trägt die genetische Prädisposition dennoch zur MS-Pathogenese bei.

1.1.3 Verlaufsformen

Der bisherige Goldstandard einer MS Diagnose stellen die McDonald-Kriterien von 2001 dar, die bisher im Jahr 2005, 2010 und 2017 überarbeitet wurden [15-18]. Dabei wird erstens die Verbreitung der Läsionen in unterschiedlichen ZNS Regionen und zweitens die zeitliche Akkumulation der Läsionen bewertet [18]. Man unterscheidet drei verschiedene Verlaufsformen der MS: die schubförmig-remittierende, die primär progrediente und die sekundär progrediente MS (Abbildung 1) [19]. Die häufigste ist die schubförmig-remittierende Verlaufsform, bei der die Betroffenen Phasen mit akuten entzündlichen Schüben durchleiden. Ein Schub wird als Auftreten klinischer Symptome definiert, die mindestens 24 h lang anhalten und aus inflammatorisch-demyelinisierenden Läsionen im ZNS resultieren [20]. Je nach Lokalisation des Entzündungsherdes treten Symptome wie Sehstörungen, Sensibilitätsstörungen und Taubheitsgefühle auf. Die im Rahmen der Schübe auftretenden Symptome können sich vollständig oder teilweise zurückbilden („remittieren“) oder aber weiterbestehen. Bei einem Großteil der Patienten remittieren die Symptome jedoch nicht vollständig. Als Folge akkumulieren die neurologischen Dysfunktionen und wirken sich negativ auf das Fortschreiten der Erkrankung aus [21]. Es wird vermutet, dass eine hohe Frequenz, die Lokalisation, der Schweregrad und die Regenerationspotenz von Schüben im frühen Krankheitsverlauf die Zunahme der körperlichen Einschränkungen maßgeblich beeinflussen [22-24]. Bei etwa der Hälfte aller schubförmig-

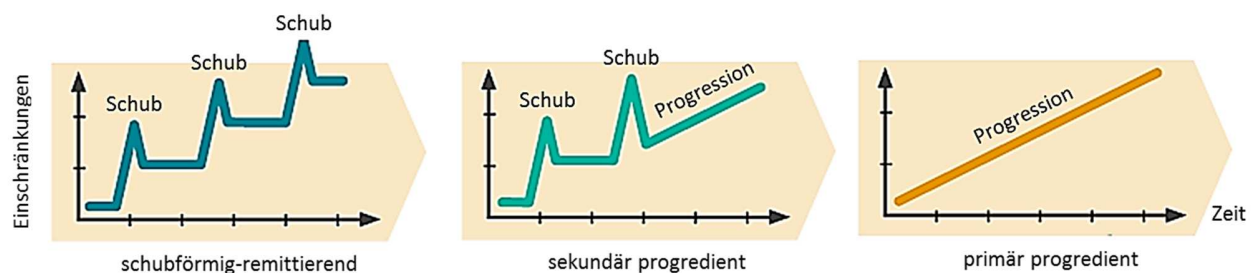


Abbildung 1: Schematische Darstellung der MS-Verlaufsformen

Die linke Grafik zeigt den Verlauf der schubförmig-remittierenden Verlaufsform, die durch inflammatorische Schübe charakterisiert ist. Die mittlere Grafik beschreibt die sekundär progrediente Verlaufsform. Nach einer Phase mit Schüben lassen diese nach und der Verlauf ist progredient. Die rechte Grafik zeigt die primär progrediente Verlaufsform, bei der die Erkrankung progredient ohne Schübe fortschreitet.

EINLEITUNG

remittierenden MS-Erkrankten lässt die Schubhäufigkeit im Krankheitsverlauf nach, und die Erkrankung geht nach durchschnittlich 10 Jahren in die sekundär-progrediente Verlaufsform über [25].

Nur ca. 10 % aller MS-Patienten erkranken an der primär-progredienten Verlaufsform, die eher um das 40. Lebensjahr auftritt [19,26]. Beide progredienten Verlaufsformen sind durch chronisch-progressive neurologische Defizite charakterisiert, die sich nicht wieder zurückbilden. Beispiele sind Dysphagie, Ataxie, Dysarthrie, Fatigue und depressive Störungen, die im täglichen Leben der Patienten zu erheblichen Einschränkungen führen. Die Fatigue sowie Störungen der Blasenfunktion und des motorischen Systems beeinträchtigen den Alltag der Patienten am meisten [27,28]. Anders als bei der sekundär progredienten Verlaufsform kommt es bei der primär progredienten Verlaufsform in der Regel nicht zu inflammatorischen Schüben. Die Lebenserwartung bei MS-Patienten mit milderer Behinderungen liegt nicht unter der von Nichterkrankten vergleichbaren Alters [29,30]. Dennoch sind kardiovaskuläre oder pulmonale Komplikationen oder Infektionen aufgrund des medikamentös-geschwächten Immunsystems Gründe für vorzeitige Todesfälle bei MS-Patienten [31].

1.1.4 Medikamentöse Therapie

Die Therapie der MS ist in den Leitlinien der medizinischen Fachgesellschaften, wie der *European Academy of Neurology*, dem *European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis* oder der zur Zeit in Überarbeitung befindlichen Leitlinie der „Deutschen Gesellschaft für Neurologie“ ausführlich beschrieben [4,32]. Bei der medikamentösen Therapie der schubförmig-remittierenden MS unterscheidet man die Basis-, Schub- oder Eskalationstherapie. Bei der Basistherapie werden wiederkehrend Immunmodulatoren verabreicht, die das Auftreten von Schüben verhindern können. Immunmodulatoren können entweder immunsuppressiv oder nicht immunsuppressiv wirken. Beispiele für nicht immunsuppressive Immunmodulatoren sind die Wirkstoffe Beta-Interferon (β -IFN) (Avonex[®], Betaferon[®], Extavia[®], Rebif[®]) und Glatirameracetat (Copaxone[®]) [33]. Zum einen hindert es Leukozyten daran, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu durchdringen [34,35]. Zum anderen erhöhen β -IFN die Expression antiinflammatorischer Zytokine, wie IL10, und erniedrigen die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie IL17 [36-39]. Über antiinflammatorische Zytokine bewirkt β -IFN, dass die Antigenpräsentation von Makrophagen gehemmt und dadurch die T-Zell-Differenzierung inhibiert wird [40]. Somit werden die Schubfrequenz und das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt [41,42]. Glatirameracetat vermindert ebenfalls die Anzahl der Schübe und somit die Entzündungsreaktionen im ZNS, jedoch nicht die fortschreitende Neurodegeneration [43]. Der Wirkmechanismus hierbei ist bis heute noch nicht vollständig geklärt.

EINLEITUNG

Ein akuter Schub wird durch die Gabe von Glucocorticoiden, wie Methylprednisolon (z.B. Advantan®, Metypred®, Metysolon®), behandelt und als Schubtherapie bezeichnet. Dadurch werden indirekt inflammatorische Gene reguliert und somit antiinflammatorische Prozesse eingeleitet [44]. Obwohl diese Therapieform sehr effektiv bei aktiven Schüben wirkt, scheint sie keinen positiven Einfluss auf die langfristigen Defizite zu haben [45,46]. Wenn Glucocorticoide keine Wirkung zeigen, ist die Plasmapherese eine weitere Behandlungsoption während schwerer akuter Schübe. Durch eine Isolation von Plasma aus dem Blut werden Antikörper und Lymphozyten unspezifisch entfernt, die bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielen. Um den dadurch entstandenen Flüssigkeits- und Eiweißmangel auszugleichen, wird das Plasma durch eine Substitutionslösung ersetzt. Sie simuliert das körpereigene Plasma und setzt sich aus Elektrolyten, Puffersubstanzen und etwa 5 % Albumin oder Frischplasmakonzentraten zusammen [47].

Kommt es zu einem schnellen Fortschreiten der neurologischen Defizite, ist eine Eskalationstherapie indiziert. Dies umfasst die Behandlung mit immunsuppressiv wirkenden Immunmodulatoren wie beispielsweise dem Sphingosin-1-Phosphat-Analogon Fingolimod (Gilenya®), dem monoklonalen Antikörper Natalizumab (Tysabri®) oder dem zytostatischen Antibiotikum Mitoxantron (Ralenova®) [48-50]. Sie dämpfen Entzündungsreaktionen im ZNS, indem durch Bindung des phosphorylierten Fingolimod an Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren der Austritt der Lymphozyten aus den lymphoiden Organen gehemmt, der Eintritt von Lymphozyten in das ZNS durch Bindung von Natalizumab an Integrine blockiert oder aber die Vermehrung von Lymphozyten und Makrophagen durch Interkalation in die *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) gehemmt wird. Im Gegensatz zu Immunmodulatoren, die nicht immunsuppressiv wirken, ist das Risiko für Infektionen und Krebserkrankungen bei Therapien mit immunsuppressiven Modulatoren erhöht [51,52].

Patienten mit progredienten Verlaufsformen sprechen meist nicht auf eine Basis-, Eskalations- oder Schubtherapie an, da diese hauptsächlich auf eine Reduktion der Inflammation im ZNS ausgerichtet sind. Auf die vorherrschende Neurodegeneration, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit den inflammatorisch-demyelinisierenden Läsionen steht und zu großen Teilen ursächlich für die Atrophie von grauer Substanz ist, haben diese Medikamente keinen oder nur wenig Einfluss [53,54]. Auch die für die primär progrediente MS zugelassenen monoklonalen Immunsuppressiva Rituximab (Rituxan®) und seit 2017 Ocrelizumab (Ocrevus®) können die fortschreitende Neurodegeneration nicht aufhalten. Beide zielen darauf ab, *Cluster of Differentiation* (CD) 20-positive B-Zellpopulationen zu eliminieren. Der Wirkstoff Siponimod von Novartis Pharma zeigte kürzlich erste Erfolge bei der Therapie der sekundär progredienten MS und hemmt wie auch Fingolimod als Antagonist des Sphingosin-1-Phosphatrezeptors die Migration von Lymphozyten aus primären lymphatischen Organen zum Entzündungsherd [55]. Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist die Ätiologie der MS bis heute nur unzureichend geklärt und bislang ist kein

EINLEITUNG

Medikament verfügbar, das die fortschreitende Neurodegeneration aufhält. Bis dato ist die MS daher zwar eine behandelbare, jedoch unheilbare Erkrankung.

1.2 Stand der Forschung

1.2.1 Die Funktion der Gliazellen im zentralen Nervensystem

Gliazellen stellen das Stützgewebe des ZNS dar und lassen sich in Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia unterteilen. Oligodendrozyten umhüllen mehrere axonale Fortsätze der Neurone mit einer mehrlagigen Myelinschicht (Abbildung 2) und sorgen somit für eine schnelle Weiterleitung der neuronalen Aktionspotentiale. Mit einer Membranfläche von $5 - 50 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ haben Oligodendrozyten einen sehr aktiven Metabolismus, sodass die Instandhaltung im adulten Gehirn eine konstant hohe Austauschrate dieser Zellen erfordert [56]. Um diese aufrecht zu erhalten, gibt es im ZNS ein großes Proliferationspotential von Oligodendrozyten. Die Migration, Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozyten wird von Astrozyten und Mikroglia beeinflusst. Je nach Aktivierungsstatus der Gliazellen erfolgt eine inhibitorische oder fördernde Reaktion auf die Oligodendrozytenentwicklung. Nach einem Aktivierungsstimulus differenzieren sich Oligodendrozyten aus Vorläuferzellen, deren Ursprung sich überall im ZNS befindet, wie beispielsweise in der Subventrikularzone, homogen im ZNS in der grauen und weißen Substanz verteilt oder neben dem Zentralkanal im Rückenmark [57-60]. Lange Zeit wurden Oligodendrozyten lediglich als passiv betroffene Zellen während einer Demyelinisierung betrachtet. Es mehren sich jedoch seit gut 20 Jahren

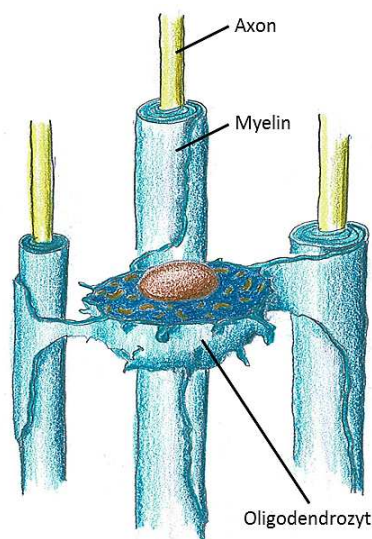


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten

Ein Oligodendrozyt, dargestellt mit seinem Zellkern und Organellen, umwickelt nahegelegene Axone mit Myelin.

EINLEITUNG

Hinweise, dass sie aktiv neuroinflammatorische Prozesse modulieren und die Regeneration fördern können. So wurde gezeigt, dass sie eine Vielzahl von immunregulatorischen Faktoren produzieren [61,62]. Beispiele hierfür sind MHC-I Moleküle, Glutamat-Rezeptoren, Zytokine und Hitzeschockproteine. Zu den von Oligodendrozyten produzierten Zytokinen gehören ebenfalls Chemokine und ihre Rezeptoren, wie beispielsweise CXC-Ligand 10 (CXCL10), CC-Ligand 2 (CCL2), CCL3, CCL5, CXC-Rezeptor 3 (CXCR3), CXCR6, die Tumornekrosefaktor (TNF) Familie sowie Interleukine (IL) und ihre Rezeptoren. Dadurch können Oligodendrozyten Signale von anderen Zellen wahrnehmen, darauf reagieren und eigenständig Signale aussenden. Oligodendrozyten haben neben der Isolierungsfunktion ebenfalls eine mechanische Schutzfunktion und metabolische Unterstützungsfunktion für Neurone [63,64]. Es ist daher denkbar, dass Schäden am Myelin nicht nur zur gestörten Erregungsweiterleitung, sondern auch zu Integritäts- und metabolischen Störungen von Axonen führen können.

Astrozyten versorgen unter anderem Neurone mit Nährstoffen und regulieren die Beseitigung der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt. Mit ihren Fortsätzen umhüllen sie nahezu die gesamte Mikrovaskulatur des ZNS und sind somit Teil der BHS. Diese kontrolliert und reguliert streng den Stoffaustausch und die Zellmigration in das Gehirn und Rückenmark. Unter physiologischen Bedingungen gelangen regelmäßig periphere Immunzellen in das ZNS [65]. Dieser Prozess wird als Immun-Überwachung bezeichnet [65]. Auf zellulärer Ebene besteht die BHS aus Perizyten, Endothel, Basalmembran und astrozytären Fortsätzen. Die Perizyten leisten physikalische Unterstützung für die Endothelzellen und produzieren Wachstumsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix, um die BHS aufrecht zu erhalten. Durch die Expression von Anker molekülen in der endothelialen Membran und der astrozytären Glia limitans perivascularis wird eine enge Interaktion der beiden Zelltypen gewährleistet. Ein Beispiel hierfür ist Aquaporin-4 (AQP4), das durch den Dystrophin-Dystroglycan Komplex in der Astrozytenmembran verankert ist und den Einfluss von Wasser durch die BHS reguliert [66]. Schon bei geringen Störungen der extrazellulären Flüssigkeits-Homöostase kommt es zu phänotypischen Veränderungen der Astrozyten, die als reaktive Astroglie bezeichnet wird. Charakteristika der Astroglie sind eine Hypertrophie der Somata und Fortsätze sowie die Induktion der Expression von Intermediärfilamenten, wie beispielsweise dem *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). In stark demyelinisierten Bereichen kann es sogar zur Narbenbildung kommen, wenn Myelin-Reparaturmechanismen versagen [67,68]. Viele ZNS Pathologien, wie auch die MS, sind durch Veränderungen und Beeinträchtigungen der Mikrovaskulatur charakterisiert. Schon in frühen MS-Läsionen wurden Anomalitäten in *Junction*-Proteinen mit einhergehender perivaskulärer Astroglie festgestellt [69].

Mikroglia sind die Hauptkomponente des Immunsystems im ZNS und suchen ihre Umgebung permanent nach pathologischen Veränderungen ab. Als Gehirnmakrophagen haben sie eine phagozytierende Funktion.

EINLEITUNG

Sie entfernen toxische, von verletzten Neuronen-sezernierte, Faktoren sowie zelluläre Zerfallsprodukte (Debris) und unterstützen die Neurogenese und die Synapseneliminierung [70-73]. Bei einer Aktivierung ziehen sie ihre Fortsätze zurück, nehmen eine amöboide Form an und sekretieren je nach Aktivierungsstatus pro- oder antiinflammatorische Signalmoleküle. Wird eine potentiell pathologische Gefahr erkannt, migrieren aktivierte Mikroglia zum Verletzungsherd und proliferieren [74]. Sie induzieren Oberflächenmarker wie MHC-II, CD40 und *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), die wichtig für die Präsentation von Antigenen auf ihrer Oberfläche für Effektorimmunzellen sind [75,76]. Ein weiteres Merkmal ist die Sekretion von neurotoxischen Molekülen, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), und proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen. Diese locken Immunzellen aus den Blutgefäßen an, welche daraufhin pathogene Krankheitserreger abtöten. Als proinflammatorische Immunzellen können Mikroglia somit negative Effekte auf andere Gliazellen und Neurone in ihrer Umgebung haben und zur weiteren Inflammation beitragen. Abgesehen vom proinflammatorischen Aktivierungsstatus können Mikroglia ebenfalls einen antiinflammatorischen Phänotyp annehmen, um beispielsweise Gewebereparaturen einzuleiten und Neurone durch die Sekretion antiinflammatorischer Faktoren zu unterstützen [77,78].

1.2.2 Histopathologie der Multiplen Sklerose

1.2.2.1 Läsionstypen

Läsionen im Nervengewebe bei MS-Erkrankten sind meist im Hirnstamm, Kleinhirn, der periventrikulären weißen Substanz und dem Rückenmark zu finden, wobei Läsionen im Rückenmark meist weniger inflammatorisch aktiv sind als die im Großhirn und Hirnstamm [79,80]. Im Rückenmark befinden sich Läsionen in der weißen Substanz zumeist in zervikalen Abschnitten, während Läsionen in der grauen Substanz weit verstreut im gesamten Rückenmark zu finden sind [81]. Weiterhin sind Läsionen in der grauen Substanz oft im zerebralen Kortex [82], aber auch im Gyrus cinguli [83] und im Hippocampus vorzufinden [84]. Sie sind mit einer Gehirnatrophie sowie körperlicher und geistiger Einschränkung assoziiert [85,86] und können in subpiale, intrakortikale und leukokortikale Läsionen eingeteilt werden [87].

Abhängig von der Histopathologie können verschiedene Typen von Läsionen unterschieden werden: aktive, chronisch aktive und chronisch inaktive Läsionen. Neurodegenerative Aspekte, wie der axonale Schaden und die Demyelinisierung, und neuroinflammatorische Faktoren, wie die Infiltration von Makrophagen, T- und B-Zellen, sind in den verschiedenen Läsionstypen unterschiedlich ausgeprägt. Aktive Läsionen der weißen Substanz sind meist bei Patienten mit schubförmig-remittierender Verlaufsform zu finden und zeichnen sich durch hyperzelluläre und demyelinisierte Plaques aus. Diese Plaques sind von aktivierten

EINLEITUNG

Astrozyten, Mikrogliazellen und Myelin-gefüllten Makrophagen infiltriert [88]. Während kleinere Myelinproteine, wie beispielsweise die *2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase* (CNPase) oder das *Myelin-associated glycoprotein* (MAG), schnell abgebaut werden, findet die Degradation von großen Myelinproteinen, wie beispielsweise das *Proteolipid protein* (PLP) oder das *Myelin basic protein* (MBP), langsam statt. Anhand der unterschiedlichen Zusammensetzung der Myelin-Degradationsprodukte in den Makrophagen kann festgestellt werden, ob es sich um eine eher neue oder fortgeschrittene Läsion handelt [89]. Pathologische Veränderungen der BHS erleichtern peripheren Immunzellen den Zugang in das ZNS und wirken sich schädlich auf Oligodendrozyten aus [90]. Eine geschädigte BHS kann in aktiven Läsionsherden mit Hilfe des Kontrastmittels Gadopentetat-Dimeglumin, vereinfacht als „Gadolinium“ bezeichnet, in der Magnetresonanztomographie (MRT) sichtbar gemacht werden [91]. Bei einer dysfunktionalen BHS wurden neben aktivierten Makrophagen und Gliazellen weiterhin perivaskuläre sowie parenchymale inflammatorische Infiltrate gefunden, deren Bestandteil zum Großteil CD8-positive zytotoxische T-Zellen sind, aber auch CD4-positive T-Helferzellen, B-Zellen und Plasmazellen beinhalten [92-94]. Der Anteil verschiedener Immunzellen innerhalb einer Läsion variiert hierbei je nach Verlaufsform der Erkrankung.

Lucchinetti und Kollegen stellten fest, dass aktive Läsionen eine große Heterogenität aufweisen und in vier verschiedene immunologische Muster, *Pattern I – IV*, unterteilt werden können [95]. Bei dieser Einteilung wird der Myelin- und Oligodendrozytenverlust, das Ausmaß und die Topographie der Plaques, Myelinreparaturprozesse (Remyelinisierung), Komplementaktivierung und die Ablagerung von Immunglobulinen in der weißen Substanz klassifiziert. In 15 % der Gewebebiopsien fanden die Autoren das *Pattern I*. Dieses Muster zeichnet sich durch den Verlust aller Myelinkomponenten, eine hohe Inzidenz von Remyelinisierungsplaques und das Fehlen von Immunglobulinablagerungen sowie der Komplementaktivierung aus. Das *Pattern II* fanden Lucchinetti und Kollegen in 58 % der Gewebebiopsien. Es unterscheidet sich dahingehend vom *Pattern I*, dass der Verlust der Myelinkomponenten mit Immunglobulinablagerungen und einer Komplementaktivierung assoziiert ist. Der vom Komplementsystem-opsonisierte Myelindebris wird von Makrophagen phagozytiert. In 26 % der Gewebebiopsien fanden die Autoren *Pattern III* Läsionen. Hier fällt ein spezifischer periaxonaler Verlust von Myelinbestandteilen, wie beispielsweise CNPase und MAG sowie ein markanter Verlust von Oligodendrozyten am Rand der aktiven Läsion auf. Weder Remyelinisierungsplaques, Immunglobulinablagerungen noch die Aktivierung des Komplementsystems konnten hier festgestellt werden. *Pattern IV* Läsionen sind eher selten und wurden von Lucchinetti und Kollegen in nur 1 % der Gewebebiopsien gefunden. Das Sterben der Oligodendrozyten am Rand der aktiven Läsion ist hierbei nicht Apoptose-vermittelt. Das Ausmaß der Demyelinisierung in aktiven Läsionen geht nicht immer mit dem gleichen Ausmaß an axonalem Schaden einher. Dieser kann durch eine Schwellung des Axons oder einer Akkumulation des *Amyloid precursor protein* (APP) festgestellt werden.

EINLEITUNG

Das Ausmaß des axonalen Schadens in der aktiven Läsion korreliert hierbei mit der Anzahl an Lymphozyten und aktivierten Mikrogliazellen, die toxische und inflammatorische Immunmodulatoren in direkter Nähe von geschädigten Axonen sekretieren [96-98]. Man geht davon aus, dass akute Schübe die Pathologie einer aktiven Läsion widerspiegeln [95,99-101]. Je nach Lokalisation der aktiven Läsionen variiert das Erscheinungsbild der klinischen Symptomatik.

Chronisch aktive Läsionen in der weißen Substanz sind vor allem bei Patienten mit progredienter Verlaufsform zu finden. Pathologische Merkmale dieses Läsionstyps sind eine vollständige Demyelinisierung mit einem Verlust von Oligodendrozyten und Axonen, einer ausgeprägten Astroglie, jedoch wenig Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen [99]. Auffällig ist eine sehr geringe oder keine Schädigung der BHS trotz inflammatorischer Prozesse [92,102]. Diese Dissoziation von BHS Schädigung und infiltrierten Immunzellen könnte ein Hinweis auf Reparaturmechanismen der BHS sein, bei denen Immunzellen aufgrund geschlossener BHS im ZNS Gewebe zurückbleiben [88]. Chronisch aktive Läsionen gehen mit der Zeit in chronisch inaktive Läsionen über. Sie sind durch einen Rückgang von Makrophagen und Mikrogliazellen und somit durch eine Hypozellularität charakterisiert. Weiterhin füllen Astrozyten demyelinisierte Bereiche mit glialen Fasern aus, sodass eine Glia-Narbe entsteht. Die axonale Dichte ist im Läsionsbereich bis zu 80 % reduziert [92,103].

Neben den klassischen Läsionstypen wurden zudem Auffälligkeiten in der *Normal appearing white matter* (NAWM) gefunden. Es wurde ein axonaler Schaden festgestellt, der sich scheinbar unabhängig von dem in demyelinisierten Läsionen entwickelt sowie eine verringerte Myelindichte, eine chronisch fibrilläre Glie und das Vorhandensein von Makrophagen [54,104,105]. Eine weitere Auffälligkeit in der NAWM sind Cluster von HLA-DR, CD68- und Benzodiazepin Rezeptor-positiver Mikrogliazellen. Diese Cluster werden als präaktive Läsionen bezeichnet. Sie konnten von Banati und Kollegen durch Visualisierung des Benzodiazepin Rezeptors mittels Positronen-Emissions-Tomographie-Analysen nachgewiesen werden [106]. Weitere Charakteristika präaktiver Läsionen sind ihre Nähe zur Mikrovaskulatur, die perivaskuläre und intravaskuläre Ansammlung CD45- und HLA-DR-positiver Lymphozyten in der Mikrovaskulatur sowie fehlende Anzeichen einer Demyelinisierung [107]. Im Gegensatz zu aktiven Läsionen sind bei präaktiven Läsionen weder Veränderungen der BHS noch hypertrophe Astrozyten, Astroglie, Demyelinisierung oder Immunzellinfiltration festzustellen [108,109]. In manchen dieser Läsionen findet man „schaumige“ (engl. *foamy*) Makrophagen, die auf eine alternative Aktivierung schließen lassen, sprich einer Herunterregulation der Inflammation und auf ein Einleiten von Reparaturmechanismen [107,109]. Es fällt auf, dass sich solche präaktiven Läsionen hauptsächlich in der Nähe von gestressten Oligodendrozyten in der NAWM befinden [109]. Anzeichen von Stress und Aktivierung von Oligodendrozyten im Bereich präaktiver Läsionen wurden zum einen anhand einer selektiv erhöhten Expression des Apoptose Markers α B-Crystallin [110] und zum

EINLEITUNG

anderen anhand einer Aktivierung des *Signal transducer and activator of transcription 6* (STAT-6) Signalwegs in Oligodendrozyten festgestellt [111]. *In vivo-Imaging* und Genexpressionsanalysen zeigen, dass sich präaktive zu aktiven Läsionen weiter entwickeln können [99,101,104,156,157].

1.2.2.2 Autoimmunität

Man ist sich einig, dass das Immunsystem eine große Rolle in der MS-Läsionspathogenese spielt. Eine erhöhte Synthese von Antikörpern kann im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten nachgewiesen werden und wird mit einem malignen Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht [112-114]. Die Plasmapherese bewirkte selektiv eine Besserung neurologischer Symptome bei Patienten, deren Läsionen stark durch Antikörper und das Komplementsystem charakterisiert waren [115]. Auch die Hemmung von akuten, inflammatorisch hoch aktiven Schüben durch Immunmodulatoren zeigt die Relevanz des Immunsystems bei der Pathogenese neuer MS-Läsionen [44]. Im Gegensatz dazu haben Immunmodulatoren, trotz erfolgreicher Hemmung aktiver Schübe, keinen erheblichen Einfluss auf den progredienten Krankheitsverlauf. Um als autoimmune Erkrankung bezeichnet zu werden, müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein [116]. Das Hauptkriterium ist, dass bei allen MS-Patienten ein gemeinsames Autoantigen nachgewiesen wird [117]. Bisher konnte jedoch kein spezifisches MS-Antigen, wie verschiedene Myelinbestandteile, nachgewiesen werden. Ein weiteres Kriterium ist, dass Autoantikörper oder autoreaktive T-Zellen in MS-Läsionen oder im Serum nachgewiesen werden. Tatsächlich wurden im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten Antikörper gegen MBP sowie *Myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) nachgewiesen und im Serum zusätzlich MBP-, MOG- und PLP-reaktive T-Zellen [118-120]. Dies trifft allerdings auch auf gesunde Menschen oder auf Patienten anderer Erkrankungen zu, sodass diese Befunde nicht spezifisch für MS-Patienten zu sein scheinen [119,120]. Beide Kriterien können somit nicht eindeutig erfüllt werden [117]. Ob die MS als eine primär autoimmune Erkrankung bezeichnet werden kann, ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

1.2.2.3 Oxidativer Stress als mögliche Komponente der Läsionspathogenese

Bei der MS kommt es zu einer primären Demyelinisierung von Axonen, bei der selektiv das Myelin geschädigt wird [121]. Zurzeit wird diskutiert, ob Oligodendrozyten - wie bisher angenommen - von autoreaktiven Immunzellen angegriffen werden oder aber selbst der primäre Auslöser der Demyelinisierung sind. In diesem Zusammenhang wird in aktuellen Studien oxidativer Stress als mögliche Komponente der Läsionspathogenese diskutiert [122,123]. Die Myelinsynthese erfordert eine hohe metabolische Aktivität und geht folglich mit einem sehr hohen Energieverbrauch einher. Zudem ist die mitochondriale DNA

EINLEITUNG

(mtDNA) allgemein deutlich anfälliger für Mutationen als die chromosomale DNA, und verglichen mit anderen Zelltypen haben Oligodendrozyten eine schlechtere Kapazität ihre mtDNA zu reparieren [124,125]. Aufgrund dessen reagieren vor allem Oligodendrozyten sehr sensibel auf verschiedene externe und interne Stressoren, wie Inflammation, oxidativer Stress, Proteinmissfaltungen, freie Radikale und mitochondriale Dysfunktionen [126-129]. Freie Radikale, beispielsweise ROS, entstehen im Organismus als Nebenprodukt bei der Zellatmung sowie bei Entzündungsprozessen, um Bakterien und Viren zu schädigen. Als Elektronenakzeptor verändern sie die Reaktivität anderer Moleküle durch eine Oxidation. Unter physiologischen Bedingungen fungieren ROS als wichtige Signalmoleküle bei der Signalübertragung, der synaptischen Plastizität und der Gedächtnisbildung und stehen im Gleichgewicht mit antioxidativen Molekülen [130,131]. Gibt es beispielsweise durch ionisierende Strahlung oder übermäßige Hitzeexposition einen Überschuss an ROS, ist das Gleichgewicht gestört, und es kann zu oxidativem Stress kommen. Gliazellen, insbesondere Astrozyten sind stark in der Redox Homöostase des Gehirns eingebunden [132-134]. Auch Oligodendrozyten reagieren im Regelfall auf eine erhöhte Anzahl an ROS mit einer Aktivierung des zelleigenen Antioxidationsystems.

Der Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2* (NRF2) ist im Zytoplasma an den Repressor *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) gebunden und transloziert bei Aktivierung in den Nukleus. Dort bindet er an das *antioxidant response element* (ARE) und induziert die Transkription verschiedener Gene. Dieses NRF2-KEAP1-ARE-System ist in eukaryotischen Zellen ein hoch effektiver und stark konservierter Mechanismus, der bei inflammatorischem oder verletzungsbedingtem oxidativen Stress die Expression einiger antioxidativ-wirkender Gene induziert [135]. Oxidativer Stress und die dadurch pathologische Veränderung von Lipiden, Proteinen oder DNA wird erst dann problematisch, wenn dieses Ungleichgewicht nicht mehr mit dem Abbau von ROS durch das Antioxidationsystem in der Zelle ausgeglichen werden kann [136]. Es wurde gezeigt, dass Oligodendrozyten als Antwort auf oxidativen Stress chemotaktische Signalmoleküle, wie CXCL10, CCL2 und CCL3, und in frühen MS-Läsionen α B-Crystallin produzieren [110,137,138]. Diese Reaktion kann als aktive Rekrutierung von Mikrogliazellen zum Läsionsherd hin interpretiert werden. Schaffen es die Oligodendrozyten nicht die Redox-Homöostase wieder herzustellen, werden Apoptosemechanismen eingeschaltet, welche zu einem Untergang der Zelle führen. *In vivo* Studien mit dem MS-Modell Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) zeigen die Relevanz von oxidativem Stress und von Antioxidantien für die Läsionspathogenese [139-142]. Therapien mit den Antioxidationsmitteln Tirilazad mesylat, N-Acetyl-L-cystein, Katalase, Butylhydroxyanisol oder Liponsäure führten alle zu einem verzögerten, verkürzten oder inhibierten Krankheitsverlauf in diesem Modell. Eine große Problematik bei der Therapie mit Antioxidationsmitteln ist allerdings die beschränkte Durchlässigkeit der BHS für diese Substanzen.

1.2.3 Ätiologie der Multiplen Sklerose: *Outside-In* versus *Inside-Out* Theorie

Zur Klärung der MS-Ätiologie konkurrieren derzeit zwei Theorien. Die am weitesten verbreitete Sichtweise ist, dass durch eine immunologische Dysfunktion periphere Immunzellen autoreaktiv aktiviert werden und das ZNS infiltrieren. Im Neuropil angekommen sekretieren sie Zytokine und Chemokine, woraufhin BHS-assoziierte Adhäsionsmoleküle verändert werden, und die Rekrutierung weiterer peripherer Leukozyten eingeleitet wird [143]. Dies führt letztlich zu Entzündungsreaktionen und einer Neurodegeneration, wie Demyelinisierung, Verlust von Oligodendrozyten und axonalem Schaden [144-148]. Alvarez und Kollegen stellten 2015 fest, dass eine periphere Aktivierung des Immunsystems einer ZNS Pathologie vorausgeht [149]. Diese Theorie wird auch als *Outside-In* Theorie bezeichnet und definiert die Autoimmunität als primäre und initiale MS-Pathologie, aus der eine Neurodegeneration folgt. Der Auslöser kommt somit aus der Peripherie („*Outside*“) und verursacht sekundär einen Schaden im ZNS („*In*“). Ebenfalls spielen vermutlich verschiedene Faktoren wie Genetik, Umwelteinflüsse, Infektionen, Hygiene, Übergewicht und Rauchen eine Rolle im Krankheitsverlauf [4].

Aufgrund einiger Unstimmigkeiten dieser Theorie, auf die Stys und Kollegen 2012 hinwiesen und die im Folgenden erläutert werden, gewann die oppositionelle *Inside-Out* Theorie immer mehr Aufmerksamkeit [150]. Als primärer Auslöser wird hierbei die Neurodegeneration innerhalb des ZNS gesehen („*Inside*“), der eine Infiltration peripherer Immunzellen folgt („*Out*“). Grund zu dieser Annahme sind Beobachtungen von Rodriguez und Scheithauer, die eine Degeneration und Akkumulation von Organellen an inneren Myelinschichten sowie eine Weitung von inneren Myelinlamellen in frühen MS-Läsionen feststellten [151]. Die äußeren Schichten und Axone waren jedoch unbeschadet und zeigten keine pathologischen Auffälligkeiten. Zusätzlich wurde eine Degradation von Myelin in Bereichen gefunden, die kaum Inflammation oder Makrophageninfiltration zeigten. Die Autoren schlussfolgerten, dass Immunzellen nicht an innere Schichten des Myelins gelangen könnten und daher zunächst die äußeren Schichten angreifen müssten. Die Demyelinisierung gehe in manchen Fällen einer Inflammation voraus. Alvarez und Kollegen lieferten ebenfalls Hinweise, dass der Immunezellinfiltration eine Dysfunktion der BHS durch Expressionsveränderungen von *Junction* Proteinen vorausgeht [67,69]. Immunmodulatoren sowie die Transplantation autologer hämatopoetischer Stammzellen haben keinen Einfluss auf die progrediente Neurodegeneration [103,152-156]. Des Weiteren wurden die meisten genetischen Studien mit schubförmig-remittierenden MS-Patienten durchgeführt, sodass durch den starken inflammatorischen Charakter dieser Verlaufsform eine immun-assoziierte Prädisposition nicht verwunderlich ist [157,158]. Rückschlüsse über die primär-progrediente Verlaufsform können aus diesen Studien daher nicht gezogen werden.

EINLEITUNG

Weiterhin schlagen Stys und Kollegen vor, dass die Schübe die Folge einer besonderen genetischen Prädisposition sein könnten, aggressiv auf bestimmte Antigene zu reagieren. Frauen zeigen generell stärkere angeborene und adaptierte Immunantworten als Männer, sodass zwar Krankheitserreger leichter beseitigt werden können und eine höhere Effizienz bei Impfungen besteht, der Körper dafür aber auch anfälliger für inflammatorische und autoimmune Erkrankungen ist [159]. Das könnte erklären, warum Frauen ca. 3-mal häufiger an einer schubförmig-remittierenden MS erkranken als Männer [160]. MS könnte folglich eine Kombination aus progressiver Neurodegeneration und einem variabel prädispositionierten Immunsystem sein, wodurch schließlich die unterschiedlichen Verlaufsformen zu Stande kommen. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass die primär-progrediente und die schubförmig-remittierende Verlaufsform von der Ätiologie her ein und dieselbe Krankheit ist, jedoch mit unterschiedlichen immunologischen Antworten [150,161]. Ein weiterer Hinweis auf die Relevanz der *Inside-Out* Theorie gibt der Befund, dass es deutlich mehr präaktive als aktive Läsionen im ZNS von MS-Patienten gibt. Man geht daher davon aus, dass sich nicht alle präaktiven Läsionen zu aktiven Läsionen weiter entwickeln. Weiterhin wird vermutet, dass es zu einem gewissen Grad eine intrinsische Regulation gibt, die eine Rückbildung der präaktiven Läsionen einleitet und somit die Läsionsprogression verhindert [106,107,111].

1.2.4 Reparaturprozesse des zentralen Nervensystems

Das ZNS ist in der Lage, Axone nach einer Demyelinisierung zu remyelinisieren. Remyelinisierungsprozesse sind für frühe Stadien der MS charakteristisch und kommen hauptsächlich in inaktiven Läsionen, aber auch in aktiv-demyelinisierenden Läsionen vor [162-164]. Eine Remyelinisierung im späten Krankheitsverlauf ist eher selten und befindet sich meist nur am Rand von inaktiven Läsionen [165,166]. Analysen der Remyelinisierung an humanem Gewebe gestalten sich schwer, da keine chronologische Untersuchung der Läsionsentwicklung stattfinden kann. Ultrastrukturell sind solche remyelinisierten Bereiche, verglichen mit der NAWM, durch eine verringerte Myelindichte charakterisiert [167,168]. Parameter wie die G-ratio, verkürzte Internodien und vergrößerte Ranvier'sche Schnürringe können Hinweise auf Remyelinisierungsprozesse geben [165,167,169]. Eine erhöhte G-ratio stellt hierbei ein Indiz für remyelinisierte Axone dar [169-171]. Mittels immunhistochemischer Färbungen und zu einem gewissen Grad mittels MRT können im ZNS von MS-Patienten sogenannte „Schattenläsionen“ gefunden werden [167,172,173]. Dabei handelt es sich um vollständig remyelinisierte Läsionen [167,172].

Die Neigung zur Remyelinisierung ist sehr individuell und unterscheidet sich von Patient zu Patient und sogar von Läsion zu Läsion [165,167,174]. Aufgrund dieser Heterogenität geht man davon aus, dass bei der

EINLEITUNG

MS durch Veränderungen in der Mikroumgebung Remyelinisierungsprozesse beeinträchtigt sind [175,176]. Die Vorgänge nach Myelinverletzungen auf zellulärer Ebene sind sehr komplex und beinhalten eine Koordination der Aktivierung, Proliferation, Migration und Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläufern [177,178]. Die sich in der Läsion befindlichen Mikroglia und Astrozyten sowie auch Oligodendrozyten selber sekretieren chemotaktische Signalmoleküle, um Oligodendrozyten-Vorläufer zum Läsionsherd zu leiten [179,180]. Man geht davon aus, dass die verminderte Remyelinisierung erstens an einer ungenügenden Rekrutierung von Oligodendrozyten-Vorläufern und zweitens an einer inhibierten Differenzierung der Vorläufer zu Myelin-bildenden Oligodendrozyten liegt [181-184]. Obwohl bereits einige Faktoren identifiziert wurden, die eine Remyelinisierung fördern oder hemmen, sind die zu Grunde liegenden Mechanismen noch weitgehend unbekannt.

Als remyelinisierungsfördernde Faktoren wurden beispielsweise Hormone und Wachstumsfaktoren identifiziert [185-187]. Es wurde gezeigt, dass eine Schwangerschaft einen kurzzeitigen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf hat und die Substitution mit Östrogenen in nicht-schwangeren Frauen die Symptome verbessert, solange die Behandlung aufrechterhalten wird [188-192]. Eindeutige geschlechterspezifische Unterschiede hinsichtlich der Remyelinisierungskapazität wurden jedoch nicht bestätigt [193]. Auch IL1 β scheint bei Remyelinisierungsprozessen beteiligt zu sein, indem es den Wachstumsfaktor *Insulin-like growth factor 1* (IGF1) induziert [194]. Dieser wird von Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Makrophagen sekretiert, um Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu mobilisieren und die Repopulation von Oligodendrozyten in demyelinisierten Regionen zu fördern [194,195]. Der Wachstumsfaktor *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) leitet die Proliferation von Oligodendrozyten und Myelinisierung ein und wird *in vitro* von Myelin-reaktiven T-Zellen sekretiert [196,197]. Mikroglia und Makrophagen leiten ebenfalls durch die Beseitigung von Myelindebris und die Expression antiinflammatorischer Signalmoleküle Reparaturmechanismen ein [198-202]. Es wurde geschlossen, dass inflammatorische Prozesse sogar notwendig für die Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläufern und die Remyelinisierung sein könnten [174,196,197,203].

IFN γ und IL6 sind, neben einer unzureichenden Entfernung des Myelindebris und der astrozytären Glianarbe, Remyelinisierungsinhibierende Faktoren [204,205]. Auch das Alter scheint eine Rolle zu spielen, da die Remyelinisierungsrate mit zunehmendem Alter abnimmt [206-209]. Der Grund dafür könnte eine verminderte Effizienz der Oligodendrozyten-Vorläufer sein, sich zu differenzieren [183,209-211]. Die Lokalisation und die Größe der Läsionen scheint ebenfalls einen Einfluss auf Remyelinisierungsprozesse zu nehmen [212]. Subkortikale Läsionen zeigen mehr Remyelinisierung als periventrikuläre Läsionen, kortikale Läsionen eine stärkere und schnellere Remyelinisierung als in der weißen Substanz, und Läsionen im

EINLEITUNG

Kleinhirn zeigen kaum Remyelinisierung [165,169,193]. Regionale Unterschiede könnten darin begründet sein, dass Astrozyten und Mikroglia verschiedene Funktionen haben, Oligodendrozyten-Vorläufer eine unterschiedliche Remyelinisierungskapazität haben oder Neurone eine unterschiedliche Aktivität aufweisen, die zur Proliferation der Oligodendrozyten-Vorläufer beiträgt [213-217]. Interessanterweise verbessert eine erfolgreiche Remyelinisierung in Läsionen jedoch nur geringfügig den klinischen Zustand der Patienten [164,167,218].

1.2.5 Tiermodelle in der Multiple Sklerose Forschung

Im Laufe der Jahrzehnte wurden zur Erforschung der MS-Pathogenese verschiedene Tiermodelle etabliert, die alle unterschiedliche Aspekte der MS widerspiegeln und entweder durch Antigene, Toxine oder Viren induziert werden. Das bekannteste Tiermodell für eine akute oder chronisch-inflammatorische Enzephalopathie ist die EAE. Sie wird meist an weiblichen Mäusen angewendet und der Fokus liegt hierbei auf CD4-positiver T-Zell-vermittelter Inflammation [219]. Dieses Tiermodell eignet sich besonders gut, um die Rolle des Immunsystems und autoimmuner Prozesse bei der MS-Pathogenese zu untersuchen. Hierbei kommt es durch autoreaktive T-Zellen zu primären Schäden der Myelinschicht, die schließlich zu axonalem Schaden führen [220]. Um eine aktive EAE zu induzieren, werden Myelinbestandteile wie MOG, PLP oder MBP zusammen mit inaktiviertem Mykobakterium als Stimulator des Immunsystems systemisch appliziert. Des Weiteren ist eine Behandlung mit dem bakteriellen Protein Pertussis Toxin (PTX) nötig, um den Sensibilisierungsprozess weiter zu verstärken. Passive EAE-Modelle werden verwendet, um die immunologische Überwachung des ZNS, die Inflammation und T-Zell-vermittelte inflammatorische Gewebeschäden zu untersuchen. Hierfür werden Tiere immunisiert, ihre autoreaktiven T-Zellen isoliert und nach Restimulation naiven Empfängertieren systemisch appliziert. Studien am passiven EAE-Modell zeigen über welche Routen die T-Zellen in das ZNS gelangen können [143,221-223]. Hierbei entstehen autoimmune Läsionen zunächst um piale Venen herum. Die T-Zellen scannen systematisch erst die innere und dann die äußere vaskuläre Oberfläche ab und werden dabei durch antigenpräsentierende Zellen stimuliert. Die aktivierten T-Zellen produzieren zum einen Zytokine wie $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und Chemokine, und lösen damit zum anderen ihren Eintritt in das ZNS Parenchym und die Rekrutierung weiterer Immunzellen aus. Diese leptomenigeale und transvaskuläre Route scheint die Hauptroute zu sein, durch die die T-Zellen bei der EAE das ZNS infiltrieren [143]. Alternative Routen sind die Infiltration durch den Plexus choroideus und durch postkapilläre Venulen [222]. Ebenfalls wurde gezeigt, wie wichtig eine vorherige Reaktivierung der T-Zellen für das ZNS ist [224,225] und inwiefern die funktionelle Polarisierung der T-Zellen das Ausmaß, die Qualität und die Verteilung der Inflammation bestimmt [226]. Bei diesem Modell gibt es im Wesentlichen

EINLEITUNG

zwei Limitierungen. Zum einen sind Läsionen fast ausschließlich im Rückenmark mit wenig Beteiligung des Hirnstamms, Kleinhirns und Vorderhirns zu finden [227]. Zum anderen sind große Läsionen meist durch eine starke axonale Degeneration mit nur sekundärer Demyelinisierung charakterisiert, anstatt wie bei der humanen MS durch eine primäre Demyelinisierung [227]. Der progrediente Aspekt der MS ist mit den bisher verfügbaren EAE-Modellen nur unzulänglich darstellbar. Viele MS-Medikamente, die auf die Behandlung neuroinflammatorischer Aspekte der Erkrankung abzielen, beruhen auf Studien mit dem neuroinflammatorischen EAE-Modell.

Die Rolle von viralen Infektionen durch das Epstein-Barr-Virus oder Retroviren ist in der MS-Pathogenese noch umstritten [228,229]. Dennoch eignen sich viral-induzierte experimentelle Tiermodelle für inflammatorisch-demyelinisierende Studien gut, um Grundmechanismen pathologischer Prozesse im ZNS zu erforschen. Das bekannteste virale MS-Modell ist das Theiler's Murine Enzephalomyelitis Virus-Modell. Durch direkte intrakranielle Virusapplikation wird eine chronisch-demyelinisierende Enzephalomyelitis induziert, die hauptsächlich das Rückenmark betrifft [230]. Läsionen sind durch primäre Demyelinisierung in der Nähe von Mikrogliaaktivierung, axonalem Schaden und Immuneinfiltraten gekennzeichnet, die sich aus CD4- und CD8-positiven T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Plasmazellen zusammensetzen [231-233].

Um gezielt De- und Remyelinisierungsprozesse im ZNS zu analysieren, ist die Anwendung toxischer Demyelinisierungs-Modelle besonders geeignet, da kaum inflammatorische Prozesse durch die adaptive Immunantwort involviert sind. Durch diese toxischen Tiermodelle wurden bisher wertvolle Informationen zu neuroprotektiven Effekten der Remyelinisierung sowie zu metabolischen Mechanismen bei der Zerstörung und der Reparatur von Myelin gewonnen [234-236]. Das gebräuchlichste Toxin ist der Kupferchelator Cuprizin, dessen orale Verabreichung eine Apoptose von Oligodendrozyten mit einhergehender Demyelinisierung sowie einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten innerhalb weniger Wochen induziert [237-239]. Dieses Tiermodell wird meist mit männlichen Mäusen durchgeführt. Der genaue Wirkmechanismus von Cuprizin ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass es zu einer Störung der mitochondrialen Elektronentransportkette kommt, was zu einer verringerten Adenosintriphosphat (ATP) Produktion sowie vermehrter ROS Formation und somit zu oxidativem Stress führt [240,241]. De- und Remyelinisierungsprozesse durch die Gabe oder den Entzug von Cuprizin werden zusätzlich durch gehirn-intrinsische inflammatorische Mechanismen von Mikroglia und Astrozyten beeinflusst. Läsionen findet man hauptsächlich im Fasertrakt Corpus callosum, das beide Großhirnhemisphären verbindet [242]. Der mediale Teil des Corpus callosum ist nach 5 – 6 Wochen nahezu vollständig demyelinisiert. Ebenfalls sind nach dieser Zeit mediale Teile des Cingulum, kortikale Bereiche, Kerne des Kleinhirns und Teile der Hippocampusformation demyelinisiert [243-246]. Die schnelle spontane Remyelinisierung muss nach Absetzen der Cuprizingabe bei der Interpretation von Ergebnissen und der

EINLEITUNG

Entwicklung remyelinisierungsfördernder Therapien berücksichtigt werden [247]. Laterale Anteile des Corpus callosum und Cingulum sowie die Fornix, die Commissura anterior, das Rückenmark, die weiße Substanz des Kleinhirns und laterale Anteile des Corpus striatum sind bei einer Cuprizongabe nicht von Demyelinisierung betroffen [245,248-250]. Weiterhin bleibt die BHS intakt und Strukturen, wie das Rückenmark, die bei der humanen MS betroffen sind, sind im Cuprizon-Modell nicht involviert [249,251,252]. Die bereits erwähnten fehlenden inflammatorischen und autoimmunen Eigenschaften sind jedoch gleichzeitig eine weitere Limitierung dieses Modells für MS-Forschung, wenn beispielsweise Prozesse der Immunzellinfiltration in das ZNS erforscht werden sollen [253,254].

Die oben beschriebenen und bislang am meisten verwendeten Modelle decken nur Teilaspekte der MS ab, mit denen lediglich einzelne, pathologisch relevante und spezifische Mechanismen analysiert werden können. Die Arbeitsgruppen von Emerson und Maña versuchten bereits 2001 und 2009 eine Cuprizon-Intoxikation mit einer EAE-Immunsierung in einem Modell zu kombinieren, erzielten jedoch keine Erfolge [255,256]. Es besteht weiterhin die Notwendigkeit ein umfassendes Modell zu finden, das es erlaubt, mehrere krankheitsspezifische Komponenten und deren Zusammenhänge zu untersuchen. Ein langfristiges Ziel ist es, Medikamente zu entwickeln, die die MS ursächlich bekämpfen.

1.3 Ziele der Arbeit

Aufgrund der unvollständigen Abbildung der humanen MS durch gängige Tiermodelle entwickelten wir unlängst aus dem Cuprizon- und dem EAE-Modell ein kombinatorisches Modell, an dem in dieser Arbeit neurodegenerative und neuroinflammatorische Aspekte in Großhirn, Kleinhirn und Rückenmark weiter untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es, anhand dieses kombinatorischen „CupEAE-Modells“ zum einen Zusammenhänge zwischen Neurodegeneration und der Infiltration peripherer Immunzellen zu analysieren und zum anderen Mechanismen der MS-Läsionspathogenese mit besonderem Fokus auf das Zusammenspiel verschiedener Gliazellen im Kontext neurodegenerativer Prozesse zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Analyse von sekretierten Signalmolekülen verschiedener Gliazellen und die Rolle des oxidativen Stresses. Im Rahmen dieser Arbeit werden kontrollierte, experimentelle Studien an den gängigen MS-Tiermodellen Cuprizon und EAE, vergleichend mit dem neuen kombinatorischen CupEAE-Modell, durchgeführt. Für molekulare Detailstudien präaktiver Läsionsentstehung dienten *in vitro* Experimente mit Zelllinien. Die Studien gliedern sich wie folgt in drei Teilbereiche:

1. Zunächst wird das ZNS, insbesondere das Großhirn, von Cuprizon- und EAE-Tieren auf Gliose, Demyelinisierung, axonalen Schaden und Immunzellinfiltration auf Proteinebene untersucht und anschließend mit CupEAE-Tieren verglichen. Hierfür werden die einzelnen untersuchten Parameter in den verschiedenen Versuchsgruppen gegenübergestellt (Kapitel 3.1).
2. Um die zentralen Prozesse der Läsionspathogenese besser zu verstehen, wird die Signalmolekül-Signatur im ZNS mit Hilfe des kombinatorischen CupEAE-Modells auf Gen- und Proteinebene, der *ex vivo* isolierten Mikrogliazellen auf Genebene sowie der *in vitro* gestressten Oligodendrozyten auf Gen- und Proteinebene untersucht (Kapitel 3.2).
3. Abschließend wird die Rolle von oxidativem Stress bei der Läsionspathogenese mit Hilfe von *in vitro*-stimulierten Oligodendrozyten auf Genebene, von *in vivo*-Kurzzeit Cuprizon-Intoxikation mit ARE-Luc-Reporter-mäusen auf Genebene sowie GFAP-spezifischen KEAP1-KO-Mäusen auf Proteinebene untersucht (Kapitel 3.3).

2 Material und Methoden

In Kapitel 2.1 werden zunächst die verwendeten Versuchstiere und Zelllinien beschrieben. In Kapitel 2.2 werden anschließend die Versuchsabläufe und die verschiedenen Versuchsgruppen der *in vivo* und *in vitro* Experimente erläutert. Die genaue Beschreibung der Durchführung der einzelnen labortechnischen Methoden erfolgt in den Kapiteln 0 - 2.6. Alle verwendeten Geräte, Materialien und Reagenzien mit ihren Bestellnummern, und die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen können dem Appendix entnommen werden.

2.1 Versuchstiere und Zelllinien

2.1.1 Versuchstiere

12 Wochen alte weibliche und 19 - 21 g schwere männliche C57BL/6J Mäuse wurden von Jackson Laboratories bezogen. *CX3CR1^{+/GFP}* Mäuse wurden dankend von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Oliver Pabst aus der Molekularen Medizin des UK Aachen entgegengenommen. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen in der Versuchstierkunde des UK Aachen gemäß den Empfehlungen der FELASA gehalten. Die Mäuse hatten *ad libitum* Zugang zu Futterpellets und Wasser und wurden bei einem 12 h Tag/Nacht-Zyklus und kontrollierter Temperatur und Humidität gehalten (23 ± 2 °C; 55 ± 10 % Humidität). Die Haltung und Behandlung der *GFAP-Cre::keap1^{flox/flox} KO* Mäuse sowie der C57BL/6J-ARE-Luziferase-Reporter-mäuse (ARE-Luc Mäuse) wurden nicht von mir persönlich durchgeführt und können aus Draheim und Kollegen 2016 entnommen werden [257]. In ARE-Luc Mäusen ist das Enzym Luziferase mit dem ARE-Promotor gekoppelt. Durch Zugabe des Substrats Luziferin kann bei Genaktivität die emittierte Lumineszenz gemessen werden, diese korreliert direkt mit der Genaktivität von *NRF2*. Die Tierversuche wurden vom *Review Board* des zuständigen Landes NRW genehmigt (AZ 84-02.04.2013 A201; AZ 84-02.04.2017 A117).

2.1.2 Zelllinien

OLN93 Zellen wurden von Dr. C. Richter-Landsberg aus Oldenburg (RRID:CVCL_5850) erhalten, die BV2 Zellen wurden nach Dr. E. Blasi aus Modena kultiviert (RRID:CVCL_0182). Die Kultivierung erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Thermo Fisher Scientific), welches mit Penicillin G (10.000 Units/mL, Thermo Fisher Scientific), Streptomycin (10.000 µg/mL, Thermo Fisher Scientific) und 5 % (OLN93

Zellen) bzw. 10 % (BV2 Zellen) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS, PAA) angereichert wurde. Die Zellen wurden kontinuierlich bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Die Kultivierung und Behandlung der OliNeu Zellen wurden nicht von mir persönlich durchgeführt und können aus Liessem-Schmitz und Kollegen 2018 entnommen werden [258].

2.2 Versuchsgruppen und methodischer Überblick der Experimente

2.2.1 Tierexperimente (*in vivo*)

2.2.1.1 Versuchsgruppen

Nach Eingang in die Tierhaltung wurden die Mäuse randomisiert auf die Käfige der Experimentalgruppen aufgeteilt. Ein schematischer Zeitablauf der Versuche mit dem Cuprizon-, EAE- und CupEAE-Modell ist in Abbildung 3 A dargestellt. Bei diesen Versuchen gab es insgesamt 6 Versuchsgruppen: Kontrolle, Cuprizon, EAE, CupEAE, CupPTX und CupEAE3+4. Um die Tiere unterscheiden zu können, wurden zu Beginn des Versuchs verschiedene Ohrmarkierungen gestanzt. Die Kontrollgruppe wurde 7 Wochen und die EAE-Gruppe 5 Wochen lang mit Normalfutter gefüttert (ssniff Spezialdiäten GmbH). Die Cuprizon-, CupPTX- und beide CupEAE-Gruppen wurden ab Versuchsbeginn 3 Wochen lang täglich mit einem frisch angesetzten Futtermisch aus 0,25 % (w/w) Cuprizon (Bis(cyclohexanon) oxaldihydraton, Sigma-Aldrich) und Mehlfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH) gefüttert. An jedem zweiten Tag erfolgte ein vollständiger Käfigwechsel der Cuprizon-gefütterten Tiere. Im Anschluss an die Cuprizon-Intoxikation hatte die Cuprizon- und CupEAE3+4-Gruppe vier Wochen, die CupEAE- und CupPTX-Gruppen zwei Wochen lang Zugang zu Normalfutter. Die Tiere der EAE- und beider CupEAE-Gruppen wurden anschließend mit 100 µL einer Emulsion aus MOG₃₅₋₅₅ und Komplettem Freund's Adjuvant (CFA) immunisiert. CFA wurde als eine Wasser-in-Öl-Emulsion (inaktiviertes und getrocknetes Mykobakterium, Mineralöl und Emulgator Arlacel A) zur Verstärkung der Immunreaktion eingesetzt. Die CupPTX-Gruppe erhielt nur CFA ohne das MOG₃₅₋₅₅ Protein. Die Injektionen erfolgten subkutan in die Nackenfalte und in die Schwanzwurzel. Einmal 2 h und einmal 24 h nach der MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung wurden 150 µL PTX (Hooke Laboratories) in *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS, Thermo Fisher Scientific) allen EAE-, CupEAE- und CupPTX-Tieren intraperitoneal injiziert (450 ng/ Dosis). Das EAE-Immunisierungskit inklusive PTX und MOG₃₅₋₅₅ Protein in CFA wurde von Hooke Laboratories Inc. bezogen. Ab Tag 5 nach der Immunisierung wurden alle Tiere einem klinischen Scoring unterzogen (Kapitel 2.2.1.2). Ab Score 2,5 wurde erkrankten Tieren eine Petrischale mit aufgeweichten Futterpellets und Wasser auf dem Käfigboden zur Verfügung gestellt, um ihnen aufgrund der Paresen an den Hinterläufen den Zugang zum Futter zu erleichtern. Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden

MATERIAL UND METHODEN

zusammen mit den MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen auf dem Peak der Erkrankung finalisiert. Die Versuche mit Kontroll-, Cuprizon-, EAE- und CupEAE-Tieren wurden insgesamt bis zu 11-mal durchgeführt, da die unterschiedlichen labortechnischen Methoden verschiedene Verarbeitungstechniken erforderten. Versuche mit den Versuchsgruppen CupEAE3+4 und CupPTX wurden jeweils nur einmal durchgeführt.

Mit Hilfe der CupPTX-Gruppe wurde überprüft, ob für die Bildung MOG-reaktiver T-Zellen bei CupEAE-Tieren tatsächlich das MOG₃₅₋₅₅ Protein, und nicht das immun-stimulierende PTX, verantwortlich ist. Die CupEAE3+4-Gruppe diente der Untersuchung, ob eine zeitliche Korrelation zwischen der Cuprizon-Intoxikation und der Immunzellinfiltration in das Großhirn besteht. HE Färbungen der Gehirnschnitte dienten zur Untersuchung der Immunzellinfiltration in den CupPTX- und CupEAE3+4-Gruppen.

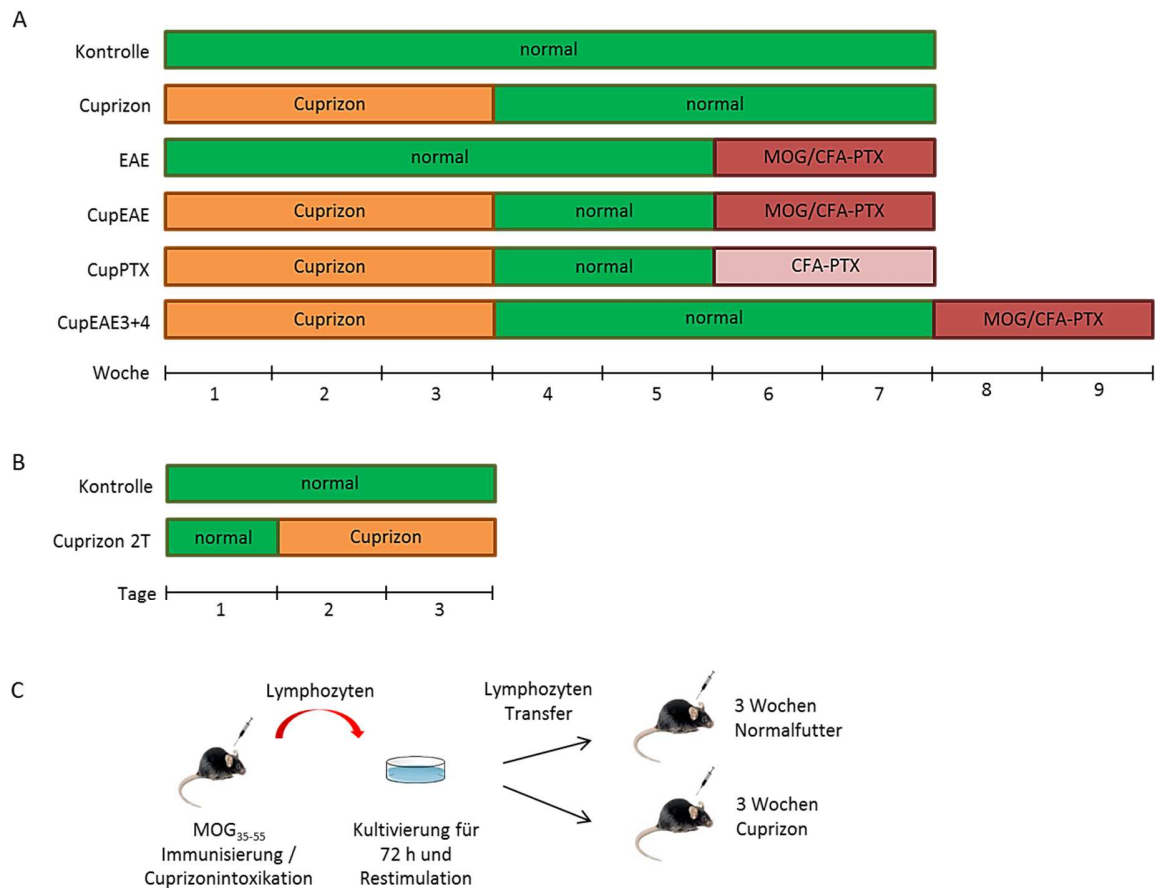


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *in vivo* Experimente

(A) Aufbau der *in vivo* Experimente der verschiedenen MS-Tiermodelle (modifiziert übernommen aus Masterarbeit Scheld 2015). **(B)** Aufbau der *in vivo* Experimente der Kurzzeit Cuprizon-Intoxikation. **(C)** Schematische Darstellung der AT-Experimente: Nach MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung oder Cuprizon-Intoxikation wurden Lymphozyten aus der Milz in Kultur restimuliert und Empfängertieren mit und ohne vorherige Cuprizon-Intoxikation injiziert (modifiziert übernommen aus [259]).

MATERIAL UND METHODEN

Die Experimentalgruppen der *in vivo* Versuche mit dem Kurzzeit Cuprizon-Modell und ein schematischer Zeitablauf sind in Abbildung 3 B dargestellt. Die Kontrolltiere wurden für 3 Tage mit Normalfutter gefüttert. Die Kurzzeit-Cuprizon-Tiere (2T-Cuprizon) wurden zunächst für 1 Tag mit gemahlenem Normalfutter und anschließend für 2 Tage mit einem frisch angesetzten 0,25 % (w/w) Cuprizon-Futtergemisch gefüttert. Beide Experimentalgruppen wurden zusammen finalisiert. Diese Versuche dienen dazu, mittels Immunhistologie, Immunfluoreszenz und *in situ* Hybridisierungen die *in vitro* Befunde ebenfalls auf die Frühphase der Läsionsentstehung *in vivo* zu untersuchen.

Da erstens bei Mäusen nach Cuprizon-Intoxikation eine erhöhte Lipidansammlung und zweitens bei MS-Patienten MBP und PLP in den zervikalen Lymphknoten gefunden wurden [260], ist es höchstwahrscheinlich, dass nach einer Demyelinisierung Myelinbestandteile zu den Lymphknoten transportiert werden. Bei CupEAE-Tieren könnte daher die Gefahr bestehen, dass nach Cuprizon-Intoxikation in den Lymphknoten Myelin-Antigene generiert werden, die das Immunzell-Repertoire während der anschließenden MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung beeinflussen. Die adoptiven Transfer (AT) Experimente dienen daher dem Ausschluss Cuprizon-vermittelter Änderungen des Immunzell-Repertoires während der MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung. Die schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 3 C dargestellt (modifiziert übernommen [259]). Aus der Milz von EAE-Tieren wurden Lymphozyten isoliert, in Kultur restimuliert und Kontrolltieren („MOG-AT in Kontrolle“) oder Cuprizon-Tieren („MOG-AT in Cup“) injiziert. Weiterhin wurden Lymphozyten aus der Milz von Cuprizon-Tieren isoliert, in Kultur restimuliert und Kontrolltieren („Cup-AT in Kontrolle“) oder Cuprizon-Tieren („Cup-AT in Cup“) injiziert. Zur Untersuchung der Immunzellinfiltration wurden HE Färbungen durchgeführt.

2.2.1.2 Klinisches Scoring

Das klinische Scoring basiert auf dem empfohlenen Scoring System des Herstellers des Immunisierungskits Hooke Laboratories (Appendix A, EAE Scoring Guide, Hooke Kits™, S. 10 - 12) und umfasst eine Skala von 0 - 5. Die einzelnen Scores sind wie folgt definiert:

Score 0: Keine klinischen Symptome

Score 1: Paralyse des Schwanzes oder Parese der Hinterläufe

Score 2: Paralyse des Schwanzes und Parese der Hinterläufe

Score 3: Plegie der Hinterläufe

Score 4: Plegie der Hinterläufe und Parese von mindestens einem Vorderlauf

Score 5: Schwere Paralyse oder Tod durch Paralyse (Abbruchkriterium)

MATERIAL UND METHODEN

Zusätzlich wurden Zwischen-Scores eingeführt (0,5-er Schritte), wenn das klinische Bild zwischen zwei definierten Scores lag. In die Ermittlung des maximalen klinischen Scores wurden nur die Tiere einbezogen, die mindestens einen Score von 1 aufwiesen, da der Score von 0,5 nicht zuverlässig zu ermitteln war. Für die Ermittlung des Krankheitsbeginns wurde der Tag festgelegt, an dem die ersten klinischen Symptome auftraten und am nachfolgenden Tag ebenfalls klinische Symptome festgestellt wurden. Durch diese Methode wurden jene Tiere ausgeschlossen, die entweder einen atypischen oder keinen Krankheitsverlauf zeigten. Der Peak der Erkrankung einer Versuchsgruppe wurde definitionsgemäß erreicht, wenn sich der mittlere klinische Score innerhalb zwei aufeinanderfolgender Tage nicht weiter erhöhte.

2.2.1.3 Gewebeaufarbeitung

Die Mäuse wurden mit 100 µL/10 g Körpergewicht Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht, Ceva) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht, Medistar) narkotisiert. Nach Überprüfen der Reflexe an Pfoten, Schnurrhaaren und Augen wurde Blut entnommen. Nach 30 min Inkubation in einem 1,1 mL Probengefäß mit Serum-Z-Gel (Sarstedt) wurde das Blut bei 4000 G für 10 min zentrifugiert und das Serum bei -80 °C eingefroren. Die narkotisierten Mäuse wurden transkardial mit DPBS oder 3,7 % Formalin-Lösung perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen und entweder für immunhistochemische Färbungen in 3,7 % Formalin-Lösung bei 4 °C post-fixiert, in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom (Jung supercut 2065, Leica) in 5 µm dicke Schnitte geschnitten oder für durchflusszytometrische Analysen mit Hilfe eines 15 cm³ Glashomogenisators (VWR) zerkleinert. Für die *Affymetrix Array* Analyse wurde das Corpus callosum heraus präpariert, mit Isolierungspuffer (Maxwell) grob homogenisiert und in Flüssigstickstoff eingefroren, um den Abbau von *Ribonucleic acid* (RNA) zu verhindern. Für Genexpressionsstudien mittels *Quantitative real-time polymerase chain reaction* (RT-qPCR) wurden die Tiere mit DPBS perfundiert, das Gewebe entnommen und in Schraubdeckelgefäße (Pepqlab) mit 1,4 mm Zirkoniumoxid-Kügelchen (Bertin Technologies) und pepqGOLD TriFast™ (Pepqlab) überführt. Das Gewebe wurde zunächst in Flüssigstickstoff und anschließend bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.4 Methodischer Überblick

Abbildung 4 zeigt die für die Tierexperimente angewendeten histochemischen und molekularbiologischen Methoden. Nach der Perfusion mit DPBS und Formalin wurden die Gehirne entnommen und weiter prozessiert (Kapitel 2.2.1.3). Hämatoxylin/Eosin (HE) und CD3 Färbungen dienen der Untersuchung der Immunzellinfiltration, *Luxol fast blue-periodic acid Schiff* (LFB-PAS) Färbungen des Myelinisierungsstatus,

MATERIAL UND METHODEN

Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) und GFAP Färbungen der Gliose, AQP4 und GFAP Färbungen der Integrität der BHS, APP Färbungen des axonalen Schadens, Färbungen des *Oligodendrocyte transcription factor 2* (OLIG2) und *Anti-Adenomatous Polyposis Coli* (APC) der Analyse von Oligodendrozyten und *Oil Red O* Färbungen der Analyse von Lipidansammlungen. Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen blau und Eosin alle azidophilen Strukturen rot. Mit Hilfe von HE Färbungen kann eine pathologische Ansammlung von Zellen um Blutgefäße herum festgestellt werden, die als „perivaskulärer Cuff“ (PVC) bezeichnet wird. CD3 ist ein Proteinkomplex auf T-Zellen und spielt eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. LFB färbt Lipoproteine des Myelins blau, das Neuropil pink/rosa und Nervenzellen lila an, und durch die PAS Färbung werden Kohlenhydrate magenta gefärbt. IBA1 ist ein zytoplasmatisches Protein in Mikrogliazellen und Makrophagen. AQP4 ist ein Wasserkanalprotein, das sich vor allem auf der Membran von Astrozyten und Ependymzellen befindetet. GFAP ist ebenfalls ein astrozytäres Protein, das sich allerdings als Intermediärfilament im Zytoplasma befindetet. APP ist ein synaptisches Membranprotein von Neuronen und wird anterograd vom Zytoplasma zur Synapse transportiert. Bei funktionsgestörten Axonen ist der Transport unterbrochen und das APP sammelt sich als Sphäroide im Axon an. OLIG2 ist ein Transkriptionsfaktor, der im Zellkern von Oligodendrozyten vorkommt und APC ein Tumorsuppressor, der während Myelinisierung und Remyelinisierung von Oligodendrozyten gebildet wird. *Oil Red O* ist ein fettlöslicher rot färbender Farbstoff, der zum anfärben von Triglyzeriden verwendet wird.

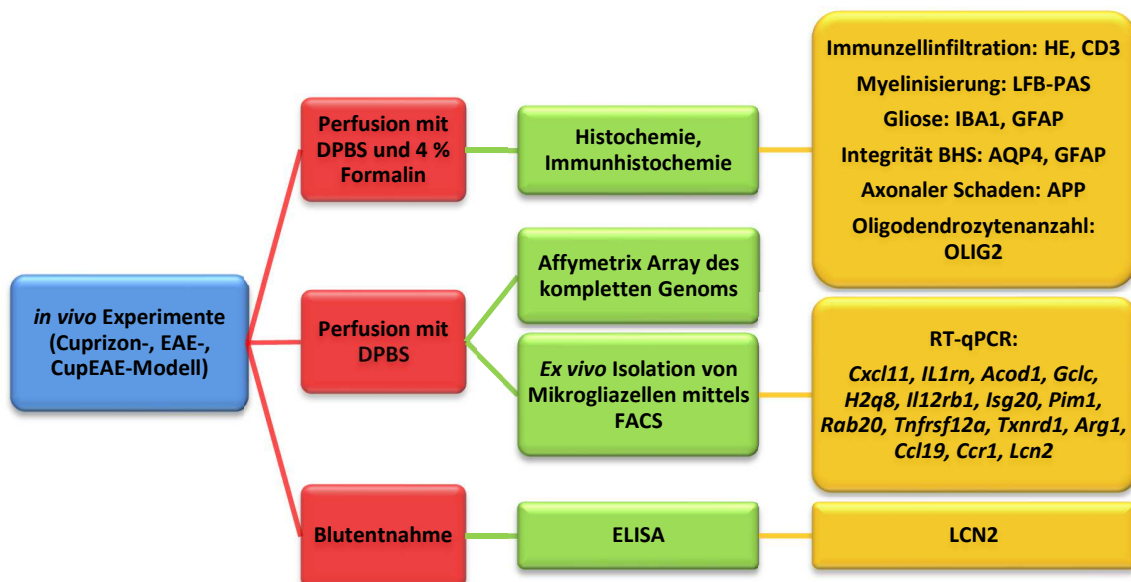


Abbildung 4: Hierarchische Darstellung der *in vivo* Experimente

Aufarbeitung der *in vivo* Experimente sowie dazugehörige methodische Labortechniken.

MATERIAL UND METHODEN

Die Gehirne der Versuchstiere wurden nach der Perfusion mit DPBS entnommen und zum einen für den genomweiten *Affymetrix Array*, zum anderen für die *ex vivo* Isolation der Mikrogliazellen aufgearbeitet (Kapitel 2.2.1.3). Nachfolgende Genexpressionsstudien mittels RT-qPCR dienten der Analyse der Chemokin- und Zytokin-Signatur der isolierten Mikrogliazellen (*Cxcl11*, *Interleukin-1 receptor antagonist (IL1rn)*, *Aconitate decarboxylase 1 (Acod1)*, *Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (Gclc)*, *Histokompatibilität 2 Q-region locus 8 (H2q8)*, *Interleukin 12 receptor beta 1 subunit (Il12rb1)*, *Interferon-stimulated gene 20 (Isg20)*, *Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (Pim1)*, *Ras-related protein rab-20 (Rab20)*, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12a (Tnfrsf12a)*, *Thioredoxin reductase 1 (Txnrd1)*, *Arginase 1 (Arg1)*, *Ccl19*, *Ccr1*, *Lipocalin 2 (Lcn2)*).

Den narkotisierten Mäusen wurde Blut entnommen und daraus das Serum isoliert (Kapitel 2.2.1.3). Das Serum wurde 1:100 verdünnt und für die Analyse von LCN2 mittels ELISA verwendet (Kapitel 2.3.2).

2.2.2 Zellkultur Experimente (*in vitro*)

2.2.2.1 Versuchsgruppen

Während der Experimente wurden die Zellen in einem Medium mit verringerter FKS Konzentration kultiviert („Starvingmedium“). Die OLN93 Zellen wurden in SATO und die BV2 Zellen in DMEM mit 0,5 % FKS (DMEM 0,5 %) kultiviert. Die Zelldichte bei den Experimenten betrug 3×10^5 Zellen/ Well für 6-Well Platten, 5×10^6 Zellen für 10 cm Schalen und $2,3 \times 10^6$ Zellen für 75 cm² Flaschen. Die Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. OLN93 Zellen wurden für 24 h mit Natriumazid (SA, Sigma-Aldrich) oder H₂O ultrapure (up H₂O, Thermo Fisher Scientific) als Vehikel (Veh) behandelt (Kapitel 2.4.1). Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für weitere 24 h mit frischem Medium inkubiert. Dieses Medium wird im

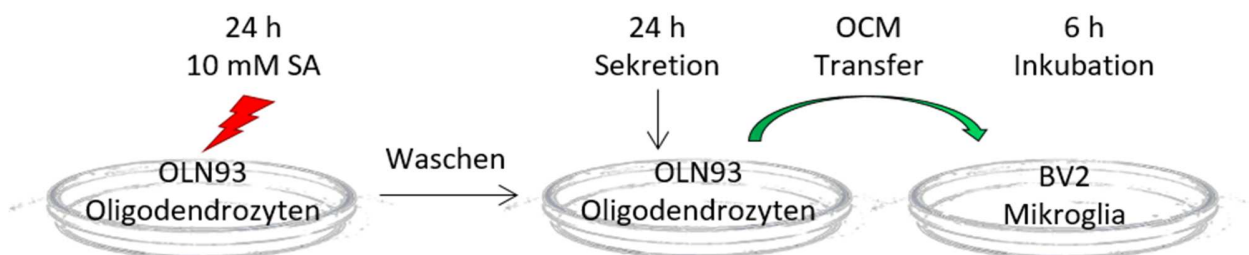


Abbildung 5: Schematische Darstellung der *in vitro* Experimente

Nach 24 h SA-Stimulation wurden OLN93 Zellen gewaschen. Nach weiteren 24 h Sekretionszeit wurde das konditionierte Medium entnommen und damit BV2 Zellen behandelt. Modifiziert übernommen aus [261].

MATERIAL UND METHODEN

Nachfolgenden als oligodendrozyten-konditioniertes Medium (OCM)-SA oder OCM-Veh bezeichnet, je nach Behandlung der OLN93 Zellen. In einem nächsten Schritt wurden BV2 Zellen mit OCM-SA und OCM-Veh behandelt (Kapitel 2.4.3). Die Behandlung mit LPS diente als Positivkontrolle für eine proinflammatorische Aktivierung. In weiterführenden Experimenten wurden BV2 Zellen mit OCM und anti-IL6-Antikörpern (OCM-SA+aIL6 und OCM-Veh+aIL6) oder mit rekombinantem murinen IL6 Protein alleine behandelt. Auch hierbei diente eine Behandlung mit LPS als Positivkontrolle. Die Behandlung mit Starvingmedium DMEM 0,5 % und SATO Medium diente als Negativkontrolle.

2.2.2.2 Methodischer Überblick

Abbildung 6 gibt einen Überblick über die verwendeten labortechnischen Methoden der Zellkultur-Experimente. Der Überstand der behandelten OLN93 Zellen wurde entnommen und ein Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Zellviabilitätsassay durchgeführt, um mögliche toxische Effekte von SA auszuschließen. Die metabolische Aktivität der behandelten OLN93 Zellen wurde mit Hilfe eines *CellTiter Blue* (CTB)-Assays analysiert (Kapitel 2.4.2). Weiterhin wurde mit dem Medium die IL6-Proteinkonzentration mittels ELISA bestimmt (Kapitel 2.3.2). Die RNA der OLN93 Zellen wurde isoliert und in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Mittels RT-qPCRs wurde der Stresslevel der OLN93 Zellen anhand der *DNA damage-inducible transcript 3 (Ddit3)* und *Cyclic AMP-dependent transcription factor 3 (Atf3)* Geninduktion analysiert. Um zu untersuchen, welche Chemokin- und Zytokingene während der Stressreaktion durch die SA-Behandlung von OLN93 Zellen induziert werden, wurde mit der cDNA ein Chemokin und Zytokin Array durchgeführt. Nachfolgende RT-qPCRs dienten dazu, den Chemokin und Zytokin Array zu verifizieren (*Il6*, *Growth differentiation factor 15 (Gdf15)*, *secreted phosphoprotein 1 (Spp1)*, *Leukemia inhibitory factor (Lif)* und *Colony stimulating factor 1 (Csf1)*). Siehe auch Kapitel 2.5 für die Durchführung aller molekularbiologischen Methoden.

Die RNA der behandelten BV2 Zellen wurde isoliert und in cDNA transkribiert. Mittels RT-qPCRs wurde von allen Behandlungsgruppen der BV2 Zellen der Aktivierungsstatus der BV2 Zellen untersucht (*Arg1* und *Inducible nitric oxide synthase 2 (Nos2)*). Die Versuche dienten der Analyse, ob (1) gestresste OLN93 Zellen in der Lage sind, BV2 Zellen zu aktivieren, (2) diese Aktivierung durch die Blockierung von IL6 Proteinen mittels Zugabe von IL6-Antikörpern unterdrückt werden kann und (3) IL6 Protein alleine eine Aktivierung der BV2 Zellen induzieren kann. Zuletzt wurde die Zellmorphologie der BV2 Zellen hinsichtlich Bipolarität und Ramifikation mit Hilfe von Durchlicht-mikroskopischen Bildern analysiert (Kapitel 2.4.4).

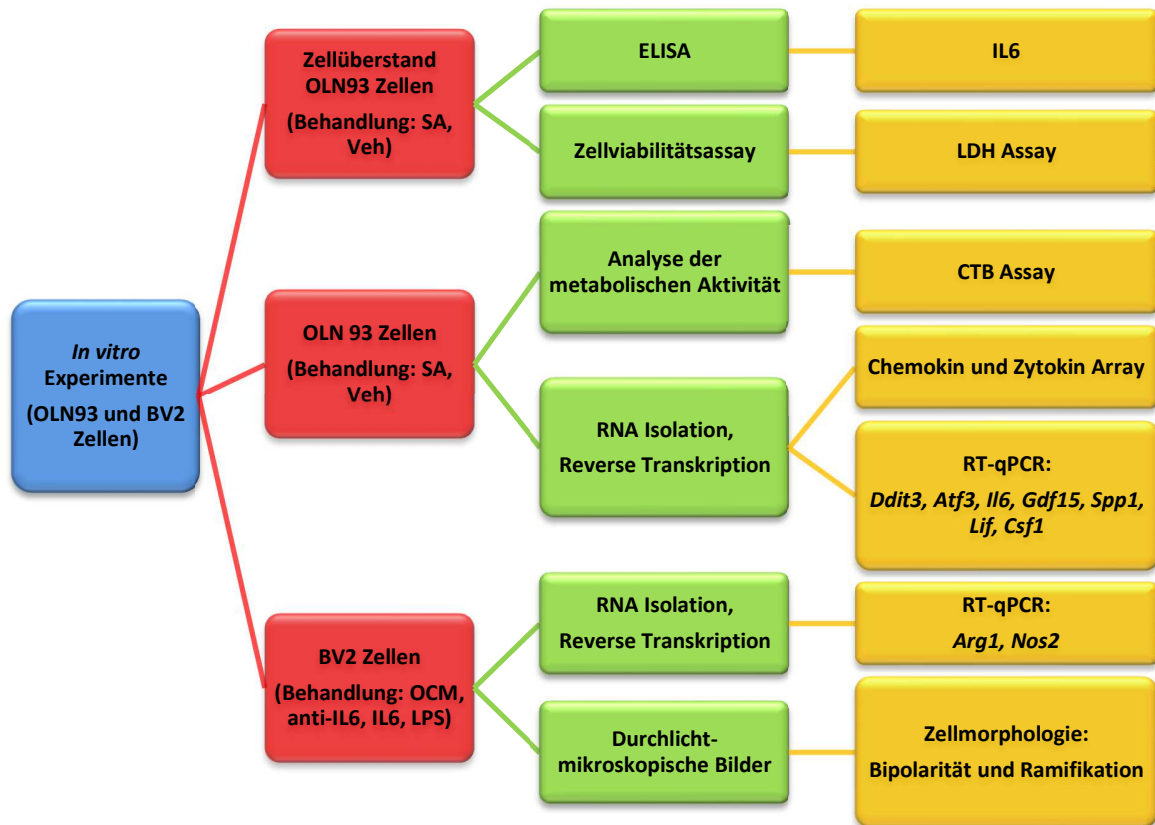


Abbildung 6: Hierarchische Darstellung der *in vitro* Experimente

Aufarbeitung der *in vitro* Experimente sowie methodische Labortechniken der einzelnen Zelllinien.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Histochemische Färbungen

Zu den histochemischen Färbungen gehören die HE Färbung und LFB-PAS Färbung. Die Paraffinschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (4x Xylol, 3x 100 % Ethanol, 2x 96 % Ethanol, 1x 70 % Ethanol) entparaffinisiert und anschließend in destilliertem Wasser rehydriert. Für die HE Färbung wurden die Schnitte für 4 min in Meyer's Hämatoxylin-Lösung inkubiert und die Reaktion darauffolgend mit Leitungswasser gestoppt. Die Inkubation in Eosin-Lösung erfolgte für 30 - 45 s. Für die LFB-PAS Färbung wurden die Schnitte nach Inkubation in 96 % Ethanol über Nacht bei 56 °C in eine LFB-Lösung gestellt. Das überflüssige LFB wurde mit 95 % Ethanol abgespült und die Objektträger nochmals in destilliertem Wasser gewaschen. Die Differenzierung erfolgte in 0,05 % Lithiumcarbonat (Merck) und anschließend 70 % Ethanol. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mittels 0,5%iger PAS-Lösung (Merck) oxidiert und in Schiff-Reagenz (Merck) inkubiert. Nach einem Waschschrift in lauwarmem Leitungswasser wurden die Schnitte

MATERIAL UND METHODEN

ebenfalls für 30 - 45 s mit Eosin-Lösung inkubiert. Für beide Färbungen erfolgten abschließend die Dehydrierung (2x 70 % Ethanol, 2x 96 % Ethanol, 3x 100 % Ethanol, 4x Xylol) und das Einbetten in DePeX (Serva). Für die Auswertung der LFB-PAS Färbungen wurde zunächst die Färbeintensität der Kontrollschnitte betrachtet und auf 100 % gesetzt. Nachfolgend wurden alle gefärbten Schnitte, inklusive der Kontrollschnitte, ausgewertet. Die *Oil Red O* Färbungen wurden nicht von mir persönlich durchgeführt und können aus Scheld und Kollegen 2016 entnommen werden [259].

2.3.2 Immunhistochemische Färbungen

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Paraffinschnitte, wie zuvor in 2.3.1 beschrieben in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend rehydriert. Die Fixierung mit Formalin bewirkt eine Quervernetzung des Gewebes. Um zu gewährleisten, dass die Antigene für die eingesetzten Antikörper optimal zugänglich sind, wurde, wenn nötig, eine Demaskierung der Antigene durchgeführt. Dies geschah entweder durch Kochen für 10 - 20 min in alkalischer Lösung (Tris-EDTA-Lösung, pH 9) oder in saurer Lösung (Citrat-Lösung, pH 6). Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurden die Schnitte mit Normalserum aus der Spezies geblockt, in dem der Sekundärantikörper hergestellt wurde (normales Ziegen- oder Pferdeserum, Vector Labs). Die Schnitte wurden über Nacht mit dem Primärantikörper in entsprechendem Serum inkubiert (Tabelle 1). Da die Farbreaktion mit einer Peroxidase (*horseradish peroxidase* (HRP)) umgesetzt wurde, wurde am Folgetag zunächst die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes mit 0,3 % Hydrogenperoxid (Carl Roth) zerstört. Danach wurde der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper (Pferd-gegen-Maus oder Ziege-gegen-Kaninchen, Vector Labs) in Normalserum für 1 h auf den Schnitten inkubiert. Die Zugabe des Avidin-HRP-Komplexes (Vector Labs) bewirkte die Bindung an den biotinylierten Sekundärantikörper. Die Farbreaktion wurde anschließend mit der Umsetzung des 3,3'-Diaminobenzidin Substrats (DAB, Dako) durch die HRP hervorgerufen und nach 10 min mit Leitungswasser gestoppt. Eine zusätzliche Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurde durchgeführt, wenn der verwendete Primärantikörper an keine nukleären Kompartimente bindet. Abschließend erfolgten die Dehydrierung (2x 70 % Ethanol, 2x 96 % Ethanol, 3x 100 % Ethanol, 4x Xylol) und das Einbetten in DePeX.

Für die Doppelfärbung wurde zunächst IBA1, GFAP oder APC mit dem Peroxidase-System gefärbt. Nach der Farbreaktion mit DAB wurden die Schnitte gewaschen und mit dem 1:4.000-verdünnten anti-IL6 Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der sekundäre anti-Kaninchen Antikörper ist ein Enzym-Polymer, dass mit mehreren Molekülen Alkalischer Phosphatase kovalent gebunden ist (AP-Polymer, Zytomed Systems). Das AP-Polymer wurde für 1 h bei Raumtemperatur auf den Gehirnschnitten inkubiert. Die Umsetzung des Blauen AP Substrats (Vector Laboratories) durch die Phosphatase erzeugte die Farbreaktion. Die Schnitte

MATERIAL UND METHODEN

wurden nicht dehydriert, da sie im wässrigen *Immu-Mount* eingebettet wurden (Thermo Fisher Scientific). Da das Blaue AP Substrat im 680 nm Bereich emittiert, wurden die Schnitte mit dem konfokalen LSM710 Mikroskop von Carl Zeiss mit einem 633 nm Laser angeregt und das Fluoreszenzsignal mit einem 690 – 740 nm Filter detektiert. Die Blockierung sowie die Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgten mit der Blockierungslösung (Zytomed Systems).

Tabelle 1: Eingesetzte Primärantikörper, Sekundärantikörper und Sonden bei immunhistochemischen Färbungen, Fluoreszenzfärbungen und *in situ* Hybridisierungen mit entsprechendem Wirt in dem die Antikörper hergestellt wurden, der eingesetzten Konzentration sowie Bestellnummer und Hersteller.

Antikörper/ Sonde	Wirt	Verdünnungsfaktor	Bestellnummer/ Hersteller
anti-APC	Maus	1:250	OP-80/ Millipore
anti-APP	Maus	1:5.000	MAB348/ Millipore
anti-AQP4	Kaninchen	1:2.000	Sc20812/ Santa Cruz
anti-CD3	Kaninchen	1:4.000	A0452/ DAKO
anti-GFAP	Kaninchen	1:1.000	RPCA-GFAP/ Encore
anti-GFAP	Ziege	1:200	sc6170/ Santa Cruz
anti-IBA1	Kaninchen	1:10.000	019-19741/ WAKO
anti-IBA1	Maus	1:1.000	MABN92/ Millipore
anti-IL6	Kaninchen	1:50	ab7737/ Abcam
anti-IL6	Kaninchen	1:4.000	ab6672-200/ Abcam
anti-NEUN	Maus	1:5.000	MAB377/ Millipore
anti-NRF2	Kaninchen	1:100	GTX103322/ GeneTex
anti-OLIG2	Kaninchen	1:2.000	AB9610/ Millipore
anti-OLIG2	Maus	1:1.000	MABN50/ Millipore
anti-PLP	Maus	1:5.000	MCA839G/ Bio-Rad
Pferd-anti-Maus IgG	Pferd	1:50	BA-2000/ Vector Labs
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:50	BA-1000/ Vector Labs
Pferd-anti-Ziege IgG	Pferd	1:50	BA-9500/ Vector Labs
594 anti-Maus IgG	Ziege	1:500	A11032/ Thermo Fisher Scientific
594 anti-Ziege IgG	Esel	1:500	A11058/ Thermo Fisher Scientific
488 anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:500	A11008/ Thermo Fisher Scientific
488 anti-Kaninchen IgG	Esel	1:500	A21206/ Thermo Fisher Scientific
488 anti-Maus IgG	Ziege	1:500	A21121/ Thermo Fisher Scientific
ViewRNA™ Probe Ubc	-	1:50	VB1-10202/ Thermo Fisher Scientific
ViewRNA™ Probe Olig2	-	1:50	VB6-14496/ Thermo Fisher Scientific
ViewRNA™ Probe Il6	-	1:50	VB1-10012/ Thermo Fisher Scientific

2.3.1 Fluoreszenzfärbungen

Der erste Tag der Fluoreszenzfärbungen war identisch mit dem der immunhistochemischen Färbungen. Am Folgetag wurden die Schnitte für 2 h mit einem entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (Tabelle 1). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) sichtbar gemacht und die Schnitte in *Immu-Mount* eingebettet. Für Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen wurde eine *Immunofluorescence anti-fading agent* (IFF)-Lösung zum Blocken und für die Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper verwendet (Gemisch aus bovinem Serumalbumin und fötalem Kälberserum). Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und zur längeren Lagerung bei -20 °C eingefroren.

2.3.2 ELISA

Die Proteinbestimmung von IL6 bzw. LCN2 erfolgte mit Hilfe der quantitativen Sandwichmethode mit den Quantikine ELISA Immunoassays von R&D Systems. Die 96-Well-Mikroplatten sind vom Hersteller mit anti-IL6 bzw. anti-LCN2 Antikörpern beschichtet worden. Alle Reagenzien wurden vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und laut Herstellerangaben vorbereitet. Dies beinhaltete die Rekonstitution des IL6- bzw. LCN2-Proteins für die Positivkontrolle in destilliertem Wasser, das Verdünnen des Waschpufferkonzentrats mit destilliertem Wasser, das Mischen der beiden Farbreagenzien A und B für die Substratlösung 15 min vor der Verwendung, das Verdünnen des *Calibrator* Verdünnungsmittels mit destilliertem Wasser und die Rekonstitution des IL6- bzw. LCN2-Standards mit dem *Calibrator* Verdünnungsmittel. Die Standardreihe wurde durch eine 1:2 Verdünnung des höchsten Standardwerts (für IL6 4.000 und für LCN2 5.000 pg/mL) mit dem *Calibrator* Verdünnungsmittel bis zu einer Konzentration von 62,5 für die IL6 Bestimmung und 78,1 pg/mL für die LCN2 Bestimmung hergestellt. Die Standardreihe wurde in Doublets auf die Mikroplatte pipettiert. Für die IL6 Bestimmung wurden 100 µL des Mediums unverdünnt, für die LCN2 Bestimmung 100 µL des 1:100 verdünnten Serums mit Verdünnungsmittel auf die Mikroplatte pipettiert. Die Standardreihe und die Proben wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µL des IL6- bzw. LCN2-Konjugats auf die Mikroplatte pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Substratlösung im Dunkeln auf die Mikroplatte pipettiert und es erfolgte für 30 min die Umsetzung des Substrats. Die Reaktion wurde mit der vom Hersteller gelieferten Stopp-Lösung beendet. Die Absorption wurde mit dem Infinite® M200 (Tecan) und der Software i-control (Tecan) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge bei 540 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe der Absorption und bekannten Proteinmenge der Standardreihe ermittelt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Behandlung der OLN93 Zellen und OCM Gewinnung

OLN93 Zellen wurden 24 h lang mit 10 mM SA oder Veh behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit frischem SATO inkubiert. Die Phase zwischen dem frischen Mediumwechsel und der nachfolgenden Sammlung des Mediums wird als Sekretionsphase bezeichnet. Nach 24 h wurde das OCM zentrifugiert und durch ein 20 µm Zellsieb (Corning Inc.) gefiltert, um mögliche Zellen und Zellrückstände zu entfernen.

2.4.2 Assay für Zellviabilität und metabolische Aktivität

Mögliche toxische Effekte von SA wurden mit Hilfe eines LDH- und CTB-Assays untersucht. Hierzu wurden der *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega) und der *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* (Promega) durchgeführt. Eine schwarze 96-Mikrowellplatte mit transparentem Boden wurde mit der gleichen Zelldichte und der gleichen Behandlung wie im Versuch (Kapitel 2.4.1) vorbereitet. Als Kontroll-Gruppen dienten zum einen Zellen der Lyse-Gruppe, die mit einer Lyse-Lösung behandelt wurden, und zum anderen Medium ohne Zellen (Kontrollmedium). Das gebrauchsfertige CTB-Reagenz wurde im Dunkeln auf 37 °C gebracht und anschließend 10 µL des Reagenz zu jedem Well pipettiert. Die Mikroplatte wurde für 2 h in den Inkubator gelegt und nach erfolgtem Farbumschlag die Fluoreszenz des CTB-Reagens bei 560 nm und einem Korrekturwert von 590 nm in dem Infinite® M200 (Tecan) gemessen und mit der Software i-control (Tecan) dargestellt. Für die Auswertung des CTB-Assays wurde zunächst von allen gemessenen Werten die Eigenfluoreszenz des Kontrollmedium subtrahiert. Anschließend wurden alle gemessenen Werte auf die Vehikel-Gruppe normiert. Für den LDH-Assay wurden jeweils 30 µL des Mediums vor Durchführung des CTB-Assays in eine neue 96-Mikrowellplatte überführt. Das CytoTox 96-Reagenz wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und je 30 µL zu jeder Probe pipettiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min. Zur Beendigung der Reaktion wurden jeweils 30 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung dazu pipettiert. Die Absorption des LDH im Medium wurde bei 490 nm mit dem Infinite® M200 (Tecan) gemessen und der Software i-control (Tecan) dargestellt. Für die Auswertung des LDH-Assays wurde zunächst von allen gemessenen Werten die Eigenadsorption des Kontrollmediums subtrahiert. Anschließend wurden alle gemessenen Werte auf die Lyse-Gruppe normiert.

2.4.3 Behandlung der BV2 Zellen

Nach Zentrifugation und Filtern des OCM wurden BV2 Zellen 6 h lang mit dem OCM der SA-stimulierten Oligodendrozyten (OCM-SA), mit dem OCM der Veh-stimulierten Oligodendrozyten (OCM-Veh), mit 100 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich), mit 1 µg/mL anti-IL6 Antikörpern (R&D Systems) oder mit 10, 30 oder 50 ng/mL rekombinantem murinen IL6 (Peprotech) behandelt. Vor der Behandlung der BV2 Zellen mit den IL6 Antikörpern erfolgte eine Inkubation des OCM mit anti-IL6 für 1 h bei 37 °C. Die Behandlung von BV2 Zellen mit SATO oder DMEM 0,5 % dienten als Negativkontrolle.

2.4.4 Zellmorphologische Analysen: Bipolarität und Ramifikation

Die Morphologie der OCM-SA, OCM-Veh, DMEM 0,5 %, SATO und LPS behandelten BV2 Zellen wurde hinsichtlich Bipolarität und Ramifikation untersucht. Hierfür wurden in der Mitte eines jeden Wells eine Durchlicht-mikroskopische Aufnahme der Zellen in einer 20X Vergrößerung mit dem Leica DMI 6000 B Mikroskop und der Software LAS X (Leica) gemacht. Die Bilder wurden mit der Software *VirtualBlind* (Entwickler: Daniel Fandel, RWTH Aachen) randomisiert umbenannt und alle diejenigen Zellen gezählt, die vollständig im Bild zu sehen waren. Für die Bestimmung der Bipolarität wurden die Zellen als bipolar angesehen, deren längste Zellausdehnung mindestens doppelt so lang war, wie die Zellausdehnung im 90° Winkel dazu (Abbildung 7 A). Für die Bestimmung der Ramifikation wurden die Fläche und die Projektionsfläche der Zelle gemessen (Abbildung 7 B). Beide Messungen wurden in Relation gesetzt und ein Ramifikations-Index gebildet. Ein Ramifikations-Index von 1 bedeutet, dass die Zelle keine Fortsätze gebildet hat. Geht der Wert des Ramifikations-Index Richtung 0, nimmt die Ramifikation zu.

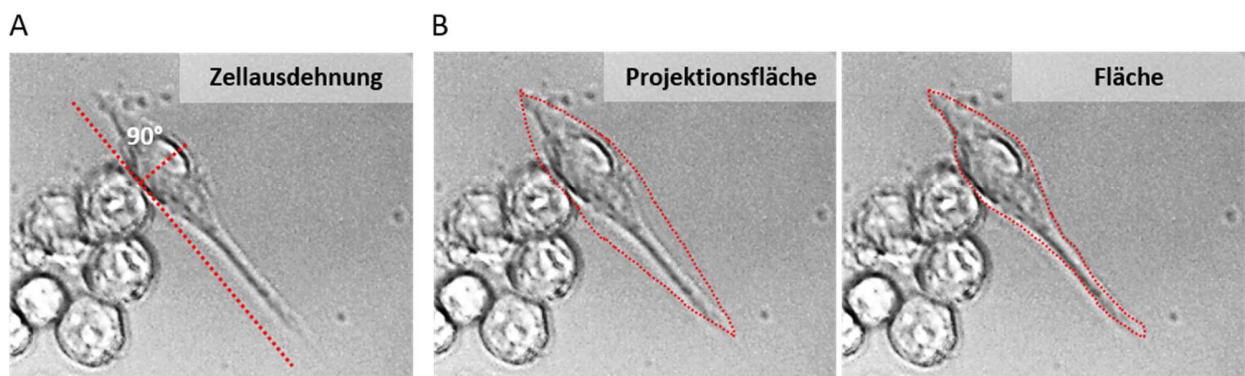


Abbildung 7: Auswertungsstrategie der Bipolarität und Ramifikation

(A) Zur Ermittlung der Bipolarität wurde die maximale Zellausdehnung und die größte Zellausdehnung im 90° Winkel dazu gemessen. **(B)** Der Ramifikations-Index wurde mittels Projektionsfläche und Fläche der Zelle bestimmt.

2.5 Molekularbiologie

2.5.1 RNA Isolation, reverse Transkription, PCR und RT-qPCR

Das Gewebe in den Schraubdeckelgefäßen mit 1,4 mm Zirkoniumoxid-Kügelchen und PeqGold wurde mit dem Precellys 24 Homogenisator (Bertin Technologies) zerkleinert. Um die Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe sicher zu stellen, erfolgte anschließend eine Inkubation des Gewebes für 5 min bei Raumtemperatur. Die Zellen der Zellkulturexperimente wurden nach Behandlungsende mit PeqGold auf Eis lysiert. Das homogenisierte Gewebe und die lysierten Zellen wurden anschließend mit 200 µL Chloroform (Carl Roth) gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 12.000 G und 4 °C wurde die RNA-enhaltende wässrige Phase in ein neues Eppendorf Tube überführt und mit demselben Volumen Isopropanol (Carl Roth) gemischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Proben für 1 h lang bei 12.000 G und 4 °C zentrifugiert, um die RNA zu fällen. Das Pellet wurde dreimal mit 75 % Ethanol (Carl Roth) gewaschen und anschließend getrocknet. Es wurde in einem Volumen von 12 µL up H₂O aufgenommen und die RNA Menge mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) gemessen. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der Software ND-1000 V3.8.0 (Thermo Scientific). Die Proben wurden mit up H₂O verdünnt, sodass die RNA Konzentration 1 µg/ 11 µL betrug.

Für die reverse Transkription erfolgte nach einer Denaturierung der RNA bei 70 °C eine Inkubation auf Eis. Ein Mastermix bestehend aus Puffer (Thermo Fisher Scientific), Dithiothreitol (DTT) (Thermo Fisher Scientific), Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix (Bioline), random Primer (Thermo Fisher Scientific) und dem Enzym *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) (Thermo Fisher Scientific) wurde den Proben hinzugefügt und bei 37 °C inkubiert. Um die M-MLV zu inaktivieren, wurden die Proben bei 70 °C inkubiert. Zur Kontrolle, dass in allen Proben die RNA zur cDNA umgeschrieben wurde und sich keine genomische DNA darin befindet, wurde eine PCR mit Exon-Intron-spannenden Primern eines Referenzgens (Maus: *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (HPRT), Ratte: *cyclophilin A* (CycloA)) durchgeführt. Bei der Transkription von genomischer DNA in mRNA werden die sich zwischen Exons befindlichen Introns herausgeschnitten. Da Exon-Intron-spannende Primer bei der PCR zwei Exons umfassen, fallen Proben mit genomischer DNA-Kontamination nach der PCR in der Gelelektrophorese aufgrund der vorhandenen Introns durch ein größeres Produkt als ohne genomische DNA-Kontamination auf. Der Mastermix der PCR setzte sich aus up H₂O, PCR Puffer (Thermo Fisher Scientific), MgCl₂ (Bioline), dNTP Mix (Bioline), dem entsprechenden Primerpaar (Thermo Fisher Scientific) und dem Enzym BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline) zusammen. Der Mastermix wurde in die Multiwells pipettiert und je 1 µL der Probe in Doublets hinzugefügt. Folgendes PCR Protokoll wurde mit dem *Mastercycler ep gradient S* (Eppendorf) durchgeführt: 3 min 95 °C, 35 Zyklen von 40 s 95 °C, 40 s *Annealing*-Temperatur (T_a) und 45 s 72 °C, abschließend 45 s 72 °C. Mit Hilfe

MATERIAL UND METHODEN

einer Gelelektrophorese wurde die DNA sichtbar gemacht. Hierfür wurde ein 2%iges Agarosegel nach Zugabe von 0,01 % des DNA Markers Midori-Grün (Biozym) in eine Gelelektrophorese Kammer gegossen und mit Kämmen aushärten lassen. Die Kämmen wurden entfernt und das Agarosegel in die Kammer des Gelelektrophoresegeräts (Power Pac 300, Bio-Rad) mit 1X TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) Puffer gesetzt. In die Taschen des Agarosegels wurden 12 μ L der Proben und 5 μ L der DNA-Leiter *Easy Ladder I* (Bioline) pipettiert, die Banden von 100, 250, 500, 1.000 und 2.000 Basenpaaren anzeigt. Das elektrische Feld wurde mit Hilfe von zwei Elektroden erzeugt und das Programm auf 120 V und 20 min eingestellt. Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden in einem Geldokumentationssystem (E-BOX VX2, Vilber) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Für die Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR wurde zunächst aus allen Proben eine Standardreihe hergestellt. Dazu wurde das gleiche Volumen aller Proben eines Versuchs gemischt (100 % Standard) und in nachfolgenden Schritten 6-mal 1:2 mit up H₂O bis zu einem Standardwert von 1,5625 % verdünnt. Das verbleibende Volumen der Proben wurde mit up H₂O nochmals 1:10 verdünnt. Der Mastermix setzte sich aus SYBR Green (Bimake), up H₂O und dem jeweiligen Primerpaar zusammen. Alle verwendeten Primer wurden mit 10 nmol eingesetzt. Die im SYBR Green enthaltene Polymerase ist eine hot-start Polymerase. Um die Polymerase zu aktivieren, beinhaltet das Protokoll zu Beginn eine Phase bei 95 °C für 10 min. Insgesamt lief das nachfolgende Protokoll für 40 Zyklen mit dem CFX Connect™ Real-Time Detektionssystem (Bio-Rad): 15 s 95 °C, 30 s T_a, 30 s 72 °C, 1 min 95 °C, 30 s 55 °C, 1 min 95 °C. Die Genexpressionswerte wurden mittels $\Delta\Delta$ Ct Methode relativ zu dem jeweiligen Referenzgen errechnet. Weiterhin wurden die relativen mRNA Werte der gemessenen Gene in Relation zur Kontrolle eines jeden Versuchs gesetzt. Alle verwendeten Primerpaare mit Sequenz und T_a sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Bei Genexpressionsstudien verwendete Primersequenzen und die T_a (m = Maus, r = Ratte)

Name	Vorwärts-Primer 5'- zu 3'-Ende	Rückwärts-Primer 3'- zu 5'-Ende	T_a
m Acod1	ACTCAGACTAAGCCCTTCAT	GGAAGCTCTTAAAGGCCACAT	64
m Arg1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	65
m β -Aktin	AAGGCCAACCGTGAAGAGAT	GTGGTACGACCAGAGGCATAC	60
m CCL19	ACCACACTAAGGGGCTATCAG	TTCTTCAGTCTTCGGATGATGC	63
m CCR1	AAGCCGTGCGTCTGATATTTG	TGCTCACACTGATTGGTGAATAG	64
m CXCL10	CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC	GGCTCGCAGGGATGATTTCAA	63
m CXCL11	TCTGCTGTCTTGAACATGC	CGTGTGCCTCGTGATATTTG	60
m GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	65
m GCLC	GGGGTGACGAGGTGGAGTA	GTTGGGGTTTGCCTCTCCC	60
m GFAP	GAGATGATGGAGCTCAATGACC	CTGGATCTCCTCCTCCAGCGA	60
m H2Q8	GTCAGTCGACGAATCCCC	CAGTGTGGAAATACCGCAGC	57
m Hmox1	AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA	GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA	62
m HPRT	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	CACAGGACTAGAACACCTGC	62
m ICAM-1	GTGATGCTCAGGTATCCATCCA	CACAGTTCTCAAAGCACAGCG	63
m IL12r β 1	ATGGCTGCTGCGTTGAGAA	AGCACTCATAGTCTGTCTTGA	64
m IL1rn	CCAGCTCATTGCTGGGTACT	TTCTCAGAGCGGATGAAGGT	65
m IL6	GATACCACTCCCAACAGACCTG	GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA	64
m ISG20	CCTGAAGGAGGATATGAGCAAGT	CCCGCCAGTTGTTCTGGAT	60
m KEAP1	GGCAGGACCAGTTGAACAGT	CATAGCCTCCGAGGACGTAG	60
m LCN2	GCAGGTGGTACGTTGTGGG	CTCTTGAGCTCATAGATGGTGC	65
m NOS2	ACATCGACCCGTCACAGTAT	CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC	64
m NQO1	CTACCCCCAGTGGTGATAGAAA	AGAGAGTGCTCGTAGCAGGAT	61
m NRF2	CCCAGCAGGACATGGATTGA	AGCTCATAGTCTTCTGTCCGC	60
m Pim1	CTGGAGTCGCAGTACCAGG	CAGTTCTCCCAATCGGAAATC	60
m Rab20	GGGAGCAGTTTCATGGTCTGG	GCAGTCATTGTTGGCTGTTTC	64
m TNFRSF12a	GTGTTGGGATTCGGCTTGGT	GTCCATGCACTTGTGAGGTC	60
m TxnRD1	GGGCTTCCACGTGCTGGGTC	TCCCCAGAGCGCTTCGTCA	60
m VCAM-1	AGTTGGGGATTCGTTGTTCT	CCCCTCATTCTTACCACC	63
r ATF3	ACTGCGTTGTCCACTCTGT	TCATCTGAGAATGGCCGGGA	65
r Ddit3	TGTTGAAGATGAGCGGGTGG	GCTTTCAGGTGTGGTGGTGT	65
r CSF1	AGCAAGGAAGCGAACGAAC	ATGTGGCTACAGTGTCCGA	57
r GDF15	TCAGCTGAGGTTCTGCTGTTC	GCTCGTCCGGGTTGAGTTG	64
r IL18	GGACTGGCTGTGACCCTATC	TGCTCTGGCACACGTTTCTG	60
r IL6	TCTCTCCGCAAGAGACTTCCA	ATACTGGTCTGTTGTGGGTGG	65
r LIF	TTTGCCGTCTGTGCAACAAG	TGGACCACCGCACTAATGAC	65
r SPP1	CCAGCCAAGGACCAACTACA	TCTCCTCTGAGCTGCCAAAC	64

2.5.2 Affymetrix GeneChip® Array

Wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, wurde das Gehirn nach transkardialer Perfusion mit DPBS entnommen und das Corpus callosum herauspräpariert. Das Gewebe wurde in Lyse Puffer des RSC miRNA Tissue Kit (Maxwell) homogenisiert, unverzüglich in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei - 80 °C zwischengelagert. Die weitere Prozessierung wie RNA Isolation, Reverse Transkription und *Affymetrix Array* Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. B. Denecke (*Chip Facility* IZKF Aachen, RWTH Aachen). Für die Auswertung dienten die Werte der Kontroll-Gruppe als Referenz, an die die Cuprizon- und CupEAE-Gruppe normiert wurde. Die Werte werden als x-fache Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (*Fold Change*) angegeben.

2.5.3 Chemokin- und Zytokin-Array

Die RNA der Zellen aus der Veh- und der SA-Gruppe wurde mit dem säulenbasierten RNeasy® Micro Kit (Qiagen) bei Raumtemperatur isoliert. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe des RLT Puffers lysiert und anschließend mit dem Precellys 24 Homogenisator homogenisiert. Die Waschschrte wurden mit 70 % Ethanol, RW1 Puffer, RPE Puffer und 80 % Ethanol; und der DNase Verdau mit DNase I Inkubationsmix durchgeführt. Die Elution erfolgte mit RNase freiem Wasser in einer Zentrifuge bei einer maximalen Beschleunigung von 1.600 G. Der RNA Gehalt wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 gemessen, mit der Software ND-1000 V3.8.0 ausgewertet und anschließend 0,5 µg der RNA mit dem *RT2 First Strand Kit* (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde die genomische DNA eliminiert, dann folgte die reverse Transkription mittels RE3 Reverse Transkriptase Mix. Eine PCR mit CycloA diente dem Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA. Die Chemokin und Zytokin Expression wurde mit Hilfe des *RT2 Profiler PCR Arrays* (Qiagen) analysiert. Hierfür wurde die cDNA mit RT2 SYBR Green Mastermix und RNase freiem Wasser gemischt und in jedes Well des *Arrays* pipettiert. Der *Array* wurde mit einer Folie bedeckt und Luftblasen durch Zentrifugation entfernt. Die PCR erfolgte mit dem CFX Connect™ Real-Time Detektionssystem mit folgendem Protokoll: Ein Zyklus 10 min 95 °C, dann 40 Zyklen 15 s 95 °C und 1 min 60 °C. Die Ergebnisse wurden anschließend im Datencenter von Qiagen analysiert (siehe auch: <https://www.qiagen.com/de/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page>). Für die Auswertung dienten die Werte der Veh-Gruppe als Referenz, an die die SA-Gruppe normiert wurde. Die Werte werden mit dem *Fold Change* angegeben.

2.5.4 *In situ* Hybridisierung

Für doppelte *in situ* Hybridisierungen wurde der *ViewRNA™ ISH Tissue 2-Plex Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) und die Sonden *ViewRNA™ Probe Olig2, Il6 und Ubc* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Alle für die Durchführung verwendeten Reagenzien, das Xylol, das 100 % Ethanol und die 3,7 % Formalin-Lösung ausgenommen, wurden vom Hersteller bereitgestellt. Die am Vortag hergestellten Paraffinschnitte wurden 1 h bei 60 °C gebacken und anschließend zweimal für 5 min in Xylol und zweimal für 5 min in 100 % Ethanol entparaffiniert. Die Schnitte wurden anschließend für 5 – 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Um das Auslaufen der Lösungen auf den Schnitten zu verhindern, wurde mit einem Dako Pen (Dako) eine hydrophobe Grenze gezogen. Die Antigene wurden für 10 min bei 90 – 95 °C in der *Pretreatment*-Lösung demaskiert. Ab nachfolgendem Schritt wurden alle weiteren Inkubationen, wenn nicht anders beschrieben, im Hybridisierungssystem StatSpin® ThermoBrite® S500 (Abbott) bei 40 °C durchgeführt. Alle Reagenzien, die für die Inkubation bei 40 °C verwendet wurden, wurden vor Verwendung auf 40 °C vorgewärmt. Nach Demaskierung erfolgten für 20 min ein Proteaseverdau und für 5 min eine Fixierung mit 10%iger Formalin-Lösung. Die Fluorophor-konjugierten Sonden für Olig2 (Sonde 6) und Il6 (Sonde 1) wurden 1:50 in „Probe Set Diluent QT“ verdünnt („Working Probe Solution“) und für 3 h bei 40 °C auf den Schnitten inkubiert (Tabelle 1). Ein Schnitt mit der Ubiquitin Sonde 1:50 in *Probe Set Diluent QT* verdünnt diente als Positivkontrolle (*Working Probe Solution Ubc*), ein Schnitt mit nur *Probe Set Diluent QT* als Negativkontrolle. Über Nacht wurden die Schnitte in *Storage Buffer* inkubiert, um ein Austrocknen zu verhindern. Am Folgetag wurden die Schnitte für 25 min in *PreAmplifier Mix QT* und 15 min in *Amplifier Mix QT* inkubiert, um das Sonden-vermittelte Signal zu verstärken. Ab nachfolgender Inkubation wird im Dunkeln gearbeitet, da die *Label Sonden* an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Die *Label Sonde 6-AP* wurde 1:1.000 in *Probe Diluent QF* verdünnt und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde das entsprechende *Fast Blue Substrat* für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Farbreaktion mit einer 30-minütigen Inkubation der Schnitte mit der Stopp-Lösung *AP Stop QT* ebenfalls bei Raumtemperatur beendet. Die *Label Sonde 1-AP* wurde ebenfalls 1:1.000 in *Probe Diluent QF* verdünnt und für 15 min bei 40 °C im Dunkeln inkubiert. Eine weitere Verstärkung des Signals wurde durch die Inkubation mit der *AP-Enhancer-Lösung* für 5 min bei Raumtemperatur erreicht. Die Farbreaktion erfolgte nach Zugabe des *Fast Red Substrats* für 30 min bei 40 °C. Die Reaktion wurde für 5 min mit einer 3,7%igen Formalin-Lösung bei Raumtemperatur beendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (1:10.000) gefärbt und die Schnitte anschließend in *Immu-Mount* eingebettet. Die Bilder wurden mit dem konfokalen LSM710 Mikroskop aufgenommen.

2.6 Durchflusszytometrie und FACS

Den entnommenen Gehirnen der Mäuse wurden der Hirnstamm und die weiße Substanz auf der ventralen Seite entfernt. Die Gehirne wurden in einem Glashomogenisator mit einer Lösung aus *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (Thermo Fisher Scientific), 7,5 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Lösung (Carl Roth) und 45 % Glucose (Carl Roth) (Medium A mit Phenolrot) zerkleinert. Das Homogenat wurde durch ein 70 µm Zellsieb (Corning Inc.) gefiltert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Der Glashomogenisator und das Zellsieb wurden kontinuierlich mit Medium A mit Phenolrot ausgespült, bis das Endvolumen 20 mL betrug. Die Zellsuspension wurde bei 220 G für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 1 mL 22 % Percoll Gradienten Puffer resuspendiert. Die Lösung wurde zu 15 mL mit dem Percoll Gradienten Puffer aufgefüllt und mit 3 mL DPBS überschichtet. Der Percoll Gradient wurde mit der Rotana 460R Zentrifuge (Hettich) bei 950 G für 20 min bei 4 °C, verringerter Beschleunigung (Stufe 4) und ausgeschalteter Bremse (Stufe 0) durchgeführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit dem Myelindebris abgeschüttet und das Zellpellet in 200 µL einer Lösung aus HBSS, 7,5 mM HEPES, 45 % Glucose und 0,5 M EDTA (Carl Roth) (Medium A ohne Phenolrot) resuspendiert. Nach einer Zellzählung in einer 0,0025 cm² Neubauer-Zählkammer mit 0,100 mm Tiefe (Brand®, Sigma-Aldrich) wurde die Zellsuspension mit anti-CD16/32 (1:100) inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die Färbung erfolgte mit anti-CD11b eFluor®450, anti-CD45 APC-eFluor®780 und anti-*Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1* (Ly6C)-*Allophycocyanin* (APC) jeweils 1:100 (Tabelle 3). Es wurden maximal 10⁷ Zellen in einem Volumen von 100 µL gefärbt. Die gefärbte Zellsuspension wurde in Test Röhren (Corning™ Falcon™) überführt und mit Hilfe des BD FACSCanto II und der Software FACSDIVA™ (BD Biosciences) wurden die Zellen zunächst nach Zellgröße (*Forward scatter* (FSC)) und Granularität (*Sideward scatter* (SSC)) sortiert. Tote Zellen wurden durch ein *7-Aminoactinomycin D* (7-AAD)-positives Signal ausgeschlossen. Eine Doubletten-Diskriminierung wurde mittels *FSC-area* und *FSC-height* durchgeführt. Periphere Monozyten waren Ly6C-positiv und wurden ebenfalls ausgeschlossen. Mikrogliazellen wurden durch eine CD11b-positive und CD45-mittlere Färbung bestimmt und in Lyse Puffer (Maxwell) aufgefangen. Eine Reinheitsbestimmung der isolierten Mikrogliazellen wurde regelmäßig durchgeführt und belief sich auf 90 %. Um sicher zu gehen, dass es sich um Mikrogliazellen handelt, wurden Gehirngewebe aus *CX3CR1^{+/GFP}* Mäusen mit den identischen Einstellungen analysiert. Die Isolation der RNA der aufgefangenen Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. B. Denecke (*Chip Facility* IZKF Aachen, RWTH Aachen). Nach reverser Transkription mit dem *Maxima First Strand cDNA Synthese Kit* (Thermo Fisher Scientific) wurde eine Kontamination mit genomischer DNA mittels PCR ausgeschlossen und Genexpressionsstudien mittels RT-qPCR Analysen durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Analysen der

Lymphknoten von Kontroll- und Cuprizone-Tieren und der Milz von EAE- und CupEAE-Tieren wurden nicht von mir persönlich durchgeführt und können aus Scheld und Kollegen 2016 entnommen werden [259].

Tabelle 3: Konjugierte Antikörper mit Wirt und Klon, die bei durchflusszytometrischen Analysen eingesetzt wurden.

Antikörper	Wirt	Klon	Bestellnummer/ Firma
anti-CD16/32	Ratte	2.4G2	553141/ BD Biosciences
anti-LY6C-APC	Ratte	HK1.4	17-5932-80/ eBioscience
anti-CD11b eFluor®450	Ratte	M1/70	48-0112-82/ eBioscience
anti-CD45 APC-eFluor®780	Ratte	30-F11	47-0451-80/ eBioscience
7-AAD	-	-	559925/ BD Biosciences

2.7 Statistik

Statistische Analysen wurden mittels JMP 10 und GraphPad Prism 5 durchgeführt. Alle Daten sind als arithmetische Mittel \pm SEM angegeben. Um auf Varianzhomogenität zu testen, wurde der Bartlett Test durchgeführt. Falls eine Varianzheterogenität vorlag, wurde eine BoxCox Transformation durchgeführt, die unter den entsprechenden Abbildungen angegeben ist. Für Datensätze, in denen 0-Werte vorkamen, wurden alle Daten vor der Boxcox Transformation mit 1 addiert. Auf Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Parametrische Daten von mehr als zwei Versuchsgruppen wurden nachfolgend mit einer one-way ANOVA und nachfolgendem Tukey's post hoc Test für multiple Vergleiche analysiert. Parametrische Daten von zwei Versuchsgruppen wurden mit dem Student's t-Test verglichen. Bei nicht-parametrischen Daten von mehr als zwei Versuchsgruppen wurde der Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunn's Test für multiple Vergleiche durchgeführt. Nicht-parametrische Daten von zwei Versuchsgruppen wurden mit dem Mann-Whitney Test analysiert. Es wurden keine Ausreißer ausgeschlossen und keine Kalkulation des Stichprobenumfangs durchgeführt. Die Analyse der immunhistochemischen und histochemischen Färbungen erfolgte randomisiert durch mindestens zwei verschiedene verblindete Personen. Ab einem $p < 0,05$ werden Unterschiede als statistisch signifikant angesehen. Die folgenden Symbole werden verwendet, um das Signifikanzlevel anzugeben: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant. Ein Stern über einem Balken eines Balkendiagramms bedeutet immer eine bestehende Signifikanz dieser Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Tiermodelle Cuprizon, EAE und CupEAE

3.1.1 Vergleichende Analyse des Cuprizon- und EAE-Modells

3.1.1.1 Klinischer Phänotyp

Das Cuprizon-Modell unterscheidet sich im Vergleich zu dem EAE-Modell hinsichtlich klinischen Krankheitsverlaufs einerseits und pathologischen Parametern, wie der Gliose, Immunzellinfiltration und Demyelinisierung andererseits. Während Cuprizon-Tiere, wie auch Kontrolltiere, einen unauffälligen klinischen Phänotyp zeigten, wurde bei den EAE-Tieren ein auffällig progredienter Phänotyp beobachtet (Abbildung 8 A). Die EAE-Tiere entwickelten nach MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung Paresen des Schwanzes und vor allem der hinteren Extremitäten. Die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten erster Symptome betrug in der EAE-Gruppe $9,70 \pm 0,31$ Tage nach der Immunisierung (Abbildung 8 B). Der höchste durchschnittliche klinische Score lag bei $2,36 \pm 0,11$ (Abbildung 8 C). Der höchste festgestellte klinische Score einzelner Tiere lag bei 4 und betraf 3,6 % der Tiere.

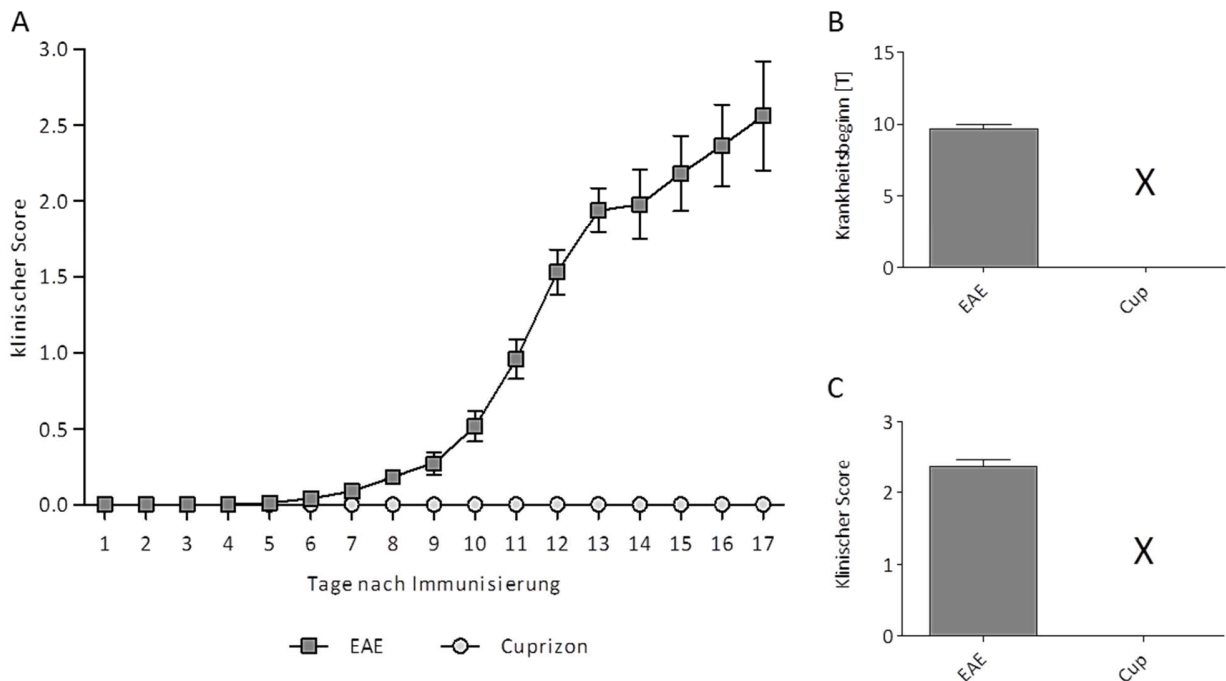


Abbildung 8: Klinisches Scoring, Krankheitsbeginn und maximaler Score von Cuprizon- und EAE-Tieren

(A) Klinisches Scoring von Cuprizon- und EAE-Tieren. **(B)** Durchschnittlicher Krankheitsbeginn von Cuprizon- und EAE-Tieren. **(C)** Maximaler klinischer Score von Cuprizon- und EAE-Tieren. (n = 50)

ERGEBNISSE

3.1.1.2 Mikrogliose und Astrogliose

Beide Tiermodelle unterscheiden sich hinsichtlich der Ausprägung und der Lokalisation der histopathologischen Eigenschaften im ZNS voneinander. Bei Cuprizon-Tieren wurde im Fasertrakt Corpus callosum mittels IBA1 Färbung eine Mikrogliose festgestellt. Die Zellzahl der Mikroglia war mit $625,20 \pm 40,11$ Zellen/mm² im Vergleich zur Zellzahl in EAE- und Kontrolltieren signifikant erhöht (Abbildung 9 A). In der EAE-Gruppe wurden $180,20 \pm 53,61$ Zellen/mm² und in der Kontrollgruppe $59,99 \pm 12,04$ Zellen/mm² gezählt. Die Hypertrophie und die Zunahme von IBA1-positiven Zellen im Corpus callosum ist in repräsentativen immunhistochemischen Bildern in Abbildung 9 D - F deutlich erkennbar. Ähnlich wie im Corpus callosum zeigen Cuprizon-behandelte Tiere auch im Kortex eine signifikante Zunahme IBA1-positiver Zellen mit $182,20 \pm 14,79$ Zellen/mm² verglichen mit der Kontrollgruppe ($77,78$ Zellen/mm²) und der EAE-Gruppe ($85,29 \pm 9,86$ Zellen/mm², Abbildung 9 B). Die Zellzahl IBA1-positiver Zellen im Kortex von EAE-Tieren unterscheidet sich nicht signifikant von der der Kontrollgruppe. Anders stellt sich das Ergebnis der durchgeführten optischen Einstufung der Färbeintensität im Kleinhirn dar (modifiziert übernommen [262]).

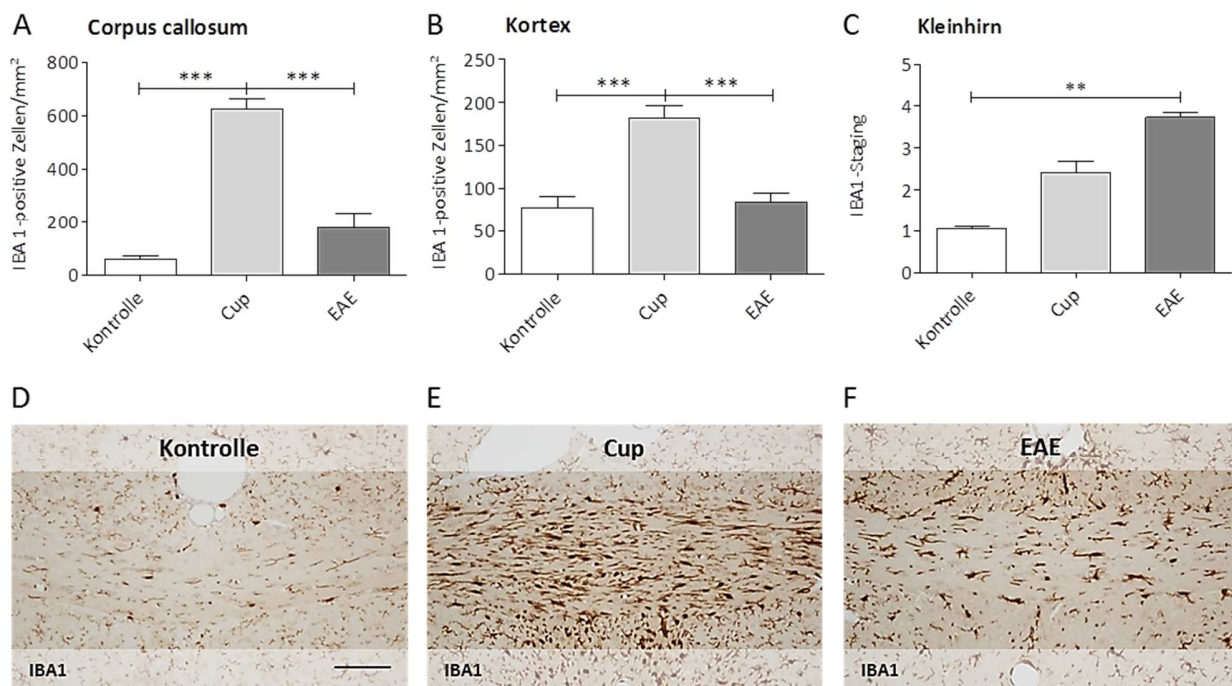


Abbildung 9: Analyse der Mikroglia Aktivierung in Corpus callosum, Kortex und Kleinhirn von Cuprizon- und EAE-Tieren

(A) Auszählung der IBA1-positiven Zellen im Corpus callosum (n = 3 – 6). **(B)** Auszählung der IBA1-positiven Zellen im Kortex (n = 3 – 6). **(C)** Einstufung der IBA1-Färbeintensität im Kleinhirn (n = 4 – 5) (modifiziert übernommen aus [262]). **(D) – (F)** Repräsentative Bilder der IBA1-Färbung von je einem Tier der Kontroll-, Cuprizon- und EAE-Gruppe des medialen Corpus callosum. A, D – F modifiziert übernommen aus Masterarbeit Scheld 2015. Messbalken 100 µm, * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

ERGEBNISSE

Die IBA1-Färbeintensität wurde von 1 bis zu einem Faktor von 5 bewertet. Bei Kontrolltieren wurde ein Faktor von $1,07 \pm 0,04$ festgestellt. Bei EAE-Tieren kann mit einem Faktor von $3,73 \pm 0,11$ verglichen mit Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied in der Färbeintensität der IBA1 Färbung festgestellt werden. Auffällig ist hierbei, dass Cuprizone-Tiere mit einem Faktor von $2,40 \pm 0,28$ verglichen mit Kontrolltieren lediglich eine Tendenz zu einem erhöhten Faktor der IBA1-Färbeintensität aufwiesen (nicht signifikant, Abbildung 9 C). Auch unterscheiden sich die Cuprizone-Tiere hinsichtlich der IBA1-Färbeintensität im Kleinhirn nicht signifikant von den EAE-Tieren.

Die Zellzahl GFAP-positiver Astrozyten war bei Cuprizone-Tieren mit $271,50 \pm 38,99$ Zellen/mm² im Corpus callosum verglichen mit Kontroll- und EAE-Tieren signifikant erhöht (Abbildung 10 A). Im Corpus callosum von Kontroll- und EAE-Tieren wurden, im Gegensatz zu Cuprizone-Tieren, $33,07 \pm 7,62$ Zellen/mm² bzw. $54,47 \pm 6,93$ Zellen/mm² GFAP-positive Zellen gezählt. Die erhöhte Anzahl GFAP-positiver Zellen bei Cuprizone-Tieren gegenüber EAE- und Kontrolltieren wird in den immunhistochemischen Bildern GFAP-gefärbter Hirnschnitte deutlich (Abbildung 10 B – D).

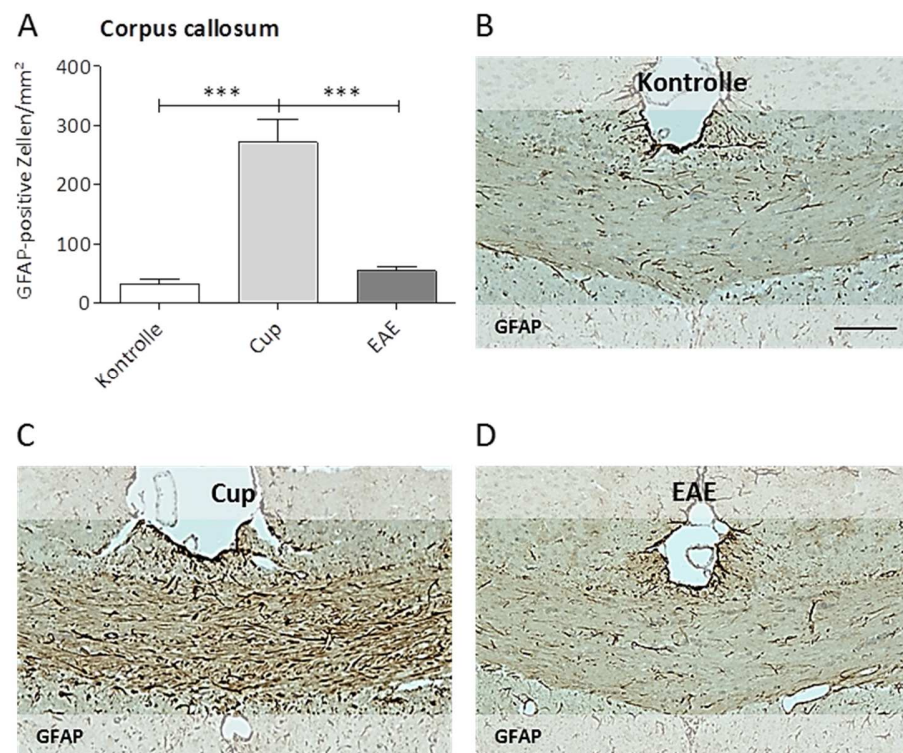


Abbildung 10: Analyse der Astrozyten Aktivierung in Corpus callosum von Cuprizone- und EAE-Tieren

(A) Auszählung der GFAP-positiven Zellen im Corpus callosum (n = 4 – 5). (B) – (D) Repräsentative Bilder der GFAP-Färbung von je einem Tier der Kontroll-, Cuprizone- und EAE-Gruppe des medialen Corpus callosum. Modifiziert übernommen aus Masterarbeit Scheld 2015. Messbalken 100 µm, * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

ERGEBNISSE

3.1.1.3 Oligodendrozytenanzahl, Myelinstatus und axonaler Schaden

Aufgrund seines hohen Anteils an Oligodendrozyten und folglich an Myelin ist das Corpus callosum eine geeignete Struktur, um einen Rückgang der Anzahl an Oligodendrozyten und eine Demyelinisierung zu untersuchen. Weder bei Cuprizin- ($1.777 \pm 75,91$ Zellen/ mm^2), noch bei EAE-Tieren ($1.712 \pm 107,50$ Zellen/ mm^2) wurde, verglichen mit Kontrolltieren ($1.428 \pm 112,20$ Zellen/ mm^2), eine veränderte Zellzahl

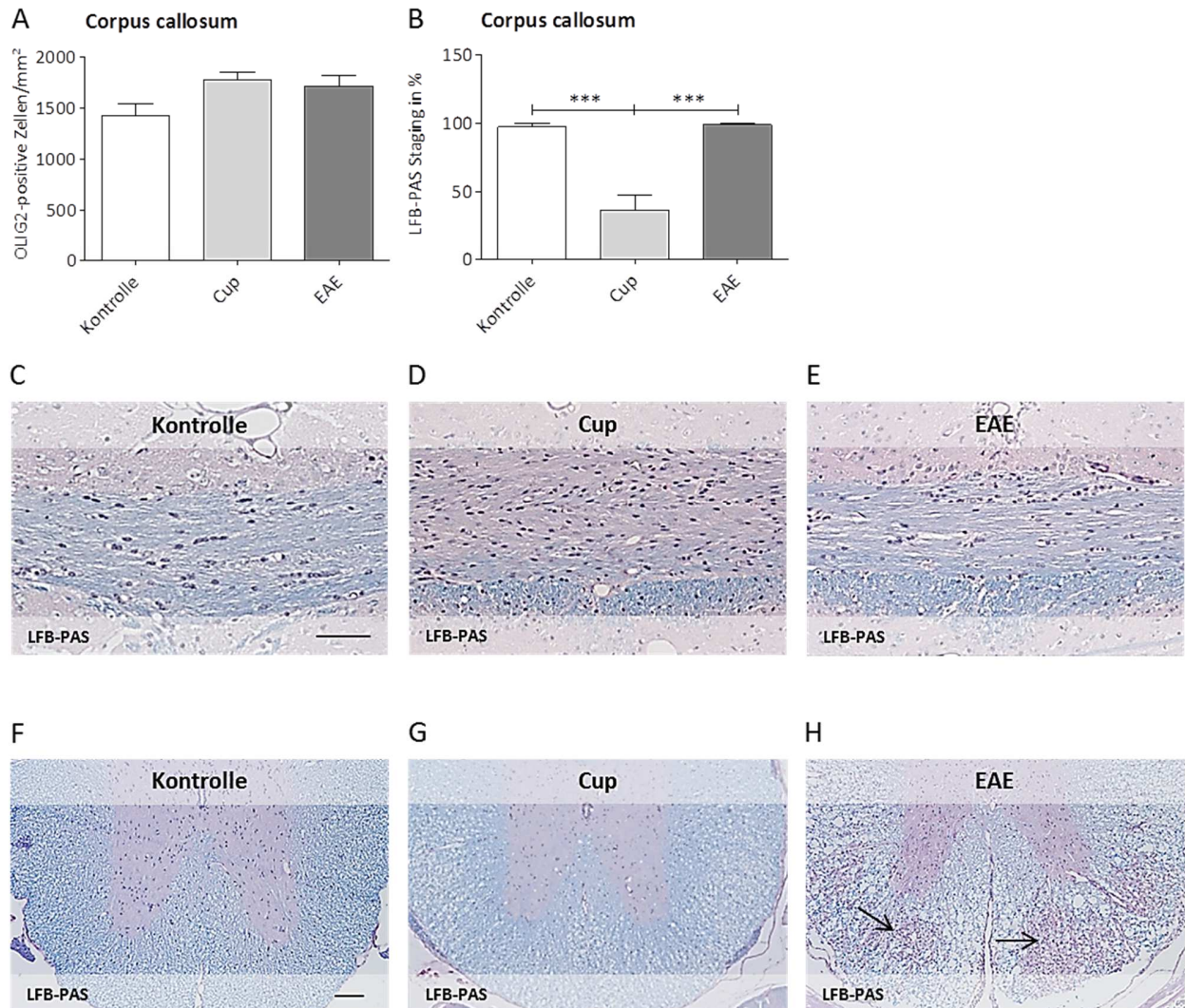


Abbildung 11: Analyse der Demyelinisierung in Corpus callosum, Rückenmark und Kleinhirn von Cuprizin- und EAE-Tieren

(A) Auszählung der OLIG2-positiven Zellen im Corpus callosum ($n = 3 - 6$). **(B)** Einstufung der LFB-PAS-Färbeintensität im Corpus callosum ($n = 3 - 6$). **(C) - (E)** Repräsentative Bilder der LFB-PAS-Färbung von je einem Kontroll-, Cuprizin- und EAE-Tier des medialen Corpus callosum. **(F) - (H)** Repräsentative Bilder der LFB-PAS-Färbung von je einem Tier der Kontroll-, Cuprizin- und EAE-Gruppe des lumbalen Rückenmarks. In Bildern von EAE-Tieren ist neben der Demyelinisierung eine diffuse Ansammlung von Zellen zu sehen (Pfeile). Messbalken $100 \mu\text{m}$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$

ERGEBNISSE

OLIG2-positiver Zellen im Corpus callosum festgestellt (Abbildung 11 A). Eine optische Einstufung der Färbeintensität LFB-PAS-gefärbter Gehirnschnitte diente der Analyse des Myelinisierungsstatus bzw. der Demyelinisierung im Corpus callosum (Abbildung 11 B). Der Myelinisierungsstatus der Kontrolltiere diente als Referenzwert für alle untersuchten Versuchsgruppen. Bei EAE-Tieren ($99,17 \pm 0,83 \%$) wurde, ähnlich wie bei Kontrolltieren ($97,50 \pm 2,50 \%$), eine nahezu 100%ige Myelinisierung im Corpus callosum festgestellt. Bei Cuprizon-Tieren wurde verglichen mit EAE- und Kontrolltieren dagegen eine signifikante Verringerung des Myelinisierungsstatus auf $36,67 \pm 10,64 \%$ festgestellt. Die Demyelinisierung bei Cuprizon-Tieren gegenüber EAE- und Kontrolltieren wird ebenfalls in den immunhistochemischen Bildern LFB-PAS-gefärbter Hirnschnitte gut sichtbar (Abbildung 11 C – E). Im Gegensatz zum Corpus callosum war der Myelinisierungsstatus im Rückenmark von Cuprizon-Tieren nicht von dem der Kontrolltiere zu unterscheiden (Abbildung 11 F, G). Bilder von EAE-Tieren zeigen eine beschädigte und aufgelockerte Morphologie des Myelin (Abbildung 11 H).

Im Rückenmark und im Kleinhirn der EAE-Tiere fällt weiterhin eine pathologische Ansammlung von Zellen auf (Abbildung 11 H, Abbildung 12 B). Bei Betrachtung der Blutgefäße im Kleinhirn von EAE-Tieren sieht man, dass sich diese Zellen teilweise im Virchow-Robin-Raum ansammeln oder sich im Neuropil befinden (Abbildung 12 B, Pfeil). Im Vergleich dazu ist bei Kontrolltieren keine Ansammlung von Zellen um die Blutgefäße herum zu sehen (Abbildung 12 A). Da eine Demyelinisierung oft mit axonalem Schaden einhergeht, wurde dieser mit einer Färbung des Proteins APP ermittelt. Während im Corpus callosum von Kontroll- und EAE-Tieren lediglich $5,68 \pm 2,44$ bzw. $5,21 \pm 2,47$ APP-positive Sphäroide/ mm^2 gezählt wurden,

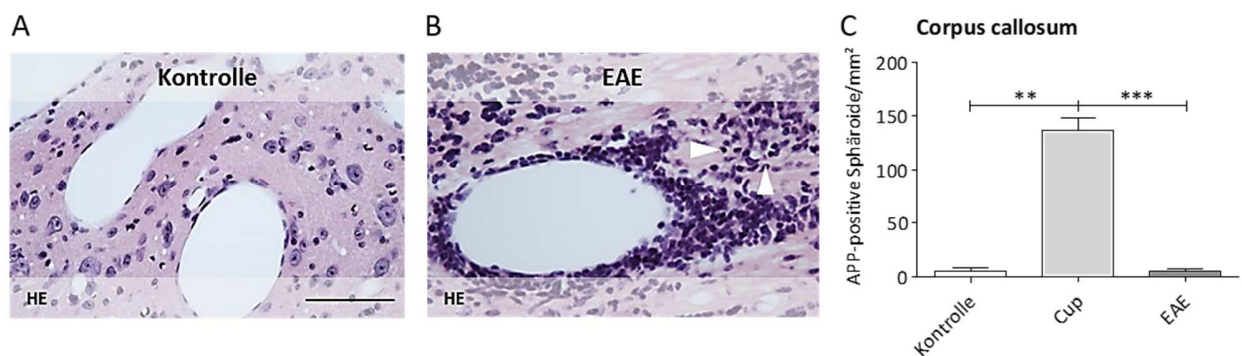


Abbildung 12: Zellansammlung und axonaler Schaden in Cuprizon- und EAE-Tieren

(A) und (B) Repräsentative Bilder einer HE-Färbung von Blutgefäßen im Kleinhirn von Kontroll- und EAE-Tieren. In Bildern von EAE-Tieren ist eine Ansammlung von Zellen in Form eines perivaskulären Cuffs und eine diffuse Verteilung im Neuropil zu sehen (Pfeile). (C) Auszählung der APP-positiven Sphäroide im Corpus callosum ($n = 6 - 12$). Messbalken $50 \mu\text{m}$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$

ERGEBNISSE

war ihre Anzahl bei Cuprizin-Tieren mit $137,20 \pm 10,53$ APP-positiven Sphäroide / mm^2 gegenüber den beiden anderen Gruppen signifikant erhöht (Abbildung 12 C).

3.1.2 Charakterisierung des CupEAE-Modells vergleichend mit dem Cuprizin- und EAE-Modell

3.1.2.1 Klinischer Phänotyp

Der Krankheitsverlauf der CupEAE-Tiere ähnelt sehr stark dem der EAE-Tiere (Abbildung 13 A). Ein signifikanter Unterschied lässt sich weder hinsichtlich der Dauer bis zum Krankheitsbeginn noch hinsichtlich des maximalen klinischen Scores feststellen (Abbildung 13 B, C). Der durchschnittliche Beginn der Krankheitssymptome bei CupEAE-Tieren lag bei $9,61 \pm 0,24$ Tagen und bei EAE-Tieren bei $9,70 \pm 0,31$ Tagen (Abbildung 13 B). Bei CupEAE-Tieren lag der höchste durchschnittliche klinische Score bei $2,34 \pm 0,09$, und bei EAE-Tieren lag er bei $2,36 \pm 0,11$ (Abbildung 13 C).

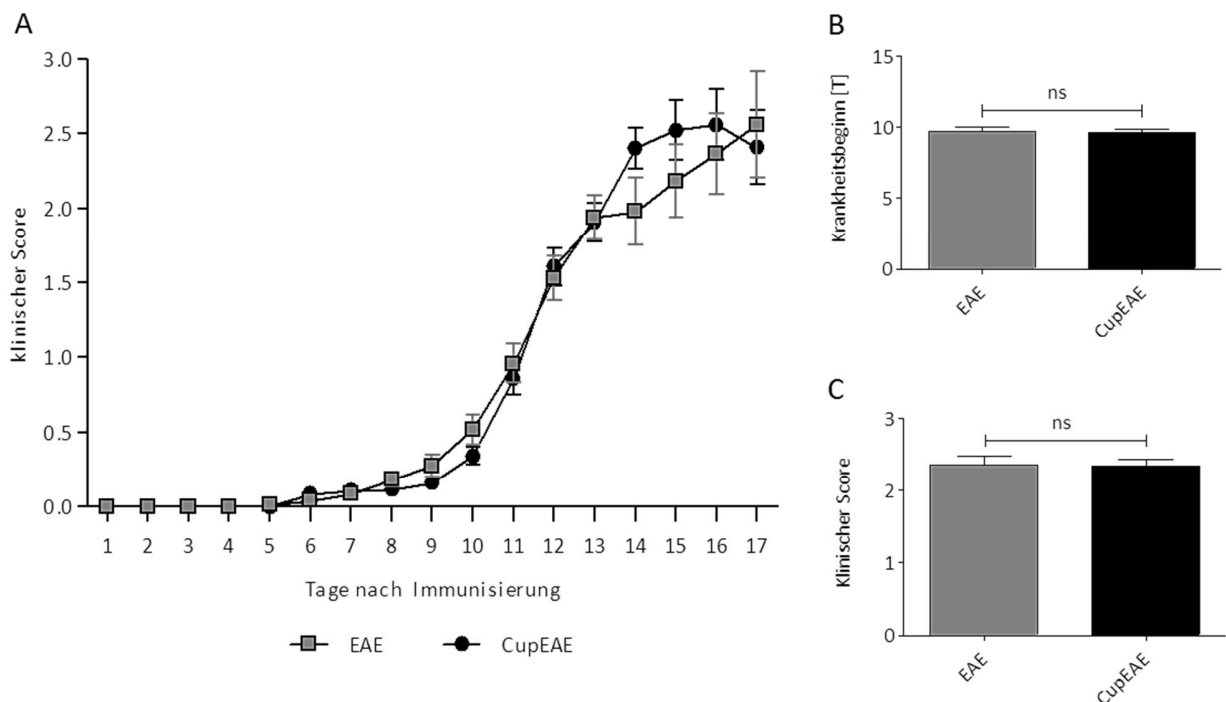


Abbildung 13: Klinisches Scoring, Krankheitsbeginn und maximaler Score von EAE- und CupEAE-Tieren

(A) Klinisches Scoring von EAE- und CupEAE-Tieren. **(B)** Durchschnittlicher Krankheitsbeginn von EAE- und CupEAE-Tieren. **(C)** Maximaler klinischer Score von EAE- und CupEAE-Tieren. ns = nicht signifikant (n = 50)

ERGEBNISSE

3.1.2.2 Mikrogliose und Astrogliose

Histopathologisch zeigt das CupEAE-Modell sowohl Parallelen zum Cuprizon- als auch zum EAE-Modell. Ähnlich wie bei Cuprizon-Tieren kam es bei CupEAE-Tieren, verglichen mit Kontrolltieren, zu einem signifikanten Anstieg von IBA1-positiven Mikroglia in Großhirnarealen, wie dem Corpus callosum mit $760,00 \pm 51,21$ Zellen/mm² und dem Kortex mit $202,20 \pm 17,47$ Zellen/mm² (Abbildung 14 A, B). Bei

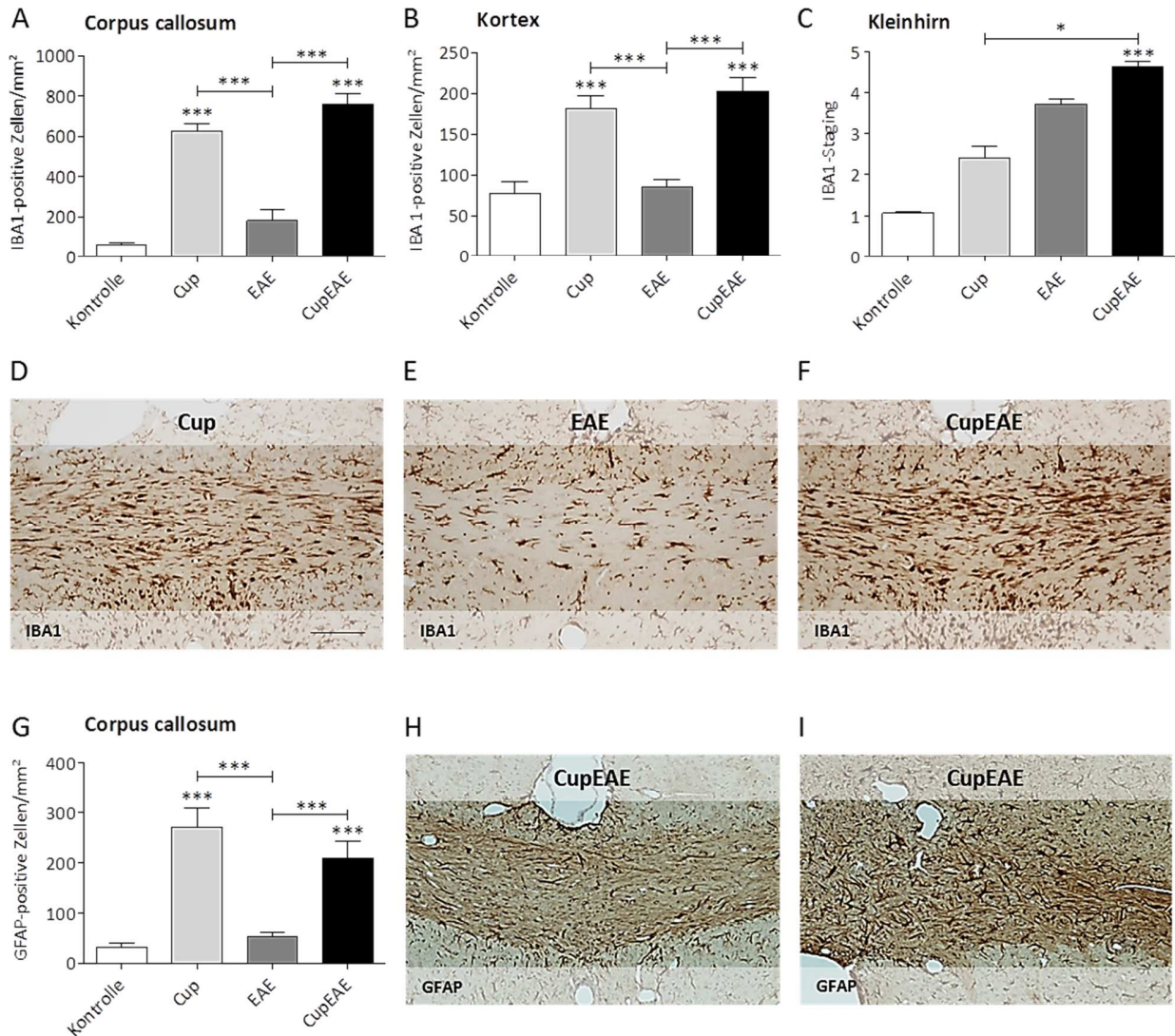


Abbildung 14: Analyse der Mikrogliose und Astrogliose in Corpus callosum, Kortex und Kleinhirn von CupEAE-Tieren

(A) Auszählung der IBA1-positiven Zellen im Corpus callosum (n = 3 – 7). (B) Auszählung der IBA1-positiven Zellen im Kortex (n = 3 – 7). (C) Einstufung der IBA1-Färbeintensität im Kleinhirn (n = 4 – 5). (D) – (F) Repräsentative Bilder der IBA1-Färbung von je einem Tier der Cuprizon-, EAE- und CupEAE-Gruppe des medialen Corpus callosum zeigen eine starke Mikrogliose in Cuprizon- und CupEAE-Tieren. (G) Auszählung der GFAP-positiven Zellen im Corpus callosum (n = 4 – 5). (H) und (I) Repräsentative Bilder der GFAP-Färbung zeigen die starke Astrogliose des medialen und lateralen Corpus callosum von einem CupEAE-Tier. A, D – G modifiziert übernommen aus Masterarbeit Scheld 2015. Messbalken 100 µm, * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

ERGEBNISSE

Cuprizon-Tieren wurden im Corpus callosum $625,20 \pm 40,11$ IBA1-positive Zellen/mm² gezählt, im Kortex hingegen $182,20 \pm 14,79$ Zellen/mm². Mit $59,99 \pm 12,04$ bzw. $180,20 \pm 53,61$ IBA1-positiven Zellen/mm² im Corpus callosum gibt es bei Kontroll- bzw. EAE-Tieren einen signifikanten Unterschied zu Cuprizon- und CupEAE-Tieren hinsichtlich der Anzahl IBA1-positiver Zellen. Ebenso im Kortex mit $77,78 \pm 13,51$ bzw. $85,29 \pm 9,86$ Zellen/mm² unterscheidet sich die Anzahl der IBA1-positiven Zellen bei Kontroll- und EAE-Tieren signifikant von Cuprizon- und CupEAE-Tieren. Abbildung 14 D – F zeigen IBA1-gefärbte Gehirnschnitte je eines Cuprizon-, EAE- und CupEAE-Tieres, in denen die erhöhte Anzahl an IBA1-positiven Zellen deutlich erkennbar ist. Hinsichtlich der IBA1-Färbeintensität im Kleinhirn ähnelte das CupEAE-Modell mit einem Faktor von $4,63 \pm 0,13$ eher dem EAE-Modell (Faktor $3,73 \pm 0,11$) als dem Cuprizon-Modell (Faktor $2,40 \pm 0,28$). Der Unterschied in der Färbeintensität der IBA1-Färbung von CupEAE-Tieren zu Kontroll- und Cuprizon-Tieren erreicht eine statistische Signifikanz (Abbildung 14 C). Ebenso kam es, verglichen mit Kontroll- und EAE-Tieren ($33,07 \pm 7,62$ und $54,47 \pm 6,93$ Zellen/mm²), im medialen und lateralen Corpus callosum von CupEAE-Tieren mit $209,70 \pm 34,26$ Zellen/mm² zu einer signifikant erhöhten Anzahl GFAP-positiver Astrozyten (Abbildung 14 G - I). Die Zellzahl bei Cuprizon-Tieren unterscheidet sich mit $271,50 \pm 38,99$ Zellen/mm² nicht signifikant von der Zellzahl bei CupEAE-Tieren.

3.1.2.3 Oligodendrozytenanzahl, Myelinstatus und axonaler Schaden

Mit $1.768 \pm 136,20$ positiven OLIG2-Zellen/mm² wurde im Corpus callosum von CupEAE-Tieren, verglichen mit Kontrolltieren ($1.612 \pm 126,60$ Zellen/mm²), Cuprizon-Tieren ($2.035 \pm 117,90$ Zellen/mm²) und EAE-Tieren ($1.888 \pm 93,19$ Zellen/mm²), kein Verlust von Oligodendrozyten festgestellt (Abbildung 15 A). Ein bedeutender Unterschied zu EAE-Tieren ist jedoch, dass nicht nur im Kleinhirn und Rückenmark, sondern auch in signifikantem Ausmaß im Corpus callosum des Großhirns ein verringerter Myelinisierungsstatus beobachtet wurde. Die optische Einstufung der LFB-PAS-Färbeintensität zeigt, dass CupEAE-Tiere im Corpus callosum nur noch einen Myelinisierungsstatus von $45,00 \pm 9,37$ % aufwiesen (Abbildung 15 B - E). Damit unterscheidet sich der Myelinisierungsstatus von CupEAE-Tieren zu Kontroll- ($97,50 \pm 2,50$ %) und EAE-Tieren ($99,17 \pm 0,83$ %) signifikant. Zu Cuprizon-Tieren ($36,67 \pm 10,6$ %) kann jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Ein weiterer markanter Unterschied zu Kontroll- und EAE-Tieren ist, dass die Anzahl APP-positiver Sphäroide/mm² im Corpus callosum von CupEAE-Tieren mit $63,23 \pm 9,08$ Sphäroiden signifikant erhöht ist (Abbildung 15 F).

ERGEBNISSE

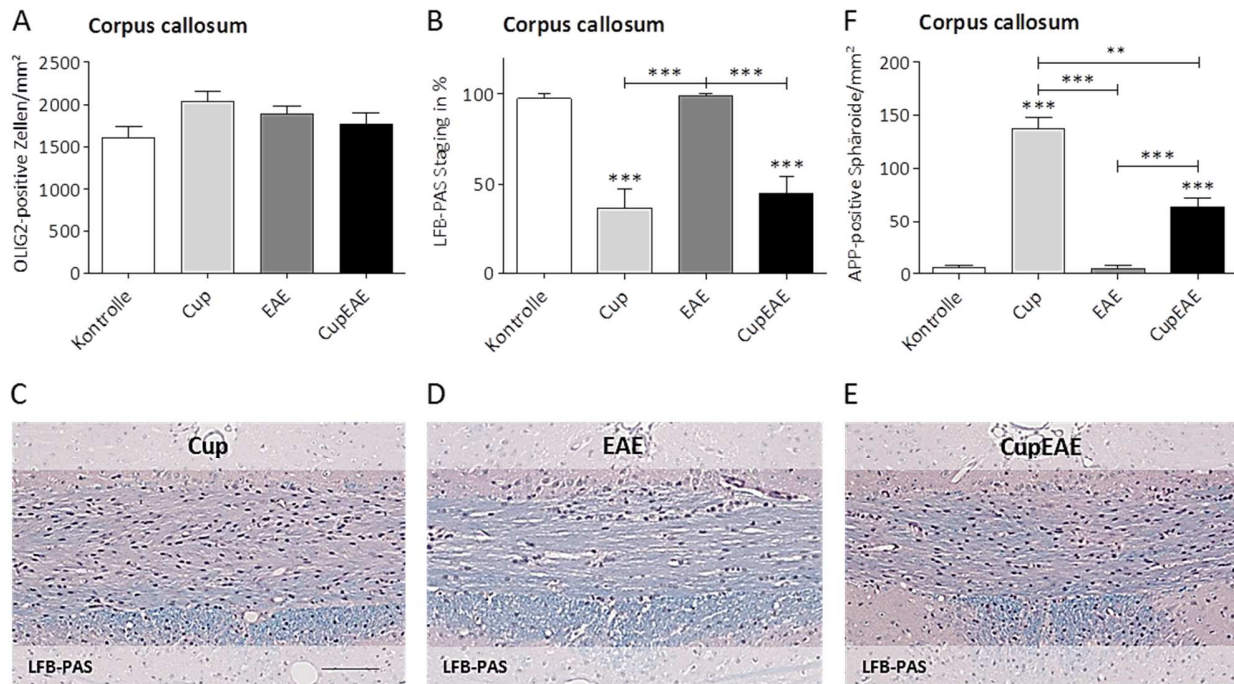


Abbildung 15: Analyse der Demyelinisierung und des axonalen Schadens in Corpus callosum, Rückenmark und Kleinhirn von CupEAE-Tieren

(A) Auszählung der OLIG2-positiven Zellen im Corpus callosum (n = 3 – 7). **(B)** Einstufung der LFB-PAS-Färbeintensität im Corpus callosum (n = 3 – 7). **(C) – (E)** Repräsentative Bilder der LFB-PAS-Färbung von je einem Cuprizon-, EAE- und CupEAE-Tier des medialen Corpus callosum zeigen die starke Demyelinisierung in der CupEAE-Gruppe. **(F)** Auszählung der APP-positiven Sphäroide im Corpus callosum (n = 6 – 14). Messbalken 100 μ m, * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

3.1.2.4 Infiltration peripherer Zellen in Kleinhirn und Rückenmark

Wie schon im EAE-Modell beobachtet wurde (Abbildung 11 H, Abbildung 12 B), kam es auch im CupEAE-Modell im Rückenmark und Kleinhirn zu einer pathologischen Ansammlung von Zellen (Abbildung 16). Die PVCs verteilten sich bei EAE-Tieren und CupEAE-Tieren im Rückenmark von zervikal über sakral auf alle Rückenmarksabschnitte (Abbildung 16 A). Auffällig war, dass die Anzahl der PVCs in beiden Versuchsgruppen von zervikal nach sakral zunahm. Zervikal wurden $6,40 \pm 1,29$ und $6,00 \pm 2,30$, thorakal $4,60 \pm 1,69$ und $6,40 \pm 2,02$, lumbal $10,20 \pm 2,97$ und $15,40 \pm 2,38$, und sakral $9,50 \pm 2,90$ und $10,00 \pm 2,32$ PVCs in EAE- bzw. CupEAE-Tieren gezählt. Diese Unterschiede zwischen EAE- und CupEAE-Tieren erreichen keine statistische Signifikanz. Im Kleinhirn zeigen CupEAE-Tiere mit $32,50 \pm 4,35$ PVCs eine Tendenz zu einer höheren Anzahl an PVCs verglichen mit EAE-Tieren mit $10,03 \pm 2,10$ PVCs (nicht signifikant, Abbildung 16 B). Bei Kontroll- und Cuprizon-Tieren wurden keine PVCs im Kleinhirn gefunden. Abbildung 16 C und D zeigen

ERGEBNISSE

die kumulative Verteilung der PVCs in Kleinhirnschnitten von EAE- und CupEAE-Tieren. Die PVCs verteilen sich im Kortex des Kleinhirns, der weißen Substanz und dem angrenzenden Hirnstamm. Abbildung 16 E und F zeigen Bilder von PVCs im Kleinhirn je eines EAE- und CupEAE-Tieres (modifiziert übernommen [262]).

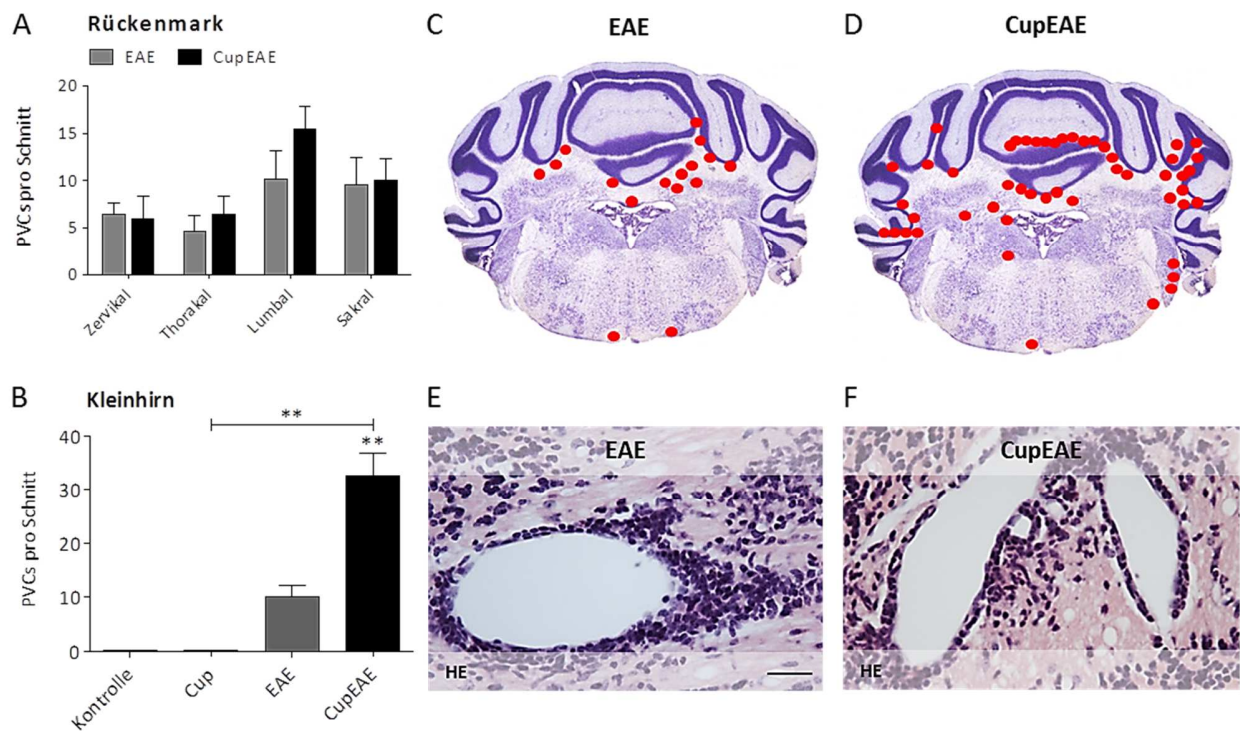


Abbildung 16: Analyse der Immuzellinfiltration im Rückenmark und Kleinhirn von CupEAE-Tieren

(A) Auszählung der PVCs in zervikalen, thorakalen, lumbalen und sakralen Rückenmarkssegmenten (n = 4 - 5). (B) Auszählung der PVCs im Kleinhirn (n = 4 - 5). (C) und (D) Auswertungen der kumulativen Verteilung der PVCs im Kleinhirn je eines EAE- und CupEAE-Tiers zeigen, dass sich die PVCs im Kortex des Kleinhirns, der weißen Substanz und dem angrenzenden Hirnstamm verteilen. (E) und (F) Repräsentative Bilder der HE-Färbung von PVCs im Kleinhirn von je einem EAE- und CupEAE-Tier. Modifiziert übernommen aus [262]. Messbalken 25 μ m, * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

3.1.2.5 Infiltration peripherer Zellen in das Großhirn

Hinsichtlich der histopathologischen Analysen mit IBA1, GFAP, LFB-PAS und APP als Marker für die Mikrogliose, Astrogliose, Demyelinisierung und axonalen Schaden zeigt das CupEAE-Modell einerseits Parallelen zum Cuprizin-Modell. Andererseits ähnelt das CupEAE-Modell dem EAE-Modell hinsichtlich des Krankheitsverlaufs, der Analyse von IBA1 im Kleinhirn, des Myelinisierungsstatus im Rückenmark als auch

ERGEBNISSE

der Anzahl an PVCs in Kleinhirn und Rückenmark. Neben diesen Gemeinsamkeiten grenzt sich das CupEAE-Modell von den anderen beiden MS Tiermodellen dahingehend ab, dass es nicht nur im Kleinhirn und Rückenmark, sondern auch im Großhirn zu einer Infiltration von Zellen kam. Während bei EAE-Tieren in allen untersuchten Regionen (215, 225, 235 und 275 nach Sidman mouse brain atlas, Sidman und Kollegen 1971) im Durchschnitt nur $0,53 \pm 0,15$ PVCs gezählt wurden, befanden sich bei CupEAE-Tieren durchschnittlich $6,67 \pm 0,91$ PVCs über alle vier Regionen verteilt. Die Unterschiede zu Kontroll- ($0,05 \pm 0,03$), Cuprizon- ($0,01 \pm 0,01$) und EAE-Tieren sind signifikant (Abbildung 17 A). In den vorderen Gehirnregionen 215 und 225 wurden bei CupEAE-Tieren im Durchschnitt $9,90 \pm 2,26$ und $10,10 \pm 1,27$ PVCs gezählt. Je weiter kaudal das Gehirn untersucht wurde, desto weniger PVCs wurden bei CupEAE-Tieren gezählt (vergl. Region 235 $5,64 \pm 1,27$ PVCs und Region 275 $2,93 \pm 0,97$ PVCs).

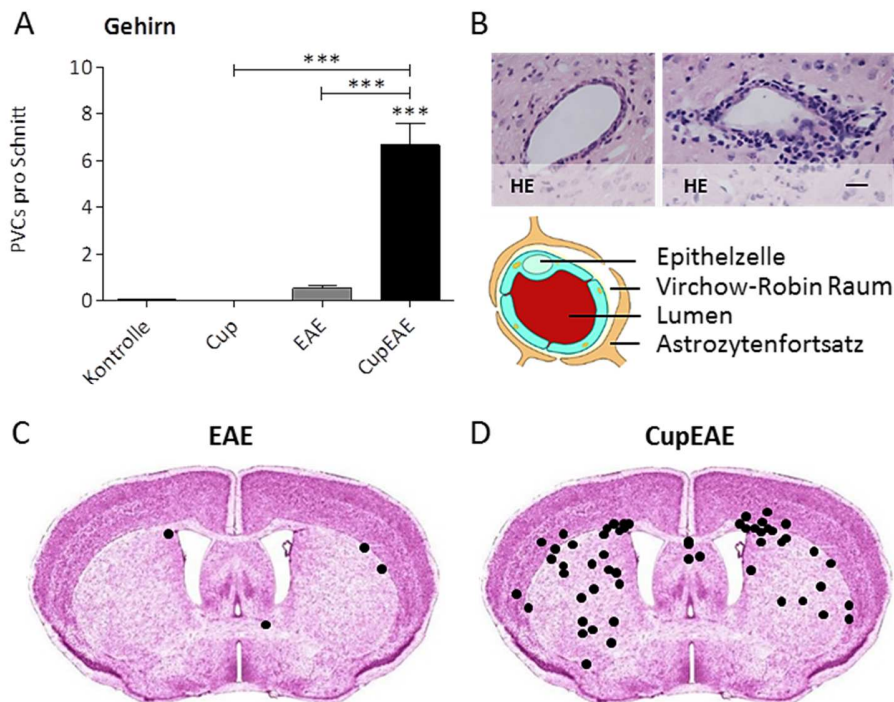


Abbildung 17: Analyse der Immunzellinfiltration im Großhirn von CupEAE-Tieren

(A) Auszählung der PVCs im Gehirn von Regionen 215, 225, 235, 275 ($n = 14 - 24$). **(B)** Links oben befinden sich die Zellen noch im Virchow-Robin Raum, rechts oben sind sie in das angrenzende Neuropil eingedrungen. Darunter: schematische Darstellung des perivaskulären Virchow-Robin Raums mit Epithelzelle, Astrozytenfortsätzen und dem Lumen des Blutgefäßes (modifiziert übernommen aus Masterarbeit Scheld 2015). **(C)** und **(D)** Auswertungen der kumulativen Verteilung der PVCs der Gruppen EAE und CupEAE im Großhirn am Beispiel der Region 215 ($n = 5$). Die PVCs befinden sich zumeist im lateralen Corpus callosum, aber auch im Kortex und in subcortikalen Strukturen. Messbalken $20 \mu\text{m}$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$

ERGEBNISSE

Weiterhin wurden zwei verschiedene Typen von PVCs unterschieden: Solche, bei denen die Zellen von der Glia limitans perivascularis im erweiterten Virchow-Robin-Raum gehalten werden (Abbildung 17 B links oben) und solche, bei denen die Zellen die Grenzmembran durchbrochen haben und diffus in das Neuropil eingewandert sind (Abbildung 17 B rechts oben). Abbildung 17 C und D zeigen die kumulative Verteilung aller gezählten PVCs bei EAE- und CupEAE-Tieren in der Region 215. Die PVCs befinden sich zumeist im lateralen Corpus callosum, aber auch teilweise im Kortex und in subkortikalen Strukturen.

3.1.2.6 Charakterisierung der Infiltrate

Die direkte Umgebung der perivaskulären und parenchymalen Infiltrate ist bei CupEAE-Tieren sichtbar verändert. GFAP Färbungen von Hirnschnitten zeigen, dass im Gegensatz zu Kontrolltieren, die astrozytäre Glia limitans perivascularis bei CupEAE-Tieren an einigen Stellen nicht mehr durchgängig war (Abbildung 18 A, B). Immunhistochemische Färbungen des astrozytären Wasserkanalproteins AQP4 zeigen, dass das Protein um die Infiltrate herum fokal vermindert ist (Abbildung 18 C, D). Eine genauere Charakterisierung der Infiltrate ergab, dass sich die PVCs vor allem aus CD3-positiven Lymphozyten und IBA1-positiven Zellen zusammensetzte (Abbildung 18 E - G). Im Corpus callosum von CupEAE-Tieren wurden mit $44,77 \pm 3,81$ Zellen/mm² signifikant mehr CD3-positive Zellen gezählt als in EAE- ($10,54 \pm 3,70$ Zellen/mm²), Cuprizon- ($18,04 \pm 2,23$ Zellen/mm²) und Kontrolltieren ($0,00 \pm 0,00$ Zellen/mm², Abbildung 18 H) (modifiziert übernommen [259]).

3.1.2.7 Charakterisierung peripherer immunologischer Organe

Die Immunzellensignatur in peripheren Organen, wie der Milz, war zwischen EAE- und CupEAE-Tieren nicht signifikant verändert (Daten werden nicht gezeigt [259]). Bei Cuprizon-Tieren kam es zu keiner Veränderung des T-Zell Phänotyps (Th1-, Th17-Zellen) in den Lymphknoten (Abbildung 19 A, B). Es wurde jedoch mit $14,32 \pm 0,37$ eine größere Anzahl regulatorischer T-Zellen verglichen mit Kontrolltieren ($12,98 \pm 0,22$) festgestellt (Abbildung 19 C). Ebenfalls wurde bei Cuprizon-Tieren eine erhöhte Lipidansammlung in Makrophagen festgestellt (Abbildung 19 D, E) (modifiziert übernommen [259]).

ERGEBNISSE

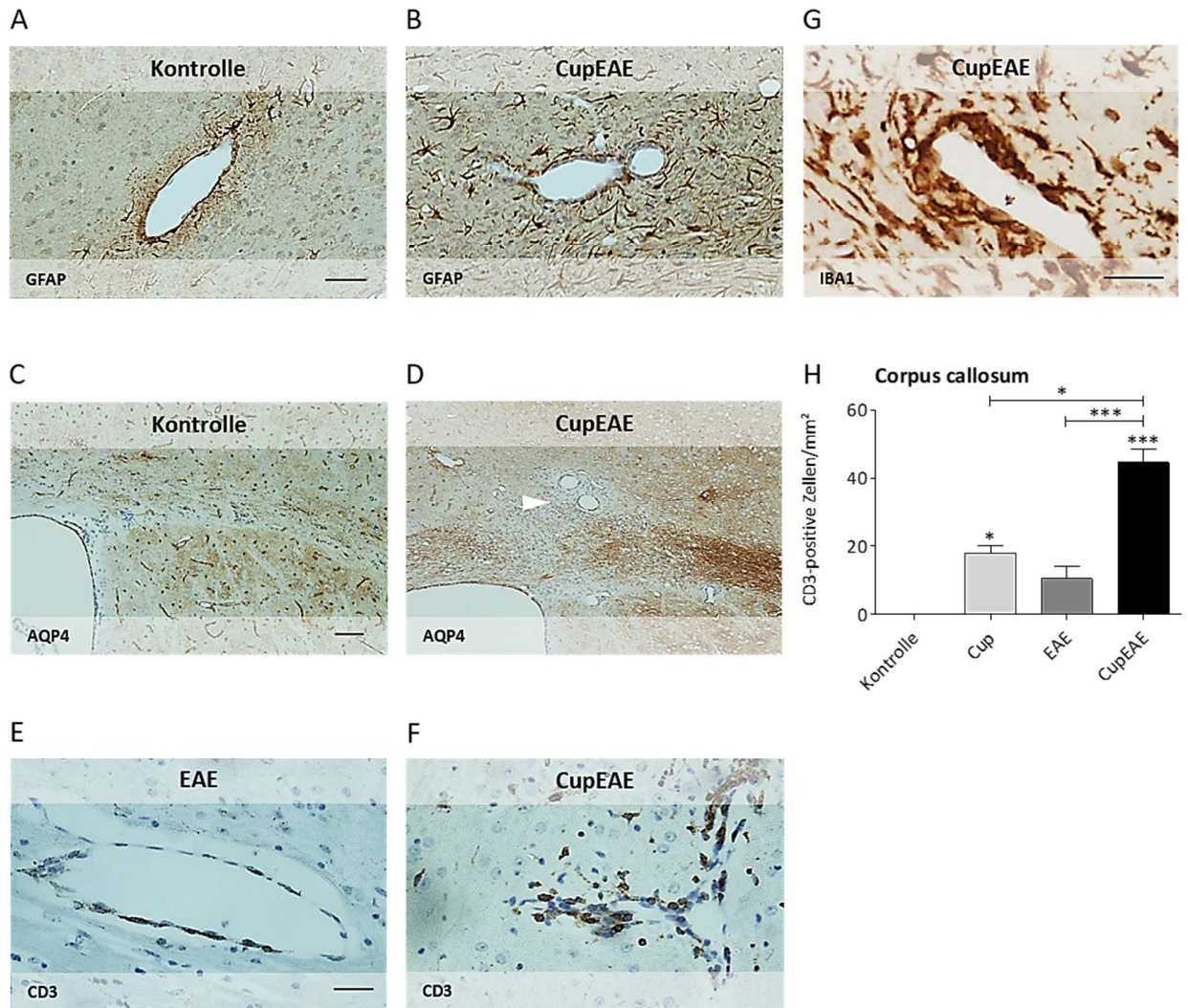


Abbildung 18: Charakterisierung der PVCs im Großhirn von CupEAE-Tieren

(A) und (B) Repräsentative Bilder einer GFAP-Färbung zeigt die astrozytäre Grenzmembran eines Blutgefäßes von je einem Kontroll- und CupEAE-Tier. Im Bild des CupEAE-Tieres erkennt man, dass die Grenzmembran beschädigt ist (Messbalken 50 µm). (C) und (D) Repräsentative Bilder der AQP4-Färbung des lateralen Corpus callosum von je einem EAE- und CupEAE-Tier. Im Bild des CupEAE-Tieres ist AQP4 fokal um die infiltrierte Zellen und um PVCs herum vermindert (Pfeil, Messbalken 100 µm). (E) und (F) Repräsentative Bilder von Blutgefäßen der CD3-Färbung von je einem EAE- und CupEAE-Tier mit auffälliger Vielzahl CD3-positiver Zellen im CupEAE-Tier (Messbalken 30 µm). (G) Repräsentatives Bild eines Blutgefäßes der IBA1 Färbung eines CupEAE-Tiers (Messbalken 30 µm). (H) Auszählung CD3-positiver Zellen im Corpus callosum (n = 6 – 14). A – D, F modifiziert übernommen aus Masterarbeit Scheld 2015. * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

3.1.2.8 Einfluss der Cuprizon-Intoxikation auf das Immunzellrepertoire

Mithilfe von AT-Experimenten (Abbildung 3 C), auch als passive EAE bezeichnet, wurde der Einfluss der Cuprizon-Intoxikation während der MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung auf die Bildung autoreaktiver Immunzellen untersucht. In den MOG-AT-Experimenten erkrankten beide Versuchsgruppen in ähnlichem Ausmaß wie EAE- und CupEAE-Tiere nach dem Lymphozyten-Transfer. In den Großhirnen von MOG-AT in Cup-Tieren wurde mit $3,88 \pm 1,02$ PVCs eine höhere, jedoch nicht signifikante, Anzahl an PVCs gezählt als in MOG-AT in Kontrolltieren mit $2,61 \pm 0,54$ PVCs (Abbildung 19 F). Den direkten Ausschluss dafür, dass in den Cuprizon-Tieren keine autoreaktiven T-Zellen gebildet wurden, lieferten die Experimentalgruppen „Cup-AT in Kontrolle“ und „Cup-AT in Cup“. Keine dieser beiden Versuchsgruppen zeigte Anzeichen von peripheren Immunzellinfiltraten in das Großhirn (modifiziert übernommen [259]).

Untersuchungen an CupPTX-Tieren ergab, dass die Formation autoreaktiver Immunzellen gegen das Myelinprotein MOG essentiell für die Immunzellinfiltration im CupEAE-Modell ist. CupPTX-Tiere wiesen alle pathologischen Charakteristika hinsichtlich der IBA1, GFAP, OLIG2 und LFB-PAS Färbungen auf, die auch bei den Cuprizon-Tieren festgestellt wurden. Weiterhin wurden keine Infiltrate ($0,12 \pm 0,06$) im Großhirn der CupPTX-Tiere nachgewiesen (Abbildung 19 G) (modifiziert übernommen [259]).

3.1.2.9 Zeitliche Korrelation der Neurodegeneration und Immunzellinfiltration

Die Ergebnisse der PVC Analysen in der CupEAE3+4-Gruppe bestätigte eine zeitliche Korrelation zwischen Cuprizon-induzierter Neurodegeneration und der Infiltration peripherer Immunzellen in das Großhirn. Mit durchschnittlich $2,10 \pm 1,29$ PVCs wurden bei CupEAE3+4-Tieren nach verlängerter Zeit mit Normalfutter eine signifikant geringere Anzahl PVCs in der Region 215 im Großhirn gezählt als nach 2-wöchiger Zeit mit Normalfutter mit $11,80 \pm 2,47$ PVCs (Abbildung 19 H) (modifiziert übernommen [259]).

ERGEBNISSE

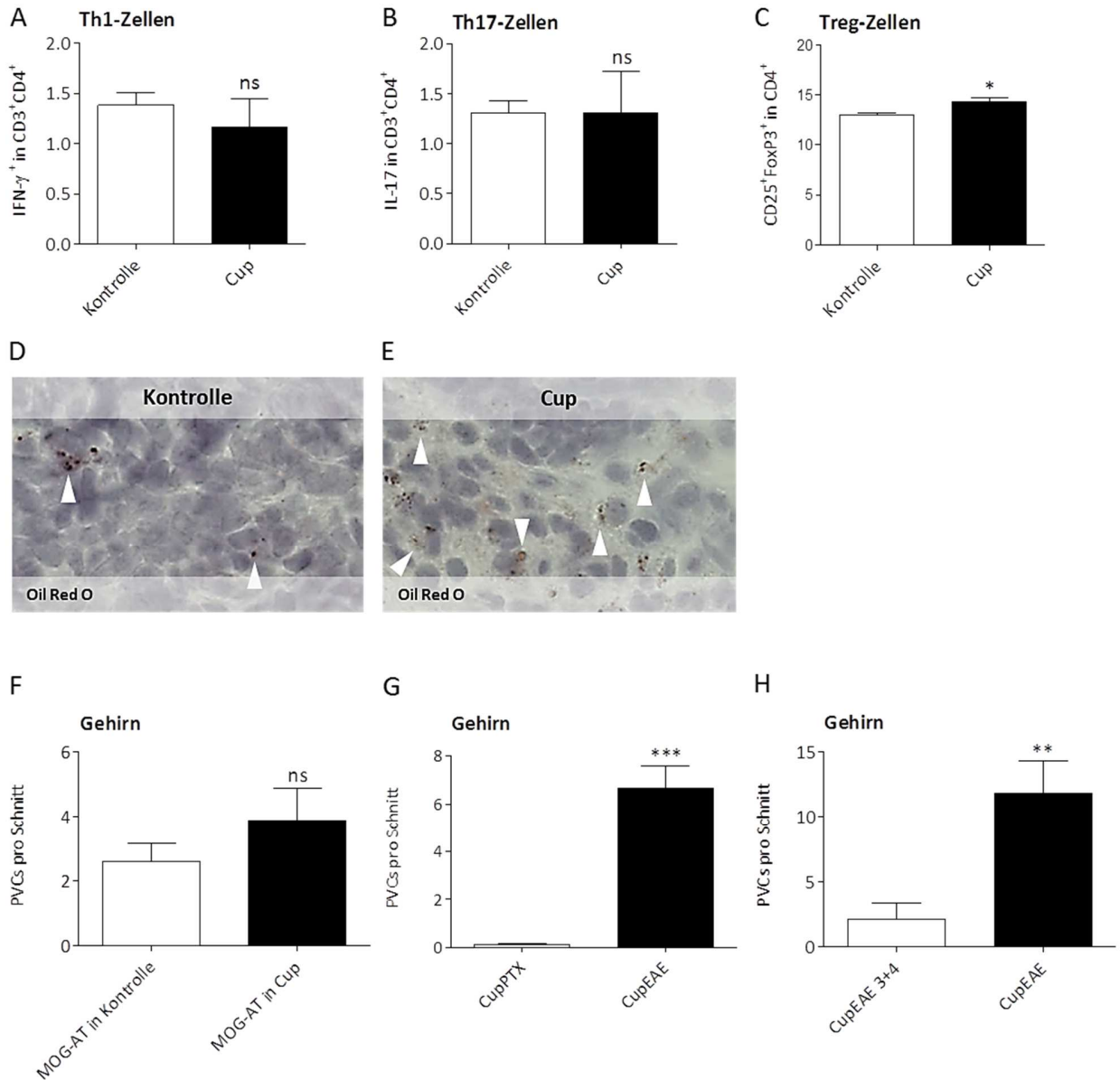


Abbildung 19 Analyse der PVCs im Gehirn der AT-Experimente

(A) – (C) Anzahl IFN γ -positiver Th1-Zellen, IL17-positiver Th17-Zellen bzw. CD25-positiver regulatorischer T-Zellen aus durchflusszytometrischen Analysen von Kontroll- und Cuprizon-Tieren (n = 6). **(D)** und **(E)** Repräsentative Bilder der histochemischen Oil Red O-Färbungen je eines Kontroll- und Cuprizon-Tieres. **(F)** Auszählung der PVCs im Gehirn der AT-Tiere (n = 11 – 15). **(G)** Auszählung der PVCs im Gehirn von CupPTX- und CupEAE-Tieren (n = 17 – 24). **(H)** Auszählung der PVCs in CupEAE-Tieren mit zwei Wochen („CupEAE“) und vier Wochen („CupEAE 3+4“) Erholungsphase nach 3-wöchiger Cuprizon-Intoxikation (n = 5). Modifiziert übernommen aus [259] * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001, ns = nicht signifikant

ERGEBNISSE

3.1.2.10 Zusammenfassender Vergleich des CupEAE-Modells zum Cuprizon-, EAE-Modell und zur humanen MS

Die Ergebnisse zeigen, dass das Cuprizon-Modell eher demyelinisierend-neurodegenerative Aspekte im Großhirn und Kleinhirn (Gliose, Demyelinisierung, axonaler Schaden), und das EAE-Modell eher demyelinisierend-autoimmune Aspekte im Rückenmark und Kleinhirn (Demyelinisierung, Immunezellinfiltration) aufweist. Das Großhirn ist im EAE-Modell kaum betroffen. Weiterhin liegen in dem neuen kombinatorischen CupEAE-Modell alle Teilaspekte beider ursprünglich verwendeter Tiermodelle vor (Tabelle 4). Zum einen kommt es zu einer massiven Mikrogliaose und Astrogliaose im Corpus callosum und zusätzlich zu einer starken Mikrogliaose im Kortex und im Kleinhirn. Zum anderen konnte eine starke Demyelinisierung und ein axonaler Schaden sowie multifokale Läsionen mit Immunezellinfiltraten im Rückenmark, Kleinhirn und im Großhirn festgestellt werden. Der klinische Phänotyp manifestiert sich, wie bei dem EAE-Modell, ebenfalls in einer transient-aufsteigenden Paralyse der Hinterläufe. Verglichen mit der humanen MS weist das CupEAE-Modell mehr Parallelen auf, als die bisher verwendeten Cuprizon- und EAE-Modelle.

Tabelle 4: Zusammenfassender Vergleich der verwendeten MS-Tiermodelle Cuprizon, EAE und CupEAE hinsichtlich der untersuchten Parameter mit der humanen MS. Grün = ist ein Kennzeichen dieser Erkrankung/dieses Modells, rot = ist kein Kennzeichen dieser Erkrankung/dieses Modells.

	Cuprizon	EAE	CupEAE	Humane MS
Klinischer Phänotyp	rot	grün	grün	grün
Gliose	grün	rot	grün	grün
Demyelinisierung Rückenmark, Kleinhirn	rot	grün	grün	grün
Demyelinisierung Großhirn	grün	rot	grün	grün
Axonaler Schaden Großhirn	grün	rot	grün	grün
Immunezellinfiltration Rückenmark, Kleinhirn	rot	grün	grün	grün
Immunezellinfiltration Großhirn	rot	rot	grün	grün

3.2 Die Rolle von Signalmolekülen bei der Läsionspathogenese

3.2.1 Auswertung des genomweiten Affymetrix Arrays

Mit einem *Fold Change* von 1.157 war *Lcn2* das am stärksten bei CupEAE-Tieren induzierte Gen (Abbildung 20 A). Auch bei Cuprizon- und EAE-Tieren war *Lcn2* induziert (*Fold Change* 117 respektive 27). Mittels ELISA Analysen wurde mit durchschnittlich $5.590,00 \pm 673,5$ pg/mL im Serum von Tieren der CupEAE-Gruppe ein signifikanter Anstieg der LCN2 Konzentration, verglichen mit $675,60 \pm 191,30$ pg/mL im Serum von Tieren der Kontrollgruppe, festgestellt (Abbildung 20 B). Tiere der EAE-Gruppe wiesen mit $6.365,00 \pm 1.021,00$ pg/mL ebenfalls eine hohe LCN2 Konzentration im Serum auf. Im Vergleich zu dem Wert, der im Serum von Tieren der CupEAE-Gruppe gemessen wurde, erreicht der Unterschied keine statistische Signifikanz. Beide Versuchsgruppen, EAE und CupEAE, unterscheiden sich hinsichtlich der gemessenen LCN2 Konzentration im Serum signifikant von der Kontroll- und Cuprizon-Gruppe ($500,40 \pm 203,50$ pg/mL). Das Gen *Chitinase-like 3*,

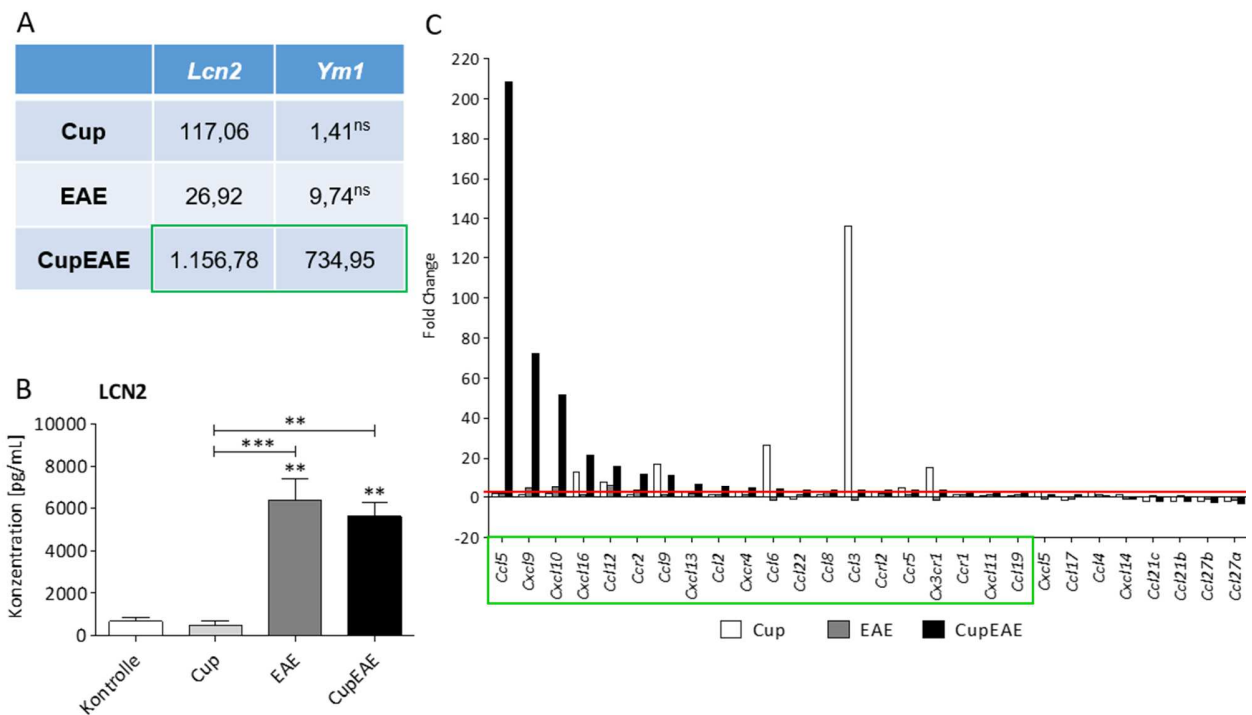


Abbildung 20: Affymetrix Array Analyse der untersuchten Tiermodelle

(A) *Fold Change* aller drei Versuchsgruppen in Bezug auf die Kontrolle der zwei am höchsten induzierten Gene in CupEAE-Tieren des Affymetrix Arrays (n = 3). **(B)** Proteinkonzentration von LCN2 im Serum der untersuchten Tiermodelle mittels ELISA (n = 8 – 12). **(C)** *Fold Change* in Bezug auf die Kontrolle aller untersuchten Chemokine und Chemokin Rezeptoren des Affymetrix Arrays (n = 3). Der grüne Rahmen zeigt, dass 71 % der Chemokine und Chemokin-Rezeptoren > 2-fach (rote Linie) in CupEAE-Tieren verglichen zur Kontrolle induziert sind. * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

ERGEBNISSE

oder auch *Ym1*, war am zweithöchsten im Corpus callosum von CupEAE-Tieren induziert. Mit einem *Fold Change* von 735 war *Ym1* bei CupEAE-Tieren verglichen mit Kontrolltieren signifikant erhöht induziert. Cup-Tiere und EAE-Tiere unterscheiden sich mit einem *Fold Change* von 1,41 bzw. 9,74 nicht in ihrer *Ym1* Expression von Kontrolltieren (Abbildung 20 A). Eine Evaluation des *Affymetrix Arrays* bezüglich der Chemokine und ihrer Rezeptoren ergab, dass von CupEAE-Tieren 71 % der untersuchten Chemokine und Chemokin-Rezeptoren mehr als doppelt so hoch exprimiert waren wie die von Kontroll-Tieren (Abbildung 20 C). Auffällig war das Gen *Ccl5*, das unter anderem von Mikrogliazellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird und ein starkes chemotaktisches Signalmolekül ist, um weitere Immunzellen an den Entzündungsherd zu führen [263]. Die Expression des Gens für *Ccl5* war bei CupEAE-Tieren mit einem *Fold Change* von 208 signifikant erhöht. Die durch IFN γ induzierbaren Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind Liganden des Rezeptors CXCR3 und ihre Gene waren ebenfalls selektiv bei CupEAE-Tieren mit einem *Fold Change* von 72, 52 respektive 3 induziert (Abbildung 20 C). Auch die Gene *Cxcl11*, *Il1rn*, *Acod1*, *Gclc*, *H2q8*, *Il12rb1*, *Isg20*, *Pim1*, *Rab20*, *Tnfrsf12a*, *Txnrd1*, *Arg1*, *Ccl19*, *Ccr1* und *Lcn2* waren ausschließlich bei CupEAE-Tieren signifikant zu Kontrolltieren erhöht induziert und können von Mikroglia exprimiert werden.

3.2.2 Expression von Signalmolekülen *ex vivo* isolierter Mikroglia

Die Reevaluation der *ex vivo* isolierten Mikrogliazellen ergab eine Reinheit von 90 %. Mit einer Mikroglia-spezifischen CX3CR1 Färbung von Wildtyp Mäusen und der Analyse gleicher Gates mit *CX3CR1^{+/GFP}* Mäusen wurde verifiziert, dass es sich bei dem eingegrenzten Gate um Mikroglia handelte (Abbildung 21 A, B). Von den Genen, die im *Affymetrix Array* selektiv in der CupEAE-Gruppe höher induziert waren als bei Tieren der Kontrollgruppe, waren die Gene *Cxcl11*, *Il12rb1*, *H2-Q8*, *Pim1* und *Il1rn* in den isolierten Mikrogliazellen erhöht induziert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Genexpression von *Cxcl11* war selektiv bei CupEAE-Tieren mit einer relativen mRNA von $55,80 \pm 7,91$ im Vergleich zu Kontrolltieren und ebenso verglichen mit Cuprizon-Tieren ($6,56 \pm 4,32$ relative mRNA) signifikant erhöht (Abbildung 21 C). Auch die Genexpression von *Il12rb1*, *H2-Q8*, *Pim1* und *Il1rn* war mit $16,13 \pm 4,16$, $15,07 \pm 5,26$, $7,63 \pm 1,70$ und $10,46 \pm 1,24$ relative mRNA war bei CupEAE-Tieren signifikant erhöht verglichen mit Kontrolltieren, jedoch nicht mit Cuprizon-Tieren (Abbildung 21 D - G). Zusätzlich zeigten die Gene *Il12rb1*, *Pim1* und *Il1rn* ebenfalls eine signifikante Erhöhung ihrer Genexpression bei Cuprizon-Tieren mit einer relativen mRNA von $28,03 \pm 7,46$, $8,20 \pm 3,80$ und $6,91 \pm 0,93$ verglichen mit Kontrolltieren (Abbildung 21 D - G).

ERGEBNISSE

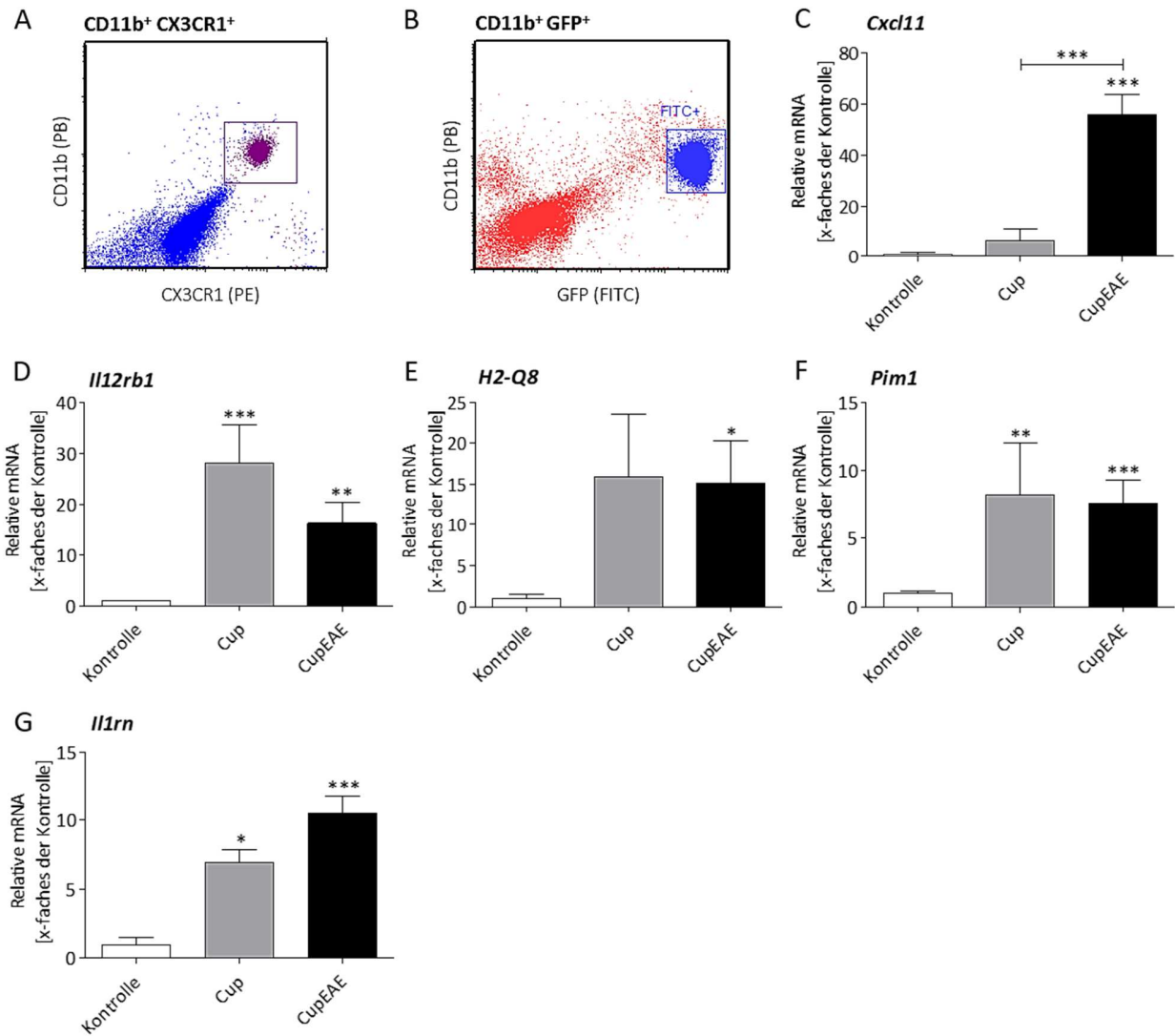


Abbildung 21 FACS Analysen *ex vivo* isolierter Mikrogliazellen

(A) Mikroglia Validierung anhand des CX3CR3- und CD11b-positiven Gates. **(B)** Mikroglia Validierung anhand des CD11b- und GFP-positiven Gates von CX3CR1+/GFP Mäusen. **(C) – (G)** Relative mRNA Menge von *Cxcl11*, *Il12rb1*, *H2-Q8*, *Pim1* und *Il1rn* der *ex vivo* isolierten Mikrogliazellen (n = 4 – 8). * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

3.2.3 Einfluss gestresster Oligodendrozyten auf Mikroglia

3.2.3.1 Genexpressionsprofil gestresster OLN93 Oligodendrozyten *in vitro*

Die LDH Konzentration im Medium der SA-behandelten OLN93 Zellen war, verglichen mit Veh-behandelten Zellen, signifikant erhöht. SA-behandelte Zellen zeigten einen Trend Richtung erniedrigter metabolischer Aktivität, der Unterschied ist nicht signifikant. Die Lyse-Gruppe in beiden Assays unterscheidet sich von

ERGEBNISSE

beiden behandelten Gruppen. RT-qPCR Ergebnisse zeigen, dass die relative mRNA der Stressmarker *Ddit3* mit $12,44 \pm 0,67$ und *Atf3* mit $2,89 \pm 0,25$ in SA-behandelten verglichen mit Veh-behandelten Zellen signifikant erhöht induziert war (Abbildung 22 A, B). Morphologisch waren die SA-gestressten Zellen nicht deutlich verändert verglichen mit nicht-gestressten Zellen (Abbildung 22 C).

Mit Hilfe eines Chemokin- und Zytokin-Arrays mit *in vitro* mitochondrial gestressten Oligodendrozyten wurde festgestellt, dass 13 der insgesamt 84 untersuchten Gene verglichen mit Veh-behandelten Oligodendrozyten signifikant erhöht induziert waren (Abbildung 22 D). Die Gene von *Il6* und *Gdf15* waren

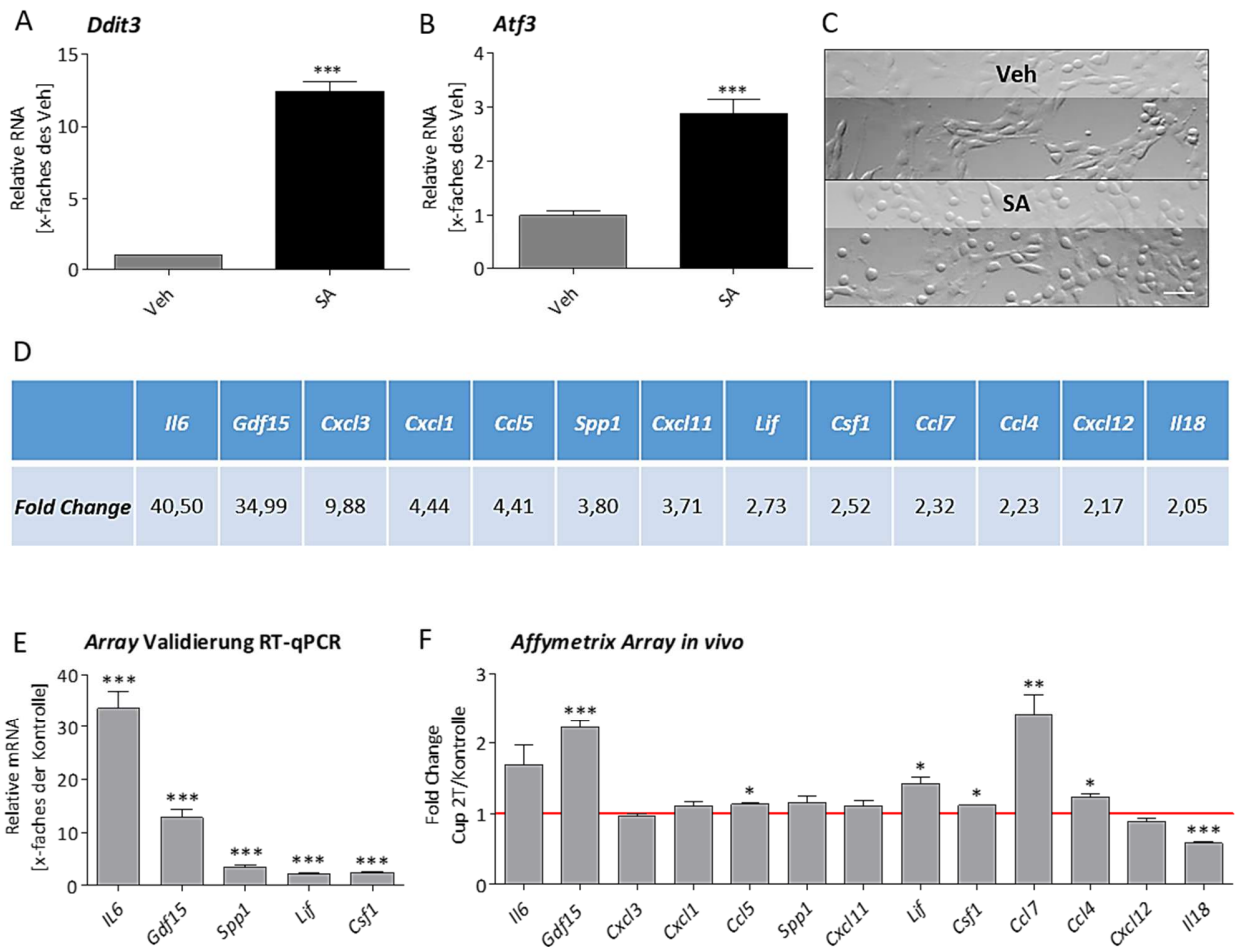


Abbildung 22: Analyse der Zytokin und Chemokin Expression gestresster Oligodendrozyten

(A) und **(B)** Relative mRNA Mengen der Stressmarker *Ddit3* und *Atf3* der Veh- und SA-behandelten OLN93 Zellen (n = 33 Zellkultur-Wells, 5 unabhängige Experimente). **(C)** Repräsentative Durchlicht-mikroskopische Bilder von OLN93 Zellen nach Behandlung. **(D)** *Fold Change* in Bezug zur Kontrolle der Gene, die > 2-fach im Chemokin- und Zytokin-Array induziert sind (n = 1). Auffällig sind die Gene *Il6* und *Gdf15* mit einem *Fold Change* von 40 bzw. 35. **(E)** Validierung des Arrays der zwei am höchsten induzierten und drei weiteren zufällig ausgewählten Genen mit unabhängigen Proben (n = 13). **(F)** *Affymetrix Array* Reevaluation von 2T-Cuprizon-Tieren *in vivo* (n = 3). Modifiziert übernommen aus [261]. Messbalken = 50 μ m, * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001

ERGEBNISSE

mit einem *Fold Change* von 40,50 bzw. 34,99 am höchsten induziert. Einen *Fold Change* zwischen 2,05 und 9,88 wiesen die Gene *Cxcl3*, *Cxcl1*, *Ccl5*, *Spp1*, *Cxcl11*, *Lif*, *Csf1*, *Ccl7*, *Ccl4*, *Cxcl12* und *Il18* auf. Die *Array* Daten wurden in Genexpressionsstudien mit unabhängigen Proben verifiziert (Abbildung 22 E). Eine *Affymetrix Array* Reevaluation von 2 Tage-Cuprizon-Tieren zeigte, dass es auch *in vivo* zu einer Induktion von einigen der untersuchten Zytokine verglichen mit Kontrolltieren im Corpus callosum kam (Abbildung 22 F). Diese waren die Gene *Gdf15*, *Ccl5*, *Lif*, *Csf1*, *Ccl7*, *Ccl4* und *IL18*.

Mittels ELISA Analysen wurde mit $780,80 \pm 147,40$ pg/mL eine erhöhte Konzentration von IL6 Protein im Medium der gestressten, verglichen mit nicht gestressten Oligodendrozyten mit $215,20 \pm 7,51$ pg/mL, nachgewiesen (Abbildung 23 A). Dieser Unterschied erreicht eine statistische Signifikanz.

3.2.3.2 Aktivierungsstatus der Mikroglia *in vitro*

Die Behandlung der mikroglialen Zelllinie BV2 mit dem konditionierten Oligodendrozytenmedium führte zu einer veränderten Genexpressionen des antiinflammatorischen Gens *Arg1* und des proinflammatorischen Gens *Nos2* (Abbildung 23 B, C). In Mikrogliazellen, die mit Medium von nicht gestressten Oligodendrozyten behandelt wurden, wurde eine relative *Arg1* mRNA von $1,65 \pm 0,21$ und *Nos2* mRNA von $4,51 \pm 1,00$ gemessen. Die Genexpression von *Arg1* und *Nos2* von Mikrogliazellen, die mit Medium von SA-gestressten Oligodendrozyten behandelt wurden, war mit einer *Arg1* mRNA von $2,81 \pm 0,32$ und *Nos2* mRNA von $12,13 \pm 0,86$ signifikant erhöht verglichen mit der Kontrolle und OCM-Veh-behandelten Mikrogliazellen.

Eine Blockierung von IL6 mit IL6-Antikörpern machte die beobachtete Induktion der *Nos2* Genexpression in OCM-SA-behandelten Mikrogliazellen nur teilweise rückgängig (Abbildung 23 D). Der relative mRNA Wert für die OCM-SA-Gruppe lag bei $11,04 \pm 1,25$ und für die OCM-SA-aIL6-Gruppe bei $7,80 \pm 0,81$. Die Stimulation von Mikrogliazellen mit rekombinantem IL6 Protein führte bei keiner der eingesetzten IL6 Konzentrationen zu einer erhöhten oder erniedrigten Genexpression von *Arg1* oder *Nos2* (Abbildung 23 E, F). Die relative mRNA für *Arg1* und *Nos2* lag für 10 ng/mL IL6 bei $1,56 \pm 0,26$ bzw. $2,26 \pm 0,79$, für 30 ng/mL IL6 bei $1,28 \pm 0,12$ bzw. $1,62 \pm 0,66$ und für 50 ng/mL IL6 bei $1,56 \pm 0,15$ bzw. $1,25 \pm 0,26$. Die Behandlung mit LPS ergab einen relativen mRNA Wert für *Nos2* von $470,20 \pm 63,22$ und bestätigte, dass die Zellen in der Lage sind, proinflammatorisch aktiviert zu werden. Zusätzliche morphologische Studien zeigten, dass sich durch eine Behandlung der Mikrogliazellen mit OCM-SA weder die Bipolarität noch die Ramifikation verglichen mit OCM-Veh-, LPS- oder Kontrollbehandlung änderte (Abbildung 23 G, H). In OCM-SA-behandelten Mikrogliazellen waren $5,90 \pm 1,37$ % der Zellen bipolar, in OCM-Veh-behandelten Mikrogliazellen $4,96 \pm 1,29$ % und in der Kontrolle $4,80 \pm 0,74$ % (Abbildung 23 G). $7,82 \pm 2,74$ % der LPS-

ERGEBNISSE

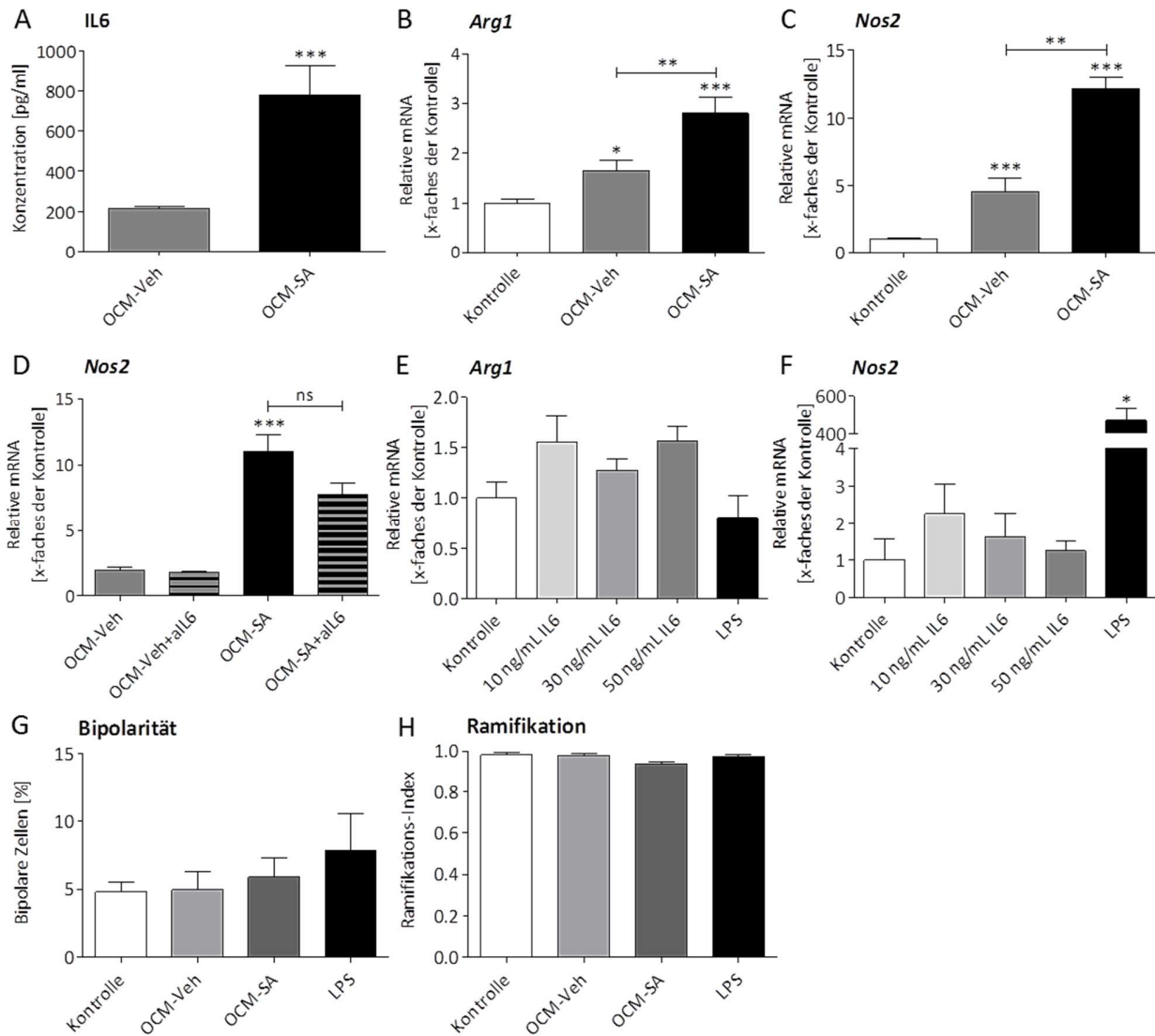


Abbildung 23: Analyse der Wirkung von OCM auf Mikrogliazellen

(A) Proteinkonzentration des Zytokins IL6 im Medium von SA-gestressten OLN93 Zellen mittels ELISA (n = 12). **(B)** und **(C)** Relative mRNA Menge von *Arg1* und *Nos2* der OCM-behandelten BV2 Zellen (n = 20 - 25 Zellkultur-Wells, 4 unabhängige Experimente). **(D)** Relative mRNA Menge von *Nos2* der OCM-behandelten BV2 Zellen, die zusätzlich mit anti-IL6-Antikörpern behandelt wurden. Die beobachteten Effekte bei *Nos2* in (B) konnten nur teilweise rückgängig gemacht werden (n = 9 - 10 Zellkultur-Wells, 2 unabhängige Experimente). **(E)** und **(F)** Relative mRNA Menge von *Arg1* und *Nos2* von IL6- und LPS-stimulierten BV2 Zellen (n = 4 Zellkultur-Wells, ein Experiment). **(G)** Prozentualer Anteil der bipolaren BV2 Zellen gemessen an der Gesamtzahl der BV2 Zellen (n = 3 Zellkultur-Wells, ein Experiment). **(H)** Der Ramifikations-Index beschreibt bei einem Index von 1 eine BV2 Zelle ohne Zellfortsätze (n = 3 Zellkultur-Wells, ein Experiment). Modifiziert übernommen aus [261]. * = p < 0,05, ** = p < 0,005, *** = p < 0,001, ns = nicht signifikant

ERGEBNISSE

behandelten Mikrogliazellen zeigten eine bipolare Zellform, der Unterschied zu beiden OCM-Behandlungen erreicht keine statistische Signifikanz. Der Index der Ramifikation unterscheidet sich in keinen der Versuchsgruppen voneinander (Abbildung 23 H). Bei der Kontrolle und OCM-Veh-behandelten Mikrogliazellen lag der Index bei $0,98 \pm 0,01$, bei OCM-SA-behandelten Mikrogliazellen bei $0,94 \pm 0,01$ und nach LPS-Behandlung bei $0,97 \pm 0,01$.

3.2.3.3 Relevanz der Zellkulturexperimente für *in vivo* Studien

In vivo Experimente mit Kurzzeit-gefütterten Cuprizon-Tieren zeigen, dass bereits nach 2 Tagen ein signifikanter Anstieg der *Il6* Genexpression (relative mRNA $3,93 \pm 0,45$) im Corpus callosum erfolgte (Abbildung 24 A). Nach 3 und 4 Tagen stieg der Wert der relativen mRNA mit $4,09 \pm 0,61$ und $14,15 \pm 3,74$ noch weiter an. Dieser ging mit einer Gliose naheliegender Mikroglia einher (Abbildung 24 B, C). *In situ* Hybridisierungen, Immunfluoreszenz Analysen und immunhistochemische Doppelfärbungen zeigen, dass in 2T-Cuprizon-behandelten Tieren doppelt-positive Zellen für IL6/OLIG2 sowie IL6/APC zu finden sind (Abbildung 24 D – I, Abbildung 25 A). Weitere Doppelfärbungen zeigen IL6/GFAP- und IL6/IBA1-doppelt-positive Zellen in 2T-Cuprizon-behandelten Tieren (Abbildung 25 B, C). Mit einer IBA1 Einzelfärbung mit dem Peroxidase-System wurde kein Fluoreszenzsignal detektiert (Abbildung 25 D) (modifiziert übernommen [261]).

ERGEBNISSE

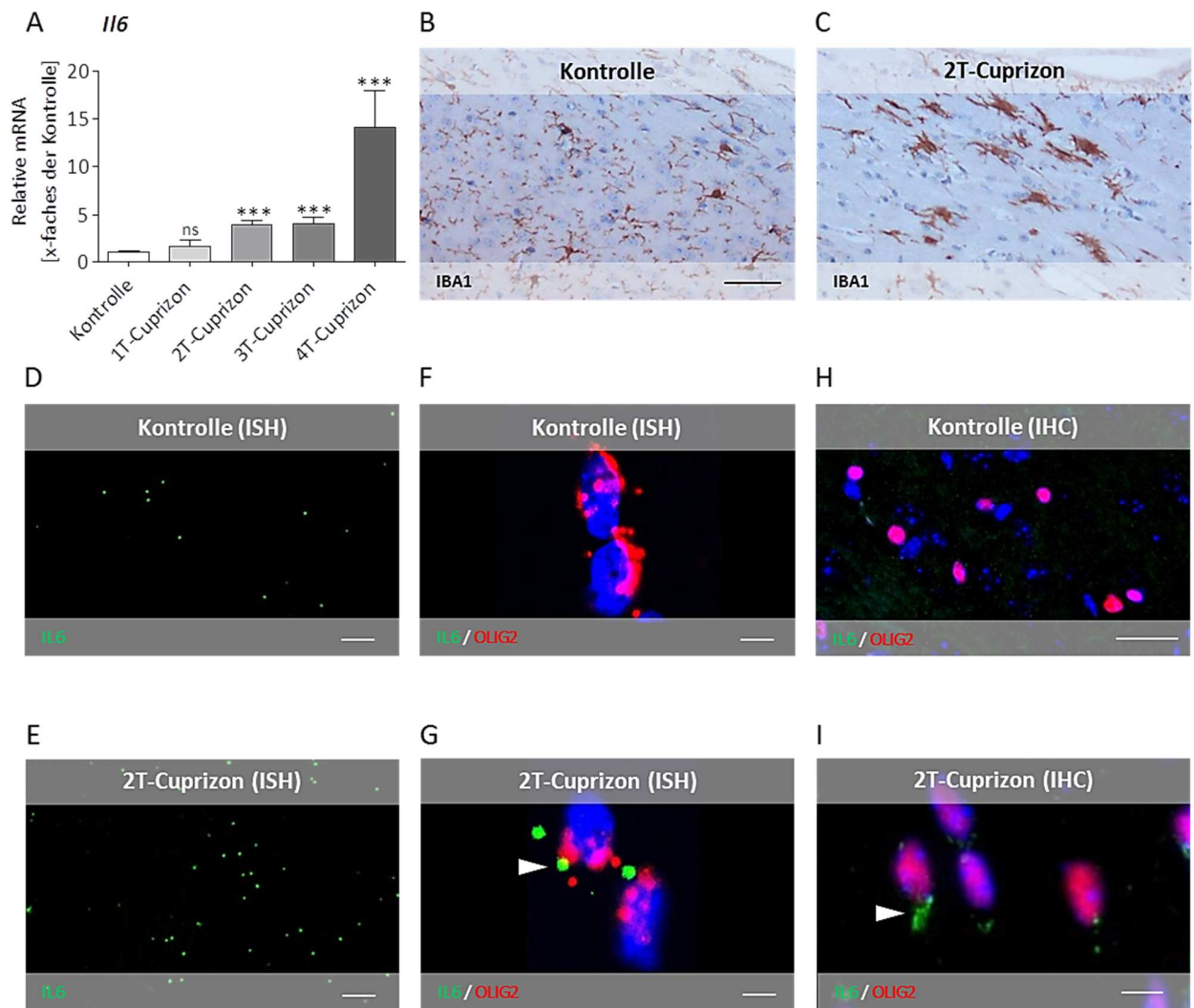


Abbildung 24: In vivo Lokalisation des Zytokins IL6 mittels ISH und Immunfluoreszenz.

(A) Relative mRNA Menge von *Il6* nach 1 – 4 Tagen Cuprizon-Intoxikation im Corpus callosum ($n = 3 - 5$). **(B)** und **(C)** Repräsentative Bilder einer IBA1 Färbung des medialen Corpus callosum je eines Kontroll- und eines Kurzzeit Cuprizon-Tieres (Messbalken 50 μm). **(D)** und **(E)** Repräsentative Bilder einer *Il6* *in situ* Hybridisierung eines Kontroll- und eines 2T-Cuprizon-Tieres (*Il6* = grün, Messbalken 20 μm). **(F)** und **(G)** Repräsentative Bilder einer *Il6/Olig2* *in situ* Doppel-Hybridisierung eines Kontroll- und eines 2T-Cuprizon-Tieres (Zellkerne = blau, *Il6* = grün, *Olig2* = rot) zeigen eine Co-Lokalisation von *Il6/Olig2* RNA (Pfeil, Messbalken 5 μm). **(H)** und **(I)** Repräsentative Bilder einer IL6/OLIG2 Immunfluoreszenz Doppelfärbung eines Kontroll- und eines 2T-Cuprizon-Tieres (Zellkerne = blau, IL6 = grün, OLIG2 = rot) zeigen die Expression von IL6 in unmittelbarer Nähe der OLIG2 Expression in Cuprizon-Tieren (Pfeil, Messbalken (H) 25 μm und (I) 10 μm). Modifiziert übernommen aus [261]. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$

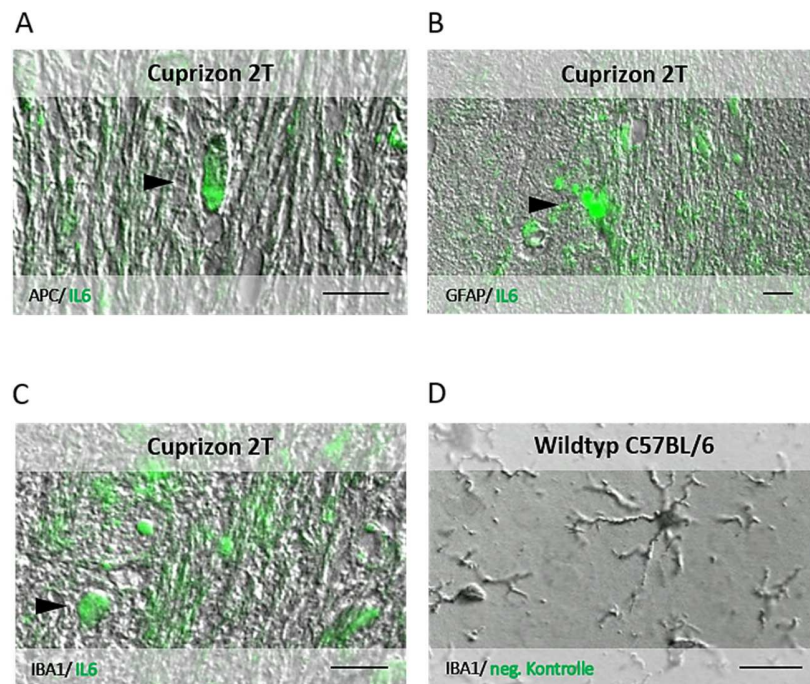


Abbildung 25 *In vivo* Analyse des Zytokins IL6 mittels Doppel-IHC.

(A) Repräsentatives Bild der APC/IL6 immunhistochemischen Doppelfärbung eines 2T-Cuprizon-Tieres. Doppelt-positive Zellen (Pfeil) bestätigen Oligodendrozyten als eine mögliche Quelle von IL6 *in vivo* (IL6 = grün, APC = dunkelgrau, Messbalken 20 μ m). **(B)** und **(C)** Repräsentative Bilder einer GFAP/IL6 und einer IBA1/IL6 immunhistochemischen Doppelfärbung eines 2T-Cuprizon-Tieres (IL6 = grün, GFAP bzw. IBA1 = dunkelgrau). Zelluläre Quellen für IL6 *in vivo* sind ebenfalls GFAP-positive Astrozyten und IBA1-positive Mikrogliazellen (Pfeile, Messbalken 20 μ m). **(D)** Repräsentatives Bild einer IBA1 immunhistochemischen Einzelfärbung. DAB emittiert kein Fluoreszenzsignal im verwendeten Filter (Messbalken 20 μ m). Modifiziert übernommen aus [261].

3.3 Oxidativer Stress und die Rolle von NRF2 bei der Läsionspathogenese

3.3.1 Die Rolle des oligodendrozytären NRF2-KEAP1-ARE-Systems bei Stressreaktionen

Der Zytotoxizitäts-Assay von oligodendrozytären OliNeu Zellen zeigt, dass die Überaktivierung von NRF2 durch die Behandlung mit dem NRF2-Aktivator Methysticin die zytotoxischen Effekte von SA nach 24 h aufhob (Abbildung 26 A). Die relative LDH Menge der Kontrollbehandlung liegt bei $33,09 \pm 1,55$, der Methysticin-Behandlung bei $44,32 \pm 3,16$, der SA-Behandlung bei $101,20 \pm 2,76$ und der Methysticin-SA-Behandlung bei $87,78 \pm 1,66$. Der Unterschied zwischen der SA-Behandlung und der Methysticin-SA-Behandlung erreicht eine statistische Signifikanz. Die Genexpression der mitochondrialen Stressmarker *Ddit3* und *Atf3* war nach Methysticin + SA Behandlung ($7,56 \pm 0,80$ und $18,73 \pm 2,22$ relative mRNA) im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 26 B, C). Auch nach der Behandlung mit Methysticin

ERGEBNISSE

alleine war die Genexpression von *Ddit3* mit einer relativen mRNA von $9,51 \pm 0,73$ signifikant stärker induziert gegenüber der Kontroll- und SA-Behandlung (Abbildung 26 B) (modifiziert übernommen [258]).

Lumineszenzmessungen an den ARE-Luc Mäusen zeigen, dass es schon nach 2 Tagen Cuprizin-Intoxikation, verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren, zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität des *Nrf2*-Gens im Gehirn kam (relative Lumineszenz $1,48 \pm 0,07$) (Abbildung 26 D). Die höchste Lumineszenz (relative Lumineszenz $2,10 \pm 0,21$) wurde nach 3 Tagen Cuprizin-Intoxikation im Corpus callosum gefunden (Abbildung 26 E, F) und der Großteil NRF2-positiver Zellen war zusätzlich positiv für OLIG2 (modifiziert übernommen [257]).

3.3.2 Die Rolle des astrozytären NRF2-KEAP1-Systems bei Stressreaktionen *in vivo*

Eine 3-wöchige Cuprizin-Intoxikation zeigte einen Verlust von Oligodendrozyten (Kontrollgruppe $1.284,00 \pm 148,90$ versus Cuprizin-Gruppe $758,20 \pm 92,66$ OLIG2-positive Zellen/mm²), eine Zunahme IBA1-positiver Zellen (Kontrollgruppe $106,20 \pm 12,26$ versus Cuprizin-Gruppe $434,50 \pm 27,09$ IBA1-positive Zellen/mm²) und eine Zunahme APP-positiver Sphäroide im Corpus callosum von behandelten (Kontrollgruppe $7,94 \pm 4,71$ versus $51,57 \pm 3,40$ APP-positive Sphäroide/mm²) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Astrozyten-spezifische KEAP1-Knockout Mäuse (*GFAP-Cre::keap1^{flox/flox} KO*) zeigen, dass die Hyperaktivierung von NRF2 bei Cuprizin-Intoxikation im Corpus callosum zu einer Tendenz von weniger Oligodendrozyten Verlust ($1.191,00 \pm 215,30$ OLIG2-positive Zellen/mm²), signifikant weniger IBA1-positiven Zellen ($229,90 \pm 41,83$ Zellen/mm²) und signifikant weniger APP-positiver Sphäroide ($11,48 \pm 4,33$ Sphäroide/mm²) verglichen mit Cuprizin-gefütterten Wildtyp Mäusen führte (Abbildung 26 G – I) (modifiziert übernommen [257]).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass erstens eine Überaktivierung von NRF2 in Oligodendrozyten *in vitro* zytotoxische SA Effekte aufheben kann. Zweitens führt eine Cuprizin-Intoxikation zu einer frühen NRF2-Aktivierung im Gehirn, und ein Knockout des NRF2-Inhibitors KEAP1 protegert zum Teil vor den Folgen einer solchen Cuprizin-Intoxikation.

ERGEBNISSE

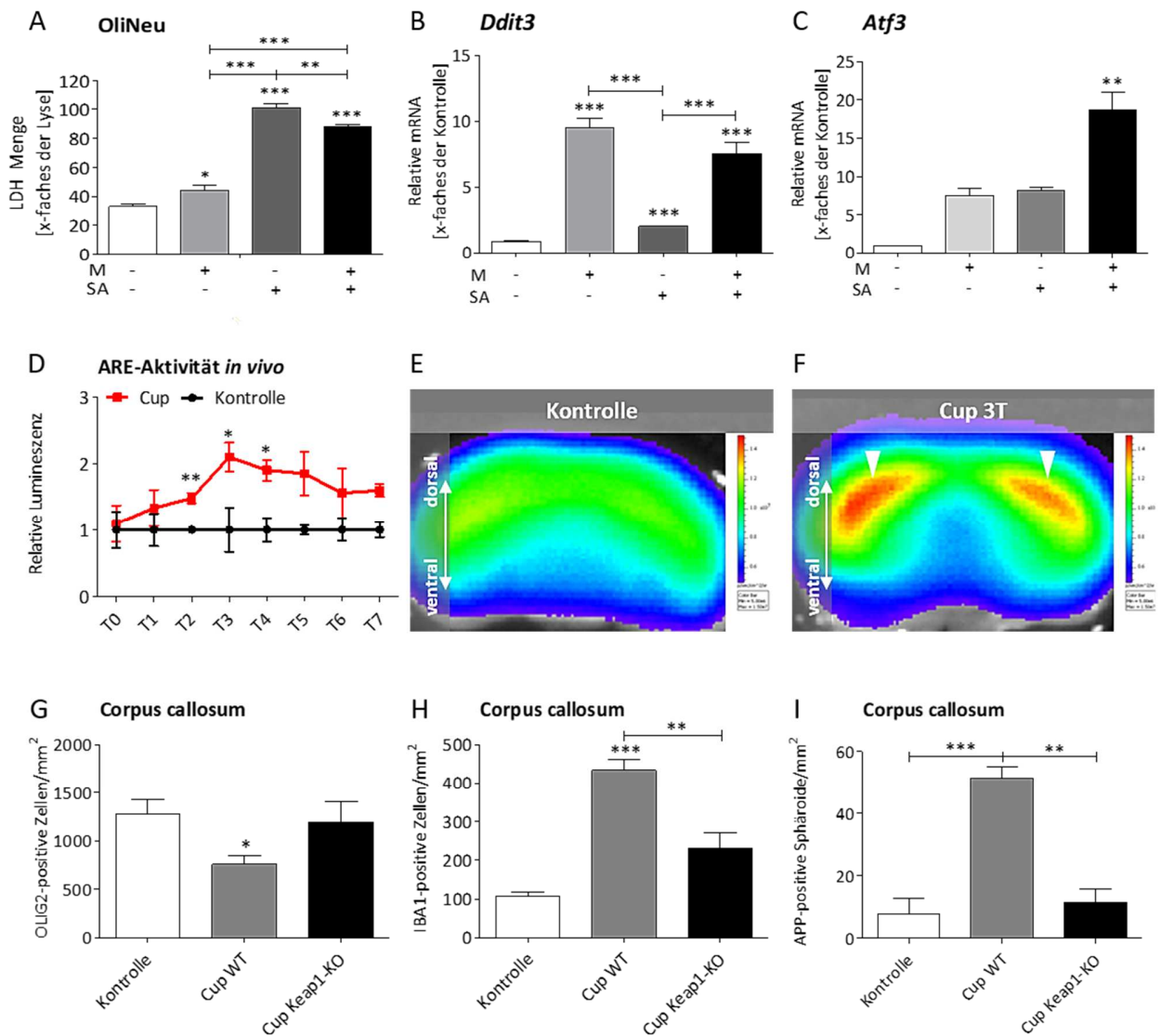


Abbildung 26: Analyse der Rolle von NRF2 in gestressten Zellen *in vitro* und *in vivo*

(A) LDH Messung der oligodendroglialen Zelllinie OliNeu mit 6-stündiger Vorbehandlung mit 50 μ M Methysticin (M) und anschließend 24-stündiger Behandlung mit 10 mM SA. Die Methysticin Behandlung konnte die zytotoxischen Effekte von SA aufheben ($n = 7$ Zellkultur-Wells aus einem Experiment). (B) und (C) Relative mRNA Menge von *Ddit3* und *Atf3* nach Behandlung mit 50 μ M Methysticin (M) und 10 mM SA ($n = 4$ Zellkultur-Wells aus einem Experiment). (D) Relative Lumineszenz der ARE-Aktivität in Kontroll- (schwarz) und Cuprizon-Tieren (rot) ($n = 4 - 5$). (E) und (F) Repräsentative Bilder der Lumineszenzmessung von je einem Kontroll- und einem 3 T-Cuprizon-Tier: Die höchste Lumineszenzintensität wurde im lateralen Corpus callosum von Cuprizon-Tieren gefunden (Pfeile). (G) – (I) Auszählung OLIG2-, IBA1-positiver Zellen und APP-positiver Sphäroide im Corpus callosum von Wildtyp und Astrozyten-spezifischen Keap1-KO-Tieren ($n = 3$). A – C modifiziert übernommen aus [258], D – I aus [257]. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des neuen CupEAE-Modells beide Hauptaspekte von MS-Läsionen, Neurodegeneration und Neuroinflammation, untersucht. Zu den neurodegenerativen Veränderungen gehören die Demyelinisierung, der Verlust von Oligodendrozyten und der axonale Schaden (Abbildung 27). Die Neuroinflammation ist durch eine Gliose, eine Immunzellinfiltration und eine Expression sowie Sekretion von Signalmolekülen charakterisiert. Der oxidative Stress und Störungen der BHS sind wichtige Schnittstellen beider Aspekte und spielen eine relevante Rolle in der MS-Pathogenese.

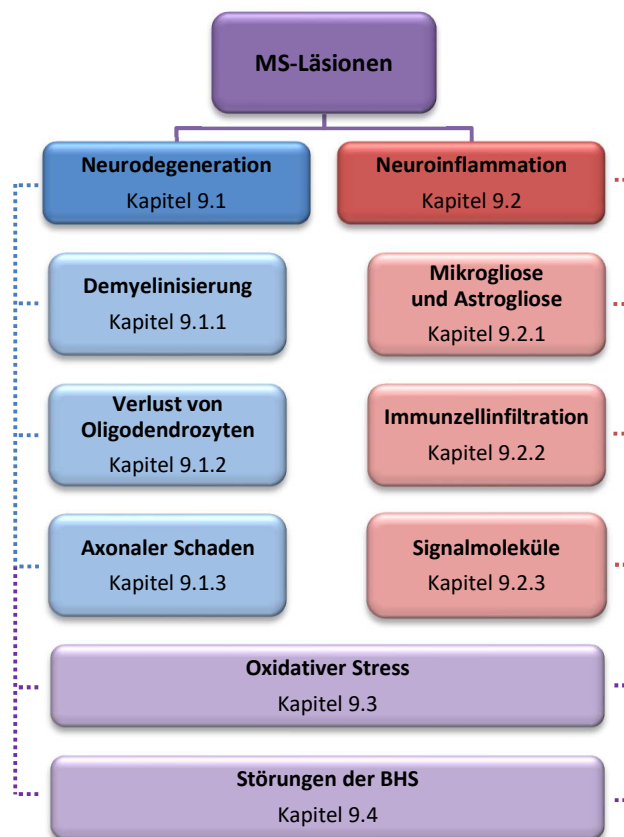


Abbildung 27: Hierarchische Darstellung der Hauptaspekte von MS-Läsionen

MS-Läsionen sind durch neurodegenerative Aspekte, wie Demyelinisierung, Verlust von Oligodendrozyten und axonalen Schaden, und durch neuroinflammatorische Aspekte, wie Gliose, Immunzellinfiltration und die Sekretion/Expression von Signalmolekülen charakterisiert. Der oxidative Stress und Störungen der BHS sind wichtige Schnittstellen der Neurodegeneration und Neuroinflammation.

4.1 Neurodegenerative Aspekte von Multiple Sklerose Läsionen

4.1.1 Demyelinisierung

Mit Hilfe von *post mortem* Biopsien und MRT-Analysen an MS-Patienten wurden demyelinisierte Bereiche im Gehirn, vor allem im frontalen, temporalen, insulären und zerebellären Kortex, dem cingulären Gyrus und auch in subkortikalen Strukturen, wie dem Thalamus, Hippocampus, und Teilen der Basalganglien, gefunden [99,264,265]. Lucchinetti und Kollegen stellten fest, dass aktive Läsionen durch eine starke Demyelinisierung charakterisiert sind und eine große pathologische Heterogenität aufweisen [95]. Diese Heterogenität kommt dadurch zu Stande, dass sich der spezifische primäre Angriffspunkt, Oligodendrozyt oder Myelin, und der zugrunde liegende Mechanismus unterscheidet, der schlussendlich zur Demyelinisierung führt, [95]. Diese können von Patient zu Patient und sogar von Läsion zu Läsion innerhalb desselben Patienten variieren. Die Demyelinisierung in *Pattern I-* und *II-*Läsionen kommt durch Makrophagen, Antikörper sowie das Komplementsystem zu Stande, und das Myelin scheint somit eher eine sekundär betroffene Struktur zu sein [95]. *Pattern III* und *IV* hingegen deuten durch eine reduzierte Myelindichte und irreguläre Myelinumhüllung der Axone darauf hin, dass das Myelin das primäre Ziel der Demyelinisierung ist. Es könnte jedoch ebenfalls sein, dass diese *Pattern I – IV*-Läsionen keine verschiedenen immunpathogenen Läsionstypen sind, sondern einen einzelnen pathophysiologischen Prozess zu unterschiedlichen Zeitpunkten darstellen [95].

In dieser Arbeit wurde mit dem Cuprizin-Modell eine Demyelinisierung im Gehirn von Mäusen induziert (Kapitel 3.1.1.3). Diese war im Corpus callosum stark ausgeprägt, und anders als bei der humanen MS, nicht im Rückenmark vorzufinden. Ähnliche Ergebnisse durch Cuprizin-Intoxikation an verschiedenen Maus-Stämmen berichten auch weitere Arbeitsgruppen [248,249,252]. Herder und Kollegen stellten nach einer 5-wöchigen Cuprizin-Intoxikation weder in SLJ noch in C57BL/6 Mäusen eine Demyelinisierung in zervikalen und thorakalen Rückenmarksabschnitten fest [249]. Auch in SWISS Mäusen wurde nach 8-wöchiger Cuprizin-Intoxikation keine Demyelinisierung im Rückenmark nachgewiesen [252]. Im Gegensatz dazu haben Schmidt und Kollegen nach 5-wöchiger Cuprizin-Intoxikation in C57BL/6 Mäusen eine starke Demyelinisierung im medialen Corpus callosum sowie in medialen Teilen des Gyrus cinguli gefunden [248]. Der direkt unterhalb des medialen Corpus callosum liegende Fornix sowie laterale Anteile des Corpus callosum und des Gyrus cinguli waren nicht betroffen. Weitere Strukturen des Gehirns, darunter der Hippocampus, der Kortex sowie das Kleinhirn sind ebenfalls anfällig für eine Cuprizin-induzierte Demyelinisierung [243,245,266]. Der Thalamus ist ein sehr stark vernetztes Gehirnareal und beherbergt wichtige Strukturen für motorische und sensorische Funktionen. Laterale Bereiche des Thalamus sind im Cuprizin-Modell ebenfalls von starker Demyelinisierung betroffen [267]. Diese unterschiedliche Ausprägung

DISKUSSION

der Demyelinisierung in verschiedenen Mausstämmen könnte dadurch zustande kommen, dass das Immunsystem verschiedener Mausstämme oder möglicherweise auch die Durchlässigkeit der BHS unterschiedlich ist. Es wurde beispielsweise festgestellt, dass C57BL/6 Mäuse ein anderes B- zu T-Zell-Verhältnis haben als SJL Mäuse [268]. Unterschiede in der Lokalisation und Ausprägung der Demyelinisierung könnten möglicherweise durch eine variable Zytoarchitektur von verschiedenen Gehirnregionen oder auch der Verwendung verschiedener Myelinproteine zur Immunisierung erklärt werden [269]. Diesbezüglich wurde bereits gezeigt, dass die inflammatorische Aktivität einer Läsion vom Myelingeht der jeweiligen Region abhängig ist [244].

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen andere Studien dahingehend, dass es einen markanten Unterschied zwischen dem Cuprizon- und dem EAE-Modell in der Lokalisation der Demyelinisierung gibt [249,270-272]. In den vorliegenden Experimenten konnte ebenfalls eine ausgeprägte Demyelinisierung im Rückenmark, jedoch nicht im Corpus callosum von EAE-Tieren gezeigt werden (Kapitel 3.1.1.3). Der laterale Thalamus ist bei EAE-Tieren, im Gegensatz zu Cuprizon-Tieren, nicht betroffen [267]. Unser CupEAE-Modell zeigte, ähnlich wie bei Cuprizon-Tieren, eine starke Demyelinisierung im Gehirn, wobei besonders mediale und laterale Anteile des Corpus callosum betroffen waren (Kapitel 3.1.2.3). Es unterscheidet sich dahingehend vom Cuprizon-Modell, dass es ebenfalls zu einer Demyelinisierung im Rückenmark kam [267]. Auch bei chronischem Krankheitsverlauf ging die Stärke der Demyelinisierung weiterhin mit den typischen klinischen Symptomen einher [262]. Der bisherige Forschungsstand mit dem CupEAE-Modell hinsichtlich der Demyelinisierung zeigt, dass das CupEAE-Modell sowohl Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Lokalisation mit dem Cuprizon-Modell als auch mit dem EAE-Modell aufweist. Weiterhin stimmen die Ergebnisse, dass es im CupEAE-Modell zu einer ausgeprägten Demyelinisierung im Corpus callosum und im Rückenmark kommt (Kapitel 3.1.2.3), mit Befunden an humanem Gewebe überein [273,274]. Weitere Experimente müssen zeigen, ob ebenfalls die im humanen ZNS betroffenen Strukturen Kortex, Gyrus cinguli, Thalamus, Hippocampus und Teile der Basalganglien im CupEAE-Modell betroffen sind.

4.1.2 Verlust von Oligodendrozyten

Die Heterogenität der Läsionen im ZNS von MS-Patienten zeigt sich ebenfalls in der Oligodendrozyten-Pathologie [95]. Während in manchen Studien mit humanem *post mortem* Material schon ein frühzeitiger Verlust von Oligodendrozyten in Läsionen gefunden wurde [87,172,275-277], kam es in anderen Studien zu keinem Verlust von Oligodendrozyten [181,278-280]. In manchen untersuchten Läsionen kam es auch in Abwesenheit von Immunzellen zu einem Verlust von Oligodendrozyten [281,282]. Diese Befunde sprechen gegen die klassische Sichtweise, dass Immunzellen das Gehirn infiltrieren und dort Oligodendrozyten und

DISKUSSION

das Myelin zerstören. Diese Befunde deuten auf eine primäre Oligodendrozyten-Pathologie hin, die den Läsionen zu Grunde liegen könnte. Auch Studien an Mäusen zeigen unterschiedliche und teils gegensätzliche Resultate. Oluich und Kollegen induzierten durch die Gabe von Diphtherietoxin eine Ablation von Oligodendrozyten in Mäusen, die den Diphtherietoxin-Rezeptor unter dem MBP Promotor exprimieren [283]. Dies führte zwar zu einem axonalen Schaden, jedoch nicht zu einer Demyelinisierung und Infiltration von Lymphozyten. Eine Akkumulation von APP, axonale Schwellungen und eine veränderte Verteilung der Ionenkanäle sowie Membranproteine am Ranvier-Schnürring sowie den Paranodien waren dabei Indizien für pathologische Veränderungen am Axon. Eine Demyelinisierung wurde weiterhin mit Analysen des g-Ratio und der Expression von Myelinproteinen, wie MAG und CNPase, ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu riefen Traka und Kollegen mit Hilfe von oligodendrozyten-spezifischen PLP-defizienten Mäusen eine primäre Ablation von Oligodendrozyten hervor [284]. Dies führte, wie auch bei Oluich und Kollegen, zu einem axonalen Schaden. Zusätzlich kam es jedoch zu einer immunvermittelten Demyelinisierung. Beide Forschungsgruppen zeigten mit ihren Ergebnissen, dass Oligodendrozyten nicht nur das Myelin bereitstellen, sondern ebenfalls die strukturelle und funktionelle Integrität von Axonen beeinflussen.

Weder im Cuprizon-Modell noch im EAE- oder dem kombinatorischen CupEAE-Modell konnte in den vorliegenden Experimenten eine signifikante Veränderung der Oligodendrozyten-Anzahl im Corpus callosum nach 3 Wochen Cuprizon-Intoxikation festgestellt werden (Kapitel 3.1.1.3, 3.1.2.3). Damit unterscheiden sich die vorliegenden Ergebnisse des Cuprizon-Modells von bisherigen Studien, in denen es nach Cuprizon-Intoxikation zu einem regionspezifisch unterschiedlich ausgeprägten Verlust von Oligodendrozyten kommt [238,239,242,244,285]. Dieser Unterschied könnte einerseits an den variablen Intoxikations- und Erholungszeiten der Mäuse, andererseits an der Wahl der Oligodendrozyten-Marker sowie der untersuchten Gehirnregion liegen [285]. Während in bisherigen Studien das ZNS unmittelbar nach einer Intoxikationszeit von 1 - 6 Wochen untersucht wurde [238,239,242,244,285], wurde im kombinatorischen CupEAE-Modell zwischen der Cuprizon-Intoxikation und der MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung eine zwei-wöchige Phase mit Normalfutter gewährt. Diese Phase diente der autonomen Expansion der Läsionen [286]. Um das Gehirn zum Zeitpunkt der MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung zu untersuchen, wurde in unseren Experimenten der Cuprizon-Gruppe ebenfalls eine zwei-wöchige Phase mit Normalfutter gewährt. Des Weiteren kann es durch Auszählungen verschiedener Marker, wie APC oder der *Glutathion-S-Transferase P* (GSTP1), zu unterschiedlichen Resultaten kommen [239,242,286]. Weiterhin scheint der Verlust von Oligodendrozyten bei EAE-Tieren regionspezifisch zu sein, da es beispielsweise im Thalamus zu einem schwachen Verlust von Oligodendrozyten nach EAE-Induktion kommt [267]. Eine detaillierte Analyse der Oligodendrozyten im CupEAE-Modell mit Hilfe von weiteren Zellmarkern, wie APC, CNPase und GSTP1, von Stressmarkern, wie DDIT3, ATF3 und ATF4 und einer Untersuchung weiterer Gehirnregionen wäre hilfreich, um die

DISKUSSION

Oligodendrozyten-Pathologie dieses Modells besser zu verstehen. Dadurch, dass ihre Pathologie in der humanen Erkrankung sehr variabel ist, lassen sich in dieser Hinsicht anhand der bisher erhobenen Daten noch keine Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit des CupEAE-Modells zur humanen MS ziehen.

4.1.3 Axonaler Schaden

Schon Ende des 19. Jahrhunderts, seit Beginn wissenschaftlicher Forschungsarbeiten zur MS, wurden Schädigungen an Axonen beschrieben [287]. Im weiteren Verlauf der Forschung wurde axonaler Schaden in aktiven Läsionen, in chronisch inaktiven Läsionen, aber auch in der NAWM von MS-Patienten gefunden [92,103,288,289]. Eine Studie an *post mortem* Gewebe von MS-Patienten zeigt, dass die Anzahl sowie die Dichte der Axone und ebenfalls das Myelin-Volumen im Corpus callosum der MS-Erkrankten gegenüber von gesunden Menschen reduziert ist [290]. Die axonale Dichte war hierbei im Schnitt um 34 % reduziert, wobei ein Trend zur stärkeren Reduktion in Rostrum- und Truncus-Anteilen des Corpus callosum beobachtet wurde [290]. An Autopsie-Gewebe wurde in den Rückenmarksbereichen, die absteigende kortikospinale, vestibulospinale und retikulospinale Trakte enthalten, ein axonaler Verlust von 22 – 41 %, je nach untersuchter Region, festgestellt [291,292]. Dabei zeigten sensorische Trakte des Rückenmarks ausschließlich Verluste an axonaler Dichte in den oberen zervikalen Regionen [291,292]. Trapp und Kollegen mutmaßten, dass die neuronalen Defizite in der schubförmig-remittierenden Verlaufsform der MS durch die inflammatorische Demyelinisierung zustande kommt, und der axonale Schaden ein wichtiges Korrelat für die irreversiblen neurologischen Einschränkungen ist [293]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Bitsch und Kollegen, die einen starken axonalen Schaden bei der sekundär-progredienten Verlaufsform feststellten, die durch irreversible neurologische Einschränkungen charakterisiert ist [294]. Zudem stellten sie einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des axonalen Schadens und der Anzahl an Makrophagen sowie CD8-positiven T-Zellen her, nicht aber mit CD4-positiven T-Zellen und den inflammatorischen Markern NOS2 und TNF α . Auch Studien von Kuhlmann und Kollegen zeigen eine Korrelation zwischen axonalem Schaden und dem Vorhandensein CD8-positiver T-Zellen [295]. Es wird vermutet, dass die während einer akuten Demyelinisierung innerhalb der Läsion freigesetzten toxisch-inflammatorischen, unspezifisch-immunologisch aktiven Signalmoleküle, wie Proteasen, Zytokine, Exzitotoxine oder freie Radikale, Axone schädigen [289]. Wenn einmal eine Schädigung initiiert wurde, führen nachfolgende Mechanismen zusätzlich zur weiteren Desintegration des Axons [296,297]. Dies könnte einen Schutzmechanismus des Neurons darstellen, um Energiereserven zu sparen und das ZNS vor fehlerhaften Signalübertragungen zu schützen.

DISKUSSION

Auch in gängigen MS-Tiermodellen wurde ein axonaler Schaden in verschiedenen Bereichen des ZNS festgestellt [298]. Kürzlich erst publizierte unsere Arbeitsgruppe, dass es bei EAE-Tieren zu axonalem Schaden im Rückenmark und bei Cuprizon-Tieren dagegen im Corpus callosum kommt [298]. Unsere Ergebnisse bestätigen bisherige Studien, dass es bei EAE-Tieren im Corpus callosum zu keinem, wohl aber bei Cuprizon-Tieren zu einem erheblichen axonalen Schaden kommt (Kapitel 3.1.1.3). Im Corpus callosum von CupEAE-Tieren wurde ebenfalls ein starker axonaler Schaden festgestellt, der jedoch weniger stark ausgeprägt war als bei Cuprizon-Tieren (Kapitel 3.1.2.3). Dieser axonale Schaden befand sich in den Bereichen, die stark demyelinisiert waren. Mit Hilfe der Tiermodelle EAE und Cuprizon wurde gezeigt, dass die Anzahl der axonalen Sphäroide positiv mit der Stärke der Demyelinisierung korreliert [298]. Ähnliche Ergebnisse konnten mit dem Lysophosphatidylcholin (LPC)-Modell gezeigt werden, in dem LPC stereotaktisch fokal in das laterale Corpus callosum appliziert wird und als Detergens die Membran vieler Zellen destabilisiert [298]. Vercellino und Kollegen stellten zudem an humanem Material fest, dass es ebenfalls im Thalamus zu einem axonalen Schaden mit ausgeprägter Demyelinisierung kommt [299]. Unsere Arbeitsgruppe bestätigte in vorangegangenen Experimenten die Befunde von Vercellino und Kollegen, vor allem im lateralen Thalamus, ebenfalls bei Cuprizon-Tieren [267].

Immunhistochemische Studien an humanem Material sowie longitudinale MRT-Studien zeigen, dass eine axonale Degeneration ebenfalls schon in einem frühen Stadium der Erkrankung vorkommt. Das Ausmaß des axonalen Schadens hing dabei mit den klinischen Einschränkungen von Patienten mit schubförmig-remittierender Verlaufsform zusammen [293,295,300,301]. Diese Veränderungen umfassten irreguläre perlschnurartige Schwellungen, axonale Sphäroide sowie eine Akkumulation von APP [99,100,302]. Weiterhin wurden solche degenerativen Veränderungen an inneren Myelinschichten festgestellt, obwohl die äußeren Schichten und Axone unbeschadet waren und keine pathologischen Auffälligkeiten zeigten [151]. Außerdem wurde eine Degradation von Myelin in Bereichen gefunden, in denen es kaum zu einer Inflammation oder Makrophageninfiltration kam. Nikić und Kollegen sowie Bitsch und Kollegen kamen zu ähnlichen Ergebnissen in Studien, die an humanem Material und auch mit Hilfe des EAE-Modells eine axonale Degeneration in Abwesenheit von Demyelinisierung und Immunzellinfiltraten feststellten [294,303]. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte in einer früheren Studie mit dem EAE-Modell aufdecken, dass die neuronale Integrität im lateralen Thalamus trotz der Abwesenheit von inflammatorischen Infiltraten gestört ist [267]. Hierbei waren die entsprechenden sensorische Trakte des Rückenmarks, die zum Thalamus projizieren, demyelinisiert. Es wird deutlich, dass axonaler Schaden nicht nur in demyelinisierten-inflammatorischen Läsionen vorkommt, sondern auch in Bereichen, die keine Demyelinisierung oder inflammatorische Infiltrate aufweisen. Letzterer Befund deutet darauf hin, dass es schon pathologische Veränderungen an Axonen gibt, bevor Immunzellen oder demyelinisierende Prozesse involviert sind. Somit

DISKUSSION

gibt es vermutlich verschiedene Arten von Läsionspathologien, die zu unterschiedlichen histologischen Phänotypen führen. Der Ursprung könnte demnach entweder primären neurodegenerativen oder aber sekundären, und damit demyelinisierend-inflammatorischen, neurodegenerativen Prozessen zu Grunde liegen [302-304]. Ob die axonale Degeneration und die inflammatorische Demyelinisierung im Falle eines primären axonalen Schadens tatsächlich unabhängig voneinander sind, ist bisher noch nicht geklärt. Ein Grund für den chronischen axonalen Schaden, der für die irreversiblen neuronalen Defizite verantwortlich gemacht wird, könnte eine wiederholte Demyelinisierung remyelinisierter Bereiche sein [104,305]. Weitere Gründe könnten das Fehlen der trophischen Unterstützung durch Myelin sowie Oligodendrozyten oder eine chronische mitochondriale Insuffizienz aufgrund des massiv erhöhten Energiebedarfs sein [297,304,306]. Zusammengefasst spiegeln diese wie auch unsere bisherigen Ergebnisse am CupEAE-Modell die humane MS in der Hinsicht wieder, dass in Läsionen des Großhirns axonaler Schaden nachgewiesen werden konnte. Parameter wie die axonale Dichte und die Anzahl der Axone sowie Zusammenhänge zwischen axonalem Schaden, der Demyelinisierung und der Immunzellinfiltration sollten in weiterführenden Studien im CupEAE-Modell untersucht werden.

4.2 Neuroinflammatorische Aspekte von Multiple Sklerose Läsionen

4.2.1 Astrogliose und Mikrogliose

Astrozyten unterstützen die Neurone funktionell sowie strukturell und reagieren sehr sensibel auf Veränderungen in der lokalen Ionen- und pH-Konzentration, die bei ZNS Schädigungen vorkommen [307,308]. Es verwundert daher nicht, dass in aktiven sowie in inaktiven Läsionen bei MS-Patienten neben der Demyelinisierung, dem Verlust von Oligodendrozyten und dem axonalem Schaden eine reaktive Astrogliose festgestellt wird [99]. Die reaktiven Astrozyten zeigen einen variablen Phänotyp. Es wurden zum einen „Gemistozyten“, also uni- oder multinukleäre, runde, eosinophile und hypertrophe Astrozyten, gefunden [99]. Zum anderen befinden sich „Creutzfeldt-Peters-Zellen“, große mit zahlreichen kleinen Kernfragmenten enthaltende Astrozyten, in MS-Läsionen [99]. Es wurde gezeigt, dass eine Cuprizon-Intoxikation zu einer starken Astrogliose im Corpus callosum und ebenfalls im Kortex und lateralen Thalamus führt [237,243,267]. Den Befund, dass es zu einer Astrogliose im Corpus callosum kommt, kann mit den vorliegenden Cuprizon-Studien bestätigt werden (Kapitel 3.1.1.2). Auch im neuen kombinatorischen CupEAE-Modell, nicht aber im EAE-Modell, wurde eine starke Astrogliose im Corpus callosum der Tiere festgestellt (Kapitel 3.1.2.2). Im lateralen Thalamus von EAE-Tieren fand unsere Arbeitsgruppe keine Astrogliose, sondern lediglich eine leicht erhöhte Anzahl GFAP-positiver Astrozyten [267].

DISKUSSION

Eine Mikrogliose wird in verschiedenen Läsionsstadien gefunden und ist unter anderem durch eine erhöhte Expression von HLA-DR auf der Zellmembran charakterisiert [95,309,310]. Im Einklang mit vorherigen Studien [243,253] wurde in den vorliegenden Experimenten im Corpus callosum und dem zerebralen Kortex bei Cuprizon-Tieren eine Mikrogliose festgestellt (Kapitel 3.1.1.2). Im Kleinhirn wurde lediglich eine Tendenz einer erhöhten Mikroglia Anzahl gefunden (Kapitel 3.1.1.2). Im lateralen Thalamus stellte unsere Arbeitsgruppe in einer früheren Studie bei dem Cuprizon- und auch bei dem EAE-Modell neben der Astrogliose ebenfalls eine ausgeprägte Mikrogliose fest [267]. Bei EAE-Tieren wurde eine Mikrogliose im Kleinhirn, nicht aber in anderen Großhirnarealen wie dem Kortex und dem Corpus callosum gefunden (Kapitel 3.1.1.2). Das neue CupEAE-Modell zeigte hingegen eine starke Mikrogliose in allen drei untersuchten Arealen, Corpus callosum, zerebraler Kortex und Kleinhirn (Kapitel 3.1.2.2). Es hebt sich somit von den anderen beiden untersuchten Tiermodellen ab. Mittels EAE-, Cuprizon- und humanen Studien wurde eine Aktivierung von Mikroglia mit der axonalen und oligodendrozytären Pathologie in Verbindung gebracht [282,300]. Nicht nur in aktiven MS-Läsionen, sondern auch in der NAWM wurden Ansammlungen aktivierter Mikroglia in direkter Nähe von gestressten oder apoptotischen Oligodendrozyten gefunden [109,110,309,311]. Diese Bereiche zeigen keine offensichtliche Infiltration von Immunzellen oder Schädigungen an der BHS und werden als präaktive Läsionen bezeichnet. Aufgrund dieses nicht-inflammatorischen Charakters sind solche präaktiven Läsionen ein Hinweis auf die *Inside-Out* Theorie als Ursprung mancher aktiver Läsionen. Unsere Arbeitsgruppe veröffentlichte ebenfalls in vorangegangenen Experimenten, dass Mikroglia schon innerhalb kürzester Zeit der Cuprizon-Intoxikation, nämlich innerhalb von 2 Tagen, aktiviert wurden und zudem die Anzahl der Oligodendrozyten ohne einhergehende Demyelinisierung sank [238,239,312]. Man geht zur Zeit davon aus, dass sich aktive Läsionen aus präaktiven Läsionen entwickeln [109]. Da es in allen Krankheitsstadien jedoch eine größere Anzahl präaktiver als aktiver Läsionen gibt, wird vermutet, dass sich nicht alle präaktiven Läsionen weiter entwickeln [109]. Als phagozytische Zellen nehmen aktivierte Mikroglia in demyelinisierenden MS-Läsionen Zelldebris auf [313,314]. Durch *in vitro* Studien an humanen Mikroglia wurde festgestellt, dass eine Inkubation mit humaner grauer und weißer Substanz zum einen die Expression von HLA-DR erhöht [315]. Zum anderen wurden die Myelinbestandteile MBP und PLP sowie das neuronale Filament NF-L in Mikroglia nachgewiesen [315]. In diesem Zusammenhang zeigten Huizinga und Kollegen sowohl in aktiven MS-Läsionen als auch in der NAWM, dass HLA-DR-positive Zellen MBP enthalten [315].

Im CupEAE-Modell konnten hinsichtlich der Mikrogliose und Astrogliose mehr Parallelen zur humanen MS-Pathologie festgestellt werden als im Cuprizon- oder EAE-Modell. Aufgrund dessen gehen wir davon aus, dass zur Untersuchung inflammatorischer Prozesse, die bei der Mikrogliose und Astrogliose eine Rolle spielen, dieses Modell besser geeignet ist, als das Cuprizon- oder das EAE-Modell. Zur Untersuchung der

DISKUSSION

Frühphase einer Läsion scheint das Cuprizone-Modell die bessere Wahl zu sein, da hier Bereiche gefunden wurden, die den präaktiven Läsionen in der humanen MS ähneln. Ob solche Analysen ebenfalls im CupEAE-Modell durchführbar sind, könnte in zukünftigen CupEAE-Experimenten mit verkürzten Cuprizone-Intoxikations-Zeiten erforscht werden.

4.2.2 Immunzellinfiltration

Die Rekrutierung von peripheren Immunzellen in das ZNS stellt einen essentiellen Aspekt der humanen MS-Pathologie dar. Sowohl aktive Läsionen als auch Infiltrate von EAE-Läsionen sind durch eine massive perivaskuläre und parenchymale Infiltration von Makrophagen, CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, CD4-positiven T-Helferzellen, B-Zellen und Plasmazellen charakterisiert [88,99,316-321]. Auch in unseren Versuchen konnte eine Invasion peripherer Immunzellen in das ZNS von EAE-Tieren festgestellt werden, die vor allem das Rückenmark und das Kleinhirn betraf und höchstwahrscheinlich der Grund für die transient-aufsteigende Paralyse der Hinterläufe ist (Kapitel 3.1.1.3). Anders als bei der humanen MS ist das Großhirn, darunter der Thalamus, jedoch nicht betroffen, obwohl es hier zu einer Demyelinisierung und aktiven Gliose kommt [267]. Es könnte sein, dass die Demyelinisierung sensorischer Signalwege im Rückenmark, die zu den betroffenen Regionen im Thalamus projizieren, zu einer indirekten inflammatorischen Antwort in diesen Regionen führt. Unser kombinatorisches CupEAE-Modell hebt sich dahingehend vom EAE-Modell ab, dass multifokale Läsionen nicht nur im Rückenmark und im Kleinhirn, sondern auch auf verschiedenen Ebenen des Großhirns der CupEAE-Tiere gefunden wurden (Kapitel 3.1.2.4, 3.1.2.5). Dass in den vorderen Gehirnregionen eine größere Anzahl an PVCs gefunden wurde, könnte an möglichen zytoarchitektonischen Unterschieden der Gehirnregionen, wie einer heterogenen BHS Permeabilität, liegen [269,322]. Unterschiede in der Herkunft, des Transkriptom und der anatomischen Eigenschaften von Mikroglia könnten ebenfalls die Immunzellinfiltration beeinflussen [323-325]. Die Infiltrate bei den CupEAE-Tieren waren perivaskulär und parenchymal verteilt und wie auch bei der humanen MS aus Monozyten und CD3-positiven T-Zellen zusammengesetzt (Kapitel 3.1.2.6) [88]. Unsere Experimente mit CupPTX-Tieren machen deutlich, dass die Formation autoreaktiver Immunzellen gegen das Myelinprotein MOG essentiell für die Immunzellinfiltration bei CupEAE-Tieren ist (Kapitel 3.1.2.8). Die zeitliche Korrelation zwischen der Infiltration peripherer Immunzellen in das Großhirn und der Cuprizone-Intoxikation bei CupEAE-Tieren könnte darauf hindeuten, dass die Immunzellinfiltration in diesem Modell von der Stärke der Demyelinisierung abhängig ist (Kapitel 3.1.2.9). In einer aktuellen EAE-Studie an für Immunzellen fluoreszierenden Reporter-mäusen (*Thy1-CFP//LysM-EGFP//CD11c-EYFP*) kam es erst 10 Tage nach der Immunisierung zu einer Infiltration EGFP-positiver neutrophilen Granulozyten in das Rückenmark, bevor der

DISKUSSION

klinischer Krankheitsbeginn und ein axonaler Schaden beobachtet wurde [326]. Um weitere Erkenntnisse zum einen über die Abhängigkeit von Demyelinisierung und Immunzellinfiltration und zum anderen über die Zeitverläufe der Immunzellinfiltration im CupEAE-Modell zu gewinnen, wäre es denkbar weitere Versuche mit variabler Cuprizin-Intoxikations- sowie Erholungszeit durchzuführen und ebenfalls mit Hilfe von fluoreszierenden Reporter-mäusen die Zeitpunkte der Immunzellinfiltration zu bestimmen. Um die Mechanismen der Immunzelleinwanderung in diesem Modell noch näher zu analysieren, wäre es hilfreich die Mäuse zu den jeweils verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs zu finalisieren und die neurodegenerativen Aspekte in verschiedenen Gehirnregionen, vor allem im Großhirn, zu untersuchen.

Ein weiteres Merkmal aktiver Läsionen ist das Vorhandensein aktivierter Makrophagen, die intrazytoplasmatische Granula mit Myelinbestandteilen beinhalten [89]. In frühen aktiven Läsionen waren diese Granula positiv für alle Haupt-Myelinproteine, wie MBP und CNPase, und in späten aktiven Läsionen nur für MBP und PLP [89]. Auch in peripheren lymphatischen Organen, wie den zervikalen Lymphknoten, wurden erhöhte Lipidansammlungen von Myelinproteinen festgestellt [260]. In den vorliegenden Experimenten wurde ebenfalls nach Cuprizin-Intoxikation eine erhöhte Lipidansammlung in den zervikalen Lymphknoten der Mäuse festgestellt (Kapitel 3.1.2.7). Wir schlussfolgern daraus, dass Myelinbestandteile nach einer Demyelinisierung zu den Lymphknoten transportiert werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Myelin Debris im Tiermodell und auch in MS-Läsionen inflammatorische Antworten regulieren kann [244]. Mit Hilfe der AT-Experimente konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass nach Cuprizin-Intoxikation eine relevante Anzahl autoreaktiver T-Zellen oder Myelin-Antigene in den Lymphknoten generiert werden, die in die Prozesse der Immunzellinfiltration eingreifen könnten (Kapitel 3.1.2.8). Auch Locatelli und Kollegen konnten zeigen, dass die Anwesenheit von Myelin-Antigenen in den zervikalen Lymphknoten selbst in einer stark proinflammatorischen Umgebung nicht ausreicht, um eine autoreaktive Immunantwort zu induzieren [327]. Da in der Milz und in den Lymphknoten keine Unterschiede zwischen CupEAE-Tieren und EAE-Tieren im Immunzell-Repertoire festgestellt wurde und es bei EAE-Tieren zu kaum Immunzellinfiltration in das Großhirn kam, vermuten wir, dass die vorherige Cuprizin-Intoxikation maßgeblich an der Infiltration der Immunzellen im CupEAE-Modell beteiligt ist (Kapitel 3.1.2.5, 3.1.2.7). Auch Traka und Kollegen zeigten, dass eine neurodegenerative Komponente, wie der Tod von Oligodendrozyten, ein Auslöser für die Invasion von T-Zellen sein kann [284]. Unsere Versuche deuten darauf hin, dass ein primäres neurodegeneratives Ereignis alleine zwar ausreicht, um eine Immunzellinfiltration in das ZNS zu bewirken, jedoch nicht, um eine ZNS-gerichtete Autoimmunität zu initiieren.

Vor unseren Studien mit dem kombinatorischen CupEAE-Modell, kombinierten bereits andere Arbeitsgruppen eine Cuprizin-Intoxikation mit einer EAE-Immunisierung [255,256]. Emerson und Kollegen

DISKUSSION

verwendeten dafür den Mausstamm SJL und begannen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der EAE-Immunsierung mit der Cuprizon-Intoxikation [256]. Ihre Ergebnisse zeigten, dass eine Cuprizon-Intoxikation 4 Wochen vor, am selben Tag oder 1 Woche nach EAE-Induktion kein Einfluss auf den klinischen Verlauf hat. Die Behandlung der Mäuse mit Cuprizon eine Woche vor EAE-Induktion hemmte allerdings den Krankheitsverlauf, und es war ein Trend zu einer verringerten CD3- und CD8-positiven Zellzahl im Blut zu sehen [256]. Da nach 14 Tagen reiner Cuprizon-Intoxikation eine starke Abnahme der CD4- und CD8-positiven Zellen im Blut zu sehen war, schlussfolgerten Emerson und Kollegen, dass Cuprizon die Funktion von T-Zellen zeitabhängig inhibiert. Histopathologische Untersuchungen des Rückenmarks und des Gehirns wurden in dieser Studie nicht durchgeführt. Maña und Kollegen verwendeten, wie auch wir, den Mausstamm C57BL/6 und führten eine 4-wöchige Cuprizon-Intoxikation durch [255]. Nach weiteren zwei Wochen auf Normalfutter wurden die Mäuse MOG-immunisiert. Die klinischen Symptome waren in diesen Tieren, verglichen mit EAE-Tieren, drastisch reduziert und es wurden weder inflammatorische Infiltrate in zervikalen, thorakalen und lumbalen Rückenmarksabschnitten, noch im Kleinhirn der Tiere gefunden. Diese Arbeitsgruppe fand, im Gegensatz zu Emerson und Kollegen, keine Veränderungen in der CD4- und CD8-positiven Zellzahl. Sie schlussfolgerten ebenfalls, dass es durch regulatorische Mechanismen, wie beispielsweise eine Deletion oder Suppression der regulatorischen T-Zellen, zu einer Immuntoleranz kommt [255]. Wie die starken Unterschiede zwischen den Ergebnissen an unserem kombinatorischen CupEAE-Modell und denen von Maña und Kollegen zu Stande kommen, könnte zum einen daran liegen, dass sie männliche und wir weibliche 12 Wochen alte Mäuse verwendeten. Weiterhin verabreichten wir für 3 Wochen anstatt für 4 Wochen ein 0,25%iges Cuprizonfutter-Gemisch, die Erholungszeit betrug bei beiden Studien 2 Wochen. Weitere Unterschiede lagen in der Durchführung der EAE. Während wir je einmal 150 µg MOG₃₅₋₅₅/CFA-Emulsion, einsatzbereit vom Hersteller, und 450 ng PTX intraperitoneal zum Zeitpunkt 0 h und 24 h injizierten, wurde bei Maña und Kollegen die MOG₃₅₋₅₅/CFA-Emulsion selbst hergestellt und 300 ng intravenös zum Zeitpunkt 0 h und 48 h injiziert. Zuletzt wurden unsere Mäuse am Peak der EAE-Erkrankung finalisiert, während die Mäuse bei Maña und Kollegen erst 40 Tage nach der Immunisierung finalisiert wurden. Es wäre zum einen denkbar, dass weibliche Mäuse anfälliger für autoimmune Reaktionen sind. Okuda und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass das Geschlecht die Empfänglichkeit einer EAE in C57BL/6 Mäusen nicht beeinflusst [328]. Zum anderen könnte durch den späten Zeitpunkt der Untersuchung bereits eine mögliche Immunzellinfiltration durch Reparaturprozesse rückgängig gemacht worden sein. Tatsächlich konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass es im Großhirn nach chronischer CupEAE zu einer reduzierten Anzahl inflammatorischer Infiltrate kam, während die Pathologie im Rückenmark vergleichbar mit der „akuten“ CupEAE war [262]. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine Cuprizon-induzierte Neurodegeneration eine Immunzellinfiltration in das Großhirn bewirken kann. Da die PVCs im Großhirn von CupEAE-Tieren das Korrelat zu MS-Läsionen im Menschen sind, ist unser kombinatorisches CupEAE-Modell

DISKUSSION

dem Cuprizon- und dem EAE-Modell für die Erforschung von Zusammenhängen zwischen Neurodegeneration und autoimmuner Immunzellinfiltration überlegen. Die meisten Imaging- und pathologischen Studien werden mit dem Großhirn der MS-Patienten durchgeführt und setzen den Fokus nicht, wie EAE-Studien, auf Läsionen im Rückenmark. Das kombinatorische CupEAE-Modell zeigt daher ein großes translationales Potential.

4.2.3 Signalmoleküle

In aktiven MS-Läsionen wurde bislang eine Vielzahl pro- sowie antiinflammatorischer Signalmoleküle gefunden, die von T-Zellen, Mikroglia, Astrozyten und auch Oligodendrozyten sekretiert werden können [288,309,329-331]. Bislang ist jedoch unklar unter welchen Voraussetzungen einzelne Zelltypen entweder pro- oder antiinflammatorische Signalstoffe produzieren, die die Inflammation weiter vorantreiben oder diese dämpfen. Mit der *Affymetrix Array* Analyse wurde *Lcn2* als das höchste induzierte Gen im Corpus callosum bei CupEAE-Tieren identifiziert und eine erhöhte LCN2-Konzentration im Serum dieser Tiere festgestellt (Kapitel 3.2.1). Klinische Befunde zeigen, dass die LCN2-Konzentration im Serum und auch im Liquor cerebrospinalis von MS-Erkrankten, vor allem bei den progredienten Verlaufsformen, deutlich erhöht ist [332-334]. Es wurde gezeigt, dass LCN2 im Gehirn von Astrozyten, Mikrogliazellen, Neuronen, Endothelzellen, und Monozyten exprimiert wird, und LCN2 Mikroglia *in vitro* proinflammatorisch polarisiert [332,335,336]. Aufgrund dieses Befundes könnte man annehmen, dass LCN2 eine eher proinflammatorische Wirkung hat und eine LCN2-Defizienz den EAE-Krankheitsverlauf verbessert. Studien mit dem EAE-Modell zeigen jedoch sehr gegensätzliche Effekte der LCN2-Defizienz [332,337]. Nam und Kollegen zeigten, dass LCN2-defiziente Mäuse nach EAE-Induktion einen milderen Krankheitsverlauf und verminderte Immunzellinfiltration, Demyelinisierung, Gliose und Anzahl MOG-spezifischer T-Zellen verglichen mit Wildtyp-Mäusen aufwiesen [337]. Berard und Kollegen, die ihre Experimente ebenfalls mit LCN2-defizienten Mäusen durchführten, stellten im Gegensatz dazu einen verschlimmerten Krankheitsverlauf gegenüber Wildtyp-Mäusen fest, was auf eine eher antiinflammatorische Wirkweise hindeutet [332]. Ein Unterschied beider Studien lag lediglich darin, dass die Mäuse bei der Studie von Nam und Kollegen 1 – 3 Wochen jünger waren als die bei Berard und Kollegen. Es wird weiterhin nicht deutlich, ob Nam und Kollegen ebenfalls weibliche Mäuse für ihre Experimente verwendet haben. Um die Relevanz dieser Unterschiede im experimentellen Aufbau für den Krankheitsverlauf der EAE zu untersuchen, könnten beide Versuche mit LCN2-defizienten Mäusen in ein und derselben Forschungseinrichtung erneut durchgeführt werden. Aufgrund bisheriger Forschungsergebnisse vermuten wir, trotz der Befunde von Berard und Kollegen, dass LCN2 sowohl im CupEAE- als auch im EAE-Modell und in der humanen MS, vermehrt proinflammatorisch

DISKUSSION

wirkt. Um mögliche proinflammatorische Effekte von LCN2 näher zu untersuchen, schließen nachfolgende Experimente unserer Arbeitsgruppe Experimente mit dem Cuprizon- EAE sowie CupEAE-Modell an LCN2-defizienten Mäusen ein. Dabei werden die Immunzellinfiltration sowie neurodegenerative Eigenschaften untersucht. Ein weiterer Fokus könnte hierbei auf die Remyelinisierungskapazität von LCN2-defizienten Mäusen gelegt werden, da bereits *in vitro* gezeigt wurde, dass LCN2 die Remyelinisierung inhibiert [334].

Mit Hilfe des *Affymetrix Arrays* wurde festgestellt, dass das Gen *Ym1* selektiv im Gehirn von CupEAE-Tieren erhöht exprimiert war (Kapitel 3.2.1). YM1 wird in Nagern vor allem von Antigen-präsentierenden Zellen, wie Mikroglia, Makrophagen und Granulozyten, sekretiert [338,339]. Im Menschen ist das Gen *Ym1* zwar nicht vorhanden, jedoch zeigt das am nächsten verwandte homologe Gen azide Chitinase *Chia*, das für das Protein AMCCase kodiert, ähnliche Funktionen [340,341]. Dieses Protein verhindert unter anderem durch Chitin-Degradation die Apoptose von Epithelzellen und scheint eine Rolle bei der angeborenen Immunabwehr zu spielen [342]. Auch bei MS-Patienten mit schubförmig-remittierender Verlaufsform wurde eine höhere Konzentration von AMCCase im Liquor cerebrospinalis gemessen als bei MS-Patienten mit sekundär-progredienter Verlaufsform und gesunden Menschen [343]. YM1 wird in der Literatur als Marker für alternativ-aktivierte, antiinflammatorische Monozyten angegeben [344,345]. Es wird vermutet, dass YM1 durch eine Kollagenproduktion die Zellproliferation und -migration sowie Regenerationsmechanismen einleitet [346-348]. Wir gehen davon aus, dass YM1 im CupEAE-Modell ebenfalls eine antiinflammatorische Funktion haben könnte. Hierbei ist jedoch noch unklar, ob diese Befunde auf die humane Pathologie übertragbar sind, da in anderen inflammatorischen Erkrankungen, wie beispielsweise Asthma, eine Blockade von AMCCase die inflammatorischen Effekte von T-Zellen verbesserte und somit ebenfalls proinflammatorische Funktionen zeigt [349].

Während der Formierung neuer Läsionen regulieren vor allem Zytokine die Rekrutierung, die Migration und wahrscheinlich auch die Infiltration von Zellen, die in inflammatorische Prozesse involviert sind [330,350,351]. Unsere genomweiten Affymetrix Analysen des Corpus callosum zeigen, dass 71 % der gemessenen Chemokine und deren Rezeptoren bei CupEAE-Tieren gegenüber der Kontrolltiere erhöht induziert sind, darunter *Ccl5* und *Cxcl11* (Kapitel 3.2.1). In aktiven demyelinisierten MS-Läsionen wird *Ccl5* von Mikroglia, aktivierten T-Zellen und Makrophagen exprimiert und kann rückwirkend Mikroglia proinflammatorisch stimulieren [330,331,352]. Des Weiteren wurde festgestellt, dass CCL5 und einer seiner Rezeptoren, CCR5, während einer akuten Phase der MS inflammatorische Zellen in das ZNS rekrutieren [263,353]. Es ist denkbar, dass in unserem kombinatorischen CupEAE-Modell, ähnlich zu den Prozessen in der humanen MS, die Aktivierung von CCL5-Signalwegen zu einer Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in das ZNS führt und Mikroglia proinflammatorisch aktiviert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass Mäuse, die defizient für die CCL5-Rezeptoren CCR1 und CCR5 sind, einen mildereren EAE-Krankheitsverlauf als

DISKUSSION

Wildtypen zeigen [354,355]. Ob dies ebenfalls für das CupEAE-Modell zutrifft, sollte in weiteren Experimenten an CCL5-Rezeptor-defizienten Mäusen analysiert werden und weiterhin die zelluläre Quelle von CCL5 in CupEAE-Tieren untersucht werden. Durch FACS-Studien mit isolierten Mikroglia aus dem Gehirn von CupEAE-Tieren konnte ein Teil der im *Affymetrix Array* erhöhten *Cxcl11* Expression Mikroglia zugeordnet werden (Kapitel 3.2.2). Es ist bekannt, dass durch die Bindung von CXCL11 an seinen Rezeptor CXCR3 aktivierte T-Zellen zu inflammatorischen Herden rekrutiert werden [356]. Auch CXCR3 und ein weiterer Ligand CXCL10 sind in MS-Läsionen erhöht induziert und in der Glia-Glia sowie Glia-Neuron Interaktion involviert [309,357-360]. Es könnte sein, dass im kombinatorischen CupEAE-Modell das von Mikroglia sezernierte CXCL11 periphere Immunzellen anlockt und dadurch diese zum Entzündungsherd rekrutiert. Um dies zu verifizieren, könnte mit Hilfe des CupEAE-Modells das Ausmaß der Immunzellinfiltration in Mikroglia-spezifischen CXCL11-defizienten Mäusen analysiert werden.

Ebenso sind die Gene *Il12rb1*, *H2-Q8* und *Pim1* bei unserem kombinatorischen CupEAE-Modell, wie auch bei Cuprizon-Tieren, in *ex vivo* isolierten Mikroglia erhöht exprimiert (Kapitel 3.2.2). Diese Gene spielen eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen, der Produktion mikroglialer Chemokine und der Antigenpräsentation [361-363]. IL12R β 1 ist eine Rezeptoruntereinheit, die zusammen mit IL23R den Rezeptor für das Chemokin IL23 darstellt. Es wurde gezeigt, dass IL12R β 1-defiziente Mäuse resistent gegen eine EAE-Induktion sind, eine IL23-Defizienz bei AT-Experimenten jedoch keinen Einfluss dieses Moleküls auf den EAE-Verlauf der Empfängermäuse hinsichtlich Inzidenz, Krankheitsbeginn und Schweregrad zeigt [364,365]. Daraus schlossen die Autoren, dass IL23 und auch dessen Rezeptor eine Rolle bei der Generierung von T-Zellen und der Initiierung von autoimmunen Prozessen während der EAE spielen. Auch bei MS-Patienten mit schubförmig-remittierender Verlaufsform wurden erhöhte Plasmalevel von IL23 festgestellt [366]. In aktiven MS-Läsionen wurden weiterhin erhöhte Genexpressionswerte von IL23 gefunden und als zelluläre Quelle Mikroglia identifiziert [367]. Es könnte sein, dass eine Produktion von IL23 einerseits und eine Expression des IL23-Rezeptors andererseits in unserem CupEAE-Modell dazu führen, dass Mikroglia weitere Mikroglia und T-Zellen zum Entzündungsherd rekrutieren und die Inflammation dadurch vorantreiben.

Neben diesen proinflammatorischen Genen war auch das antiinflammatorische Gen *Il1rn* bei Cuprizon-Tieren, und auch bei CupEAE-Tieren erhöht exprimiert (Kapitel 3.2.2). IL1RN ist ein natürlicher Antagonist des IL1 Rezeptors und wird neben Mikroglia von Immunzellen und Endothelzellen produziert [368,369]. Durch Bindung an den IL1-Rezeptor werden proinflammatorische Effekte von IL1 β unterbunden [370]. *In vitro* Experimente von Pinteaux und Kollegen zeigten, dass Mikroglia unter ischämischem Stress IL1RN sekretieren und dieses durch die Regulation des anti- und proinflammatorischen IL1 α -IL1 β Verhältnisses neuroprotektiv wirkt [371]. Beim kombinatorischen CupEAE-Modell deutet die erhöhte mikrogliale

DISKUSSION

Expression von *Il1rn*, *Cxcl11*, *Il12rb1*, *H2-Q8* und *Pim1* dennoch insgesamt auf einen eher proinflammatorischen Aktivierungsstatus hin (Kapitel 3.2.2). Es wird vermutet, dass Mikroglia während inflammatorischer Prozesse nicht nur einen pro- oder antiinflammatorischen Aktivierungsstatus annehmen, sondern sich ebenfalls Subpopulationen mit gemischtem krankheitsspezifischen Aktivierungsstatus bilden [372-374]. Keren-Shaul und Kollegen identifizierten kürzlich in einem Alzheimer-Tiermodell mit Hilfe von Einzelzell-RNA-Sequenzierung einen spezifischen neurodegenerations-assoziierten Mikroglia-Phänotyp, in dem vor allem phagozytotische Gene erhöht induziert waren [373]. Auch Sousa und Kollegen zeigen in einer aktuellen Studie mittels FACS und Einzelzell-Transkriptom-Analysen, dass Mikroglia bei dem inflammatorischen LPS-Tiermodell einen spezifischen Mikroglia-Phänotyp einnehmen [374]. Proinflammatorische Gene, darunter *Il1b*, *Tnfa* und *Ccl2*, sind dabei erhöht induziert. Eine zusätzliche globale Verminderung der Expression antiinflammatorischer, phagozytotischer und homöostatischer Gene, wie *Mrc1*, *Arg1*, *Trem2*, *Fcrls* und *P2ry12*, zeigt eine große Heterogenität ihres Phänotyps. Mikroglia, oder zumindest Subpopulationen von Mikroglia, scheinen in verschiedenen neurodegenerativen und inflammatorischen Erkrankungen einen spezifischen krankheits-assoziierten Aktivierungsstatus einzunehmen. Während Mikroglia bei akuter systemischer Inflammation ein stark proinflammatorisches Expressionsprofil aufweisen, ist dieses bei neurodegenerativen Alzheimer-assoziierten Prozessen eher antiinflammatorisch und bei neurodegenerativen ALS-assoziierten Prozessen sehr heterogen [372-374]. In der vorliegenden Studie wurde nur eine Auswahl jener erhöhten Gene im *Affymetrix Array* gemessen, die von Mikrogliazellen exprimiert werden können. Um weitere Zusammenhänge zwischen Mikroglia-Signalwegen und der Entstehung neuer Läsionen zu verstehen, wäre es denkbar in weiterführenden Experimenten mit Hilfe des CupEAE-Modells ein vollständiges Aktivierungsprofil der Mikroglia mittels Einzelzell-Transkriptom-Analysen, wie schon von Sousa und Kollegen beschrieben, zu generieren [374].

Der Großteil der Chemokine und Zytokine wird im ZNS von Gliazellen und Immunzellen sekretiert, jedoch sind auch Oligodendrozyten in der Lage Signalmoleküle auszusenden, die eine Rolle bei immunologischen Prozessen spielen [62,137,138,195,375-378]. Wir vermuten, dass Oligodendrozyten durch einen bisher unbekanntem Auslöser gestresst sind und daraufhin eine Aktivierung und ein Clustering von Mikrogliazellen bewirken. In präaktiven Läsionen wurde bereits eine oligodendrozyten-spezifische Expression von α B-Crystallin nachgewiesen, das fehlgefaltete Proteine bindet und somit Proteinaggregationen und Apoptose verhindert [110]. Weiterhin exprimieren Mikroglia in präaktiven Läsionen den Rezeptor für α B-Crystallin, was dazu führt, dass die Expression einer Vielzahl von Genen für Chemokine und immunregulatorische Moleküle induziert wird [309]. Unsere *in vitro* Experimente zeigen, dass mitochondrial gestresste Oligodendrozyten eine Reihe von Zytokin-Genen, darunter *Il6*, *Gdf15*, *Ccl5*, *Lif*, *Cxcl11* und *Cxcl12*, erhöht exprimieren (Kapitel 3.2.3.1). Ramesh und Kollegen zeigten ebenfalls, dass eine humane oligodendrozytäre

DISKUSSION

Zelllinie die Expression von *Il6* unter Stressbedingungen induziert [138]. Schon nach wenigen Tagen der Cuprizon-Intoxikation wurde ebenfalls *in vivo* eine erhöhte Expression von *Il6* im Corpus callosum festgestellt, dessen Quelle teilweise Oligodendrozyten waren (Kapitel 3.2.3.3). Es wurde gezeigt, dass IL6 inflammatorische Prozesse bei verschiedenen Erkrankungen vorantreibt [379,380]. Im Gegensatz dazu schützt eine vermehrte IL6 Produktion Cuprizon-Tiere vor einer Demyelinisierung, was auf eine antiinflammatorische Funktion im Cuprizon-Modell und somit bei neurodegenerativen Prozessen hinweist [75]. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Fokus auf die initialen Prozesse von präaktiven Läsionen gelegt, sodass eine Untersuchung von oligodendrozytärem IL6 im CupEAE-Modell bisher nicht vorgesehen ist.

Maiti und Kollegen zeigten, dass IL6 eng mit der Protektion mitochondrialer Funktionen zusammenhängt [381]. Dadurch nehmen wir an, dass eine IL6 Expression von gestressten Oligodendrozyten in präaktiven Läsionen ein Hilferuf an die umgebenden Zellen sein könnte. Auch an IL6-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass IL6 im Gehirn schädliche Effekte von oxidativem Stress sowie neurodegenerative Prozesse inhibiert [382,383]. Das Zytokin GDF15 ist ebenfalls in mitochondrialen Erkrankungen erhöht induziert und scheint funktionell mit IL6 verknüpft zu sein [384]. Bei vaskulären Verletzungen reguliert GDF15 IL6-abhängige inflammatorische Prozesse, die schlussendlich zu einer Inhibition der Atherosklerose-Progression führt [385]. Auch bei Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen werden durch GDF15 weitere zahlreiche pathologische Prozesse sowie inflammatorische Signalwege reguliert [386-388]. LIF stimuliert die Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläufern und begünstigt somit Remyelinisierungsprozesse [389]. Anhand der erhöhten oligodendrozytären Expression der *Il6*, *Gdf15* und *Lif* Gene nehmen wir an, dass mitochondrial gestresste Oligodendrozyten in präaktiven Läsionen zum Teil antiinflammatorische und neuroprotektive Prozesse einleiten und naheliegende Mikroglia aktivieren können. Wir konnten zeigen, dass das Medium der gestressten Oligodendrozyten die mikrogliale Zelllinie BV2 aktiviert (Kapitel 3.2.3.2). Basu und Kollegen konnten weiterhin durch eine Stimulation mit IL6 eine Aktivierung von primären Mikroglia aus postnatalen Ratten feststellen [390]. Die Ergebnisse dieser Studie, dass IL6 alleine *in vitro* eine Aktivierung von Mikroglia induzieren kann, können mit den vorliegenden Versuchen jedoch nicht bestätigt werden (Kapitel 3.2.3.2). Zudem können die beobachteten Aktivierungs-Effekte der Mikroglia durch eine Blockade der IL6 Proteine im OCM mit Antikörpern nur teilweise rückgängig gemacht werden (Kapitel 3.2.3.2). Nicht das am höchsten induzierte IL6 alleine, sondern der spezifische Signalmoleküle-Cocktail gestresster Oligodendrozyten, scheint in den vorliegenden Experimenten ausschlaggebend für die Oligodendrozyten-vermittelte Aktivierung der Mikroglia zu sein. Nachfolgende Experimente sollten eine Analyse der Signalmolekülsekretion gestresster Oligodendrozyten umfassen und der isolierte Effekt dieser Signalmoleküle auf die Aktivierung von Mikroglia untersucht werden.

4.3 Oxidativer Stress

Primäre Schädigungen an Oligodendrozyten können durch gestörte mitochondriale Funktionen und dem daraus resultierenden oxidativen Stress initiiert werden. Bezogen auf die Demyelinisierung und die Pathologie von Oligodendrozyten wurde gezeigt, dass mitochondriale Mutationen und oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei der Formierung neuer humaner MS-Läsionen spielen [257,391-393]. Oxidativer Stress und proinflammatorische Zytokine führten in einem Zellkultur-Modell mit zerebellären Schnitten zur Demyelinisierung und axonalem Schaden [126]. Zudem findet man in sich entwickelnden MS-Läsionen sowohl Anzeichen reaktiver Sauerstoff- als auch Stickstoff-Spezies und von oxidativem Stress, der oft mit apoptotischen Oligodendrozyten assoziiert wird [128]. Bislang ist noch ungeklärt, welche Prozesse hierbei eine Stressreaktion in Oligodendrozyten hervorrufen. Ein Faktor, der zu oligodendrozytärem Stress, gestörten mitochondrialen Funktionen und erhöhtem ROS Level führen kann, ist eine Akkumulation von Mutationen im mitochondrialen Genom [394]. Die mtDNA ist mit einer 10-fach höheren Mutationsrate deutlich anfälliger für Mutationen als die chromosomale DNA [124]. Verglichen mit anderen Zellpopulationen haben Oligodendrozyten eine schlechtere Kapazität ihre mtDNA zu reparieren, was möglicherweise auf Unterschieden in der Expression von Genen beruht, die bei Reparaturprozessen der DNA beteiligt sind [125]. Es wurde gezeigt, dass Oligodendrozyten-Vorläuferzellen entweder mehr ROS produzieren oder eine niedrigere Kapazität haben ROS zu beseitigen als Astrozyten [395-397]. Sie reagieren folglich sensitiver auf oxidative Prozesse, wodurch Probleme bei Reparaturprozessen entstehen könnten. Ein möglicher Grund dafür ist der hohe Gehalt an Eisen, das harmlose Peroxide in schädliche Radikale umwandeln kann [395,398]. ROS wird hauptsächlich mit schädlichen Auswirkungen auf das ZNS, wie der Apoptose von Oligodendrozyten, in Verbindung gebracht. Oxidativer Stress kann durch eine Effizienzverringerung seiner Transporter zu einem Anstieg der extrazellulären Konzentration des hauptexzitatorischen Neurotransmitters Glutamat führen [399]. Oligodendrozyten sind sehr anfällig für eine solche AMPA/Kainat Rezeptor-vermittelte Glutamat Exzitotoxizität [400,401]. Eine Blockade der Rezeptoren führte zu einem mildereren klinischen EAE-Verlauf, verringertem axonalem Schaden und geringerem Verlust von Oligodendrozyten [402]. Ebenso führt eine Behandlung mit dem Antioxidans α -Liponsäure während der EAE zu einem verbesserten klinischen Score sowie zu verringerter Inflammation, Demyelinisierung, axonalem Schaden und verminderter Infiltration von CD3-positiven T-Zellen und CD11-positiven Monozyten ins Rückenmark [139].

Oligodendrozyten scheinen nicht nur passiv während Stressreaktionen betroffen zu sein, sondern sie sind ebenfalls in der Lage, diese zu bekämpfen. Ein mögliches Beispiel hierfür ist die Tatsache, dass sich nicht alle präaktiven Läsionen zu aktiven Läsionen weiterentwickeln, sondern sich vermutlich zurückbilden können. Diese Zurückbildung könnte mit der Expression von *Nrf2* zusammenhängen, da schon früh eine Aktivierung

DISKUSSION

des NRF2-KEAP1-ARE-Signalwegs, besonders im Corpus callosum, zu sehen ist, die Cuprizon-vermittelten Stressreaktionen entgegen wirken könnte (Kapitel 3.3.1). Als zelluläre Quelle von NRF2 wurden vor allem Oligodendrozyten, aber auch Astrozyten, identifiziert. Eine Astrozyten-spezifische Hyperaktivierung des NRF2-KEAP1-ARE-Systems protegierte das Gehirn vor einer Cuprizon-induzierten Neurodegeneration (Kapitel 3.3.2). Ein Grund dafür könnte die NRF2-vermittelte Transkriptionsregulation einer Reihe antioxidativer Gene sein [403]. Unsere Arbeitsgruppe stellte kürzlich in einer Studie fest, dass eine solche Hyperaktivierung in Oligodendrozyten eine mitochondriale Inhibition nur teilweise aufhebt [258]. Die Unterdrückung des NRF2-KEAP1-ARE-Systems auf Genebene führte im Gegensatz dazu zu verringerter metabolischer Aktivität und erhöhter Depolarisierung der mitochondrialen Membran sowie gesteigerter Zytotoxizität [258]. Das NRF2-KEAP1-ARE-System scheint somit eine Schlüsselfunktion bei der Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen im Kontext der mitochondrialen Dysfunktion einzunehmen. Auch in aktiven MS-Läsionen wurde vor allem in degenerierenden Zellen und in Oligodendrozyten eine erhöhte Expression von *Nrf2* festgestellt [135]. Um näher zu untersuchen, inwiefern das oligodendrozytäre NRF2-KEAP1-ARE-System zur Bekämpfung von oxidativem Stress *in vivo* beiträgt, sollten zukünftige Experimente Cuprizon- sowie CupEAE-Studien umfassen, in denen eine Hyperaktivierung sowie eine Hypoaktivierung des NRF2-KEAP1-ARE-Systems spezifisch in Oligodendrozyten induziert wird.

Der Übergang von einer präaktiven in eine aktive Läsion hingegen könnte zunächst eine Oligodendrozyten-vermittelte Aktivierung von Mikrogliazellen bedingen, wenn beispielsweise das NRF2-KEAP1-ARE-System in Oligodendrozyten versagt oder überfordert ist. Im weiteren Verlauf könnten Oligodendrozyten wiederum weitere Mikrogliazellen aktivieren, was letztendlich zur Neuroinflammation mit einhergehender Schädigung von Oligodendrozyten, Demyelinisierung und axonalem Schaden führt. Neben der Elektronen-Transport-Kette in Mitochondrien ist das „oxidativer *Burst*“-System von Mikrogliazellen eine wichtige Quelle von ROS. Durch dieses System werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die wiederum die Expression einiger Gene induziert, die bei der humanen MS und dem EAE-Modell eine Rolle spielen [404-407]. Diese umfassen beispielsweise den proinflammatorischen Marker NOS2 sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. Ebenso sind Metalloproteasen bei Redox-Reaktionen beteiligt, die bekanntermaßen eine Rolle bei der Infiltration peripherer Lymphozyten in das ZNS spielen [408-410]. Es wäre denkbar, dass Mikroglia im weiteren Verlauf gestresste Oligodendrozyten entfernen, um Platz für neue Vorläuferzellen zu schaffen. In diesem Zusammenhang zeigten Yeo und Kollegen, dass CD137L-aktivierte Mikrogliazellen die Apoptose von Oligodendrozyten durch die Produktion von ROS induzieren [411]. Es wäre denkbar, dass sich diese Prozesse unkontrolliert weiterentwickeln, bis es zu einer starken Inflammation und Demyelinisierung kommt.

4.4 Störungen der Blut-Hirn-Schranke

In MS-Läsionen und ebenfalls in der NAWM ist die BHS pathologisch verändert, sodass man davon ausgeht, dass der Eintritt von Immunzellen in das ZNS dadurch erleichtert wird [69,149,412,413]. Bisher ist noch weitestgehend ungeklärt, ob eine Veränderung oder Schädigung durch externe Stimuli zustande kommt, oder aber ob die BHS intrinsisch verändert wird. Im Einklang mit der gängigen Sichtweise, dass periphere Immunzellen die BHS verändern, wurde gezeigt, dass Dysfunktionen der BHS der Immunzellinfiltration vorausgehen und damit zur Läsionspathogenese beitragen können [67,69,414]. Die immunvermittelte Aktivierung oder Schädigung der BHS wird heute nicht als primäre Ursache der MS gesehen, dennoch trägt sie signifikant zur Läsionspathogenese bei [415]. In chronischen Läsionen wurde ein vergrößerter perivaskulärer Bereich und eine erhöhte Expression perivaskulärer Matrixproteine festgestellt [416,417]. In aktiven Läsionen wurde des Weiteren ein Abbau und eine Desorganisation von *Tight Junction* Proteinen identifiziert [149]. Eine Veränderung der Expression der *Tight Junction* Proteine durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, ROS und oxidativen Stress beeinflusst negativ die Stabilität und Permeabilität der BHS [418-421]. Astrozytäres ROS begünstigt eine Schädigung der BHS und dadurch die Anheftung von Immunzellen an die luminale Seite der Gefäße [422]. Endothelzellen und weitere immunologisch-aktive Zellen können die Expression von Adhäsionsmolekülen sowie Chemokinen und deren Rezeptoren induzieren [143,350,423]. Die Zytokine TNF α , IL1 β , IFN γ und das in unserem CupEAE-Modell erhöht induzierte CCL5 können durch eine immunologische Aktivierung von Endothelzellen die Eigenschaften der BHS verändern [143,350,424]. CCL5 könnte im CupEAE-Modell bewirken, dass Endothelzellen ihre ICAM-1 und VCAM-1 Expression erhöhen, deren Interaktion mit Immunzellen einen Teilprozess der Immunzellinfiltration in das ZNS darstellt [425-427]. Eine Erhöhung dieser Adhäsionsmoleküle wird folglich direkt mit der Infiltration von Immunzellen durch die BHS in Verbindung gebracht [350]. Unsere Arbeitsgruppe konnte unlängst zeigen, dass ICAM-1 und VCAM-1 im Corpus callosum selektiv bei CupEAE-Tieren erhöht induziert ist [262]. In diesem Modell ist die Expression von Komponenten der vaskulären Membranen, wie das astrozytäre GFAP sowie AQP4, unterbrochen oder fokal vermindert (Kapitel 3.1.2.6). Da ebenfalls im Rückenmark von EAE-Tieren ein Verlust der polarisierten AQP4-Expression in astrozytären Endfüßen und des Ankerproteins für AQP4, der Dystrophin-Dystroglycan-Komplex, in der Nähe von inflammatorischen Läsionen festgestellt wurde, gehen wir davon aus, dass die Astrozyten es weder im EAE-, noch im CupEAE-Modell schaffen, ihre AQP4-Expression aufrecht zu erhalten [428-431]. Ein möglicher Grund dafür ist die erhöhte Expression von IL1 β , das eine erhöhte Expression von MMP-9 induziert und dieses wiederum *Tight Junction*-assoziierte Proteine, wie den Dystroglycan-Rezeptor, spaltet, der Astrozytenfortsätze in der Basalmembran verankert [424,432-435]. Letztendlich führt dies zur Instabilität der BHS und erleichtert die Einwanderung von Immunzellen aus den Blutgefäßen in das Gehirnparenchym. Auch das im *Affymetrix Array* stark induzierte

DISKUSSION

LCN2 scheint in Prozessen der BHS-Schädigung involviert zu sein, da es bei Wildtyp Mäusen zu einer größeren Schädigung der BHS kam als bei LCN2-defizienten Mäusen [335]. Es ist bekannt, dass LCN2 die Degradierung von MMP-9 durch Komplexbildung reduziert, sodass wir annehmen, dass dadurch die Verankerung der Astrozytenfortsätze in der Basalmembran gelöst werden könnten [436,437]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass LCN2 die Expression der Chemokine CXCL9 – 11 unter inflammatorischen Bedingungen reguliert [438]. Bisher unveröffentlichte Studien unserer Arbeitsgruppe weisen ebenfalls darauf hin, dass die Chemokine CXCL10 und CXCL11 im kombinatorischen CupEAE-Modell von Astrozyten exprimiert werden und zudem CXCL10-positive Zellen ebenfalls positiv für LCN2 sind (durchgeführt von Cand. med. dent. Markus Beissel und Dr. Fatemeh Taklimie Ranjbar). In weiterführenden immunhistochemischen Studien wäre es denkbar, regionale Unterschiede der BHS in CupEAE-Tieren zu untersuchen, wodurch die regionsspezifische Einwanderung der Immunzellen möglicherweise erklärt werden könnte. Schließlich sollte die Rolle von LCN2 und CCL5 bei Störungen der BHS im CupEAE-Modell analysiert werden und mögliche Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Expression dieser Signalmoleküle und der Ausprägung der Immunzellinfiltration oder neurodegenerativer Prozesse erforscht werden.

4.5 Schlussfolgerungen

Trotz intensiver Forschung ist die MS-Pathogenese bis heute nicht ursächlich geklärt. MS-Erkrankungen werden mit multiplen internen und externen Faktoren in Verbindung gebracht, wie der genetischen Prädisposition, dem Darm-Mikrobiom, der Geografie, der Hygiene, Umweltgiften, Rauchen sowie Übergewicht. Die *Outside-In* Theorie, die einen initialen ZNS-externen Auslöser postuliert, wurde in den letzten Jahrzehnten durch Studien an der humanen MS sowie durch Experimente an Tiermodellen mehr und mehr in Frage gestellt. Die alternative *Inside-Out* Theorie wird insbesondere durch folgende Erkenntnisse unterstützt: Erstens, die medikamentöse Suppression des Immunsystems hält lediglich die Schübe, aber nicht die progressive Neurodegeneration auf. Zweitens, präaktive Läsionen ohne Beteiligung des peripheren Immunsystems kommen in großer Anzahl im gesamten ZNS vor. Drittens, ein ZNS-intrinsischer Prozess, wie eine Oligodendrozyten-Ablation, kann eine Infiltration von Immunzellen in das Großhirn hervorrufen. Unsere bisherigen Ergebnisse am kombinatorischen CupEAE-Modell unterstützen bisherige Befunde, die auf die *Inside-Out* Theorie hindeuten. Ein ZNS-interner Auslöser, hervorgerufen durch die Cuprizon-Intoxikation, begünstigt eine Infiltration peripherer Immunzellen durch nachfolgende EAE-Induktion in das ZNS. Die Ergebnisse mit dem neuen kombinatorischen CupEAE-Modell ermutigen uns, dass weiterführende Experimente mit Hilfe dieses Modells helfen können, Prozesse, die der MS-Pathologie zu Grunde liegen,

DISKUSSION

aufzudecken. Zusammenfassend tragen die vorliegenden Ergebnisse zum aktuellen Stand der MS-Forschung folgendes bei:

(I) Unser neues kombinatorisches MS-Modell „CupEAE“ weist mehr Parallelen zur humanen MS auf als bisherige MS-Tiermodelle und ist aufgrund dessen insbesondere zur Erforschung der Zusammenhänge von neurodegenerativen Prozessen und der Immunzellinfiltration in das Großhirn geeignet.

(II) Aufgrund der Ergebnisse aus Experimenten an CupEAE-Tieren unterstützen wir die *Inside-Out* Theorie dahingehend, dass ZNS-endogene Prozesse an der Manifestation autoimmuner Prozesse innerhalb des ZNS beteiligt sind.

(III) Mit Hilfe von genomweiten *Affymetrix Array* Analysen, Genexpressionsstudien von *ex vivo* isolierten Mikrogliazellen und Chemokin *Array* Analysen von oligodendroglialen Zellen deckten wir gehirn-intrinsische Signalmoleküle, wie beispielsweise LCN2, CXCL11 und IL6, auf, die möglicherweise eine Rolle bei der initialen Läsionspathogenese und der Anlockung und Infiltration von peripheren Immunzellen spielen.

Zukünftige Studien am CupEAE-Modell könnten der Identifizierung neuer therapeutischer Ziele dienen, wodurch das Einwandern autoimmuner Zellen in das ZNS verhindert werden könnte. Dieses Modell stellt weiterhin ein bereicherndes Werkzeug zum Testen pharmakologischer Interventionen dar, die endogene Reparaturmechanismen in einem entzündlichen Umfeld fördern und oxidative Schädigungen abmildern. Eine Kombination solcher immunmodulativer, reparaturfördernder und antioxidativer Wirkstoffe könnte ein vielversprechender Ansatz für neue Basistherapien bei der MS darstellen.

5 Literaturverzeichnis

1. Bottenstein JE, Sato GH. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979; 76: 514-517
2. Society NM. <https://www.nationalmssociety.org/Research/Research-We-Fund/Past-Research-Efforts#section-1>. In; 2018
3. Petersen G., Wittmann R., Arndt V. et al. Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland. *Der Nervenarzt* 2014:
4. Gold R. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2014:
5. Schmedt N, Khil L, Berger K et al. Incidence of Multiple Sclerosis in Germany: A Cohort Study Applying Different Case Definitions Based on Claims Data. *Neuroepidemiology* 2017; 49: 91-98 DOI: 10.1159/000481990
6. Ascherio A, Munger KL. Chapter 4 - Epidemiology of Multiple Sclerosis: Environmental Factors. *Blue Books of Neurology* 2010; 35: 57-82
7. Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology* 2014; 13: 700-709 DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70041-9
8. Robertson N, Compston A. Surveying multiple sclerosis in the United Kingdom. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1995; 58: 2-6
9. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of autoimmunity* 2015; 64: 13-25 DOI: 10.1016/j.jaut.2015.06.010
10. Bertrams J, Kuwert E, Liedtke U. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Tissue antigens* 1972; 2: 405-408
11. Naito S, Namerow N, Mickey MR et al. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue antigens* 1972; 2: 1-4
12. Wang Z, Sadovnick AD, Traboulsee AL et al. Nuclear Receptor NR1H3 in Familial Multiple Sclerosis. *Neuron* 2016; 92: 555 DOI: 10.1016/j.neuron.2016.09.028
13. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature medicine* 2003; 9: 213-219 DOI: 10.1038/nm820
14. Wang L, Schuster GU, Hultenby K et al. Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 13878-13883 DOI: 10.1073/pnas.172510899
15. Polman CH, Reingold SC, Banwell B et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* 2011; 69: 292-302 DOI: 10.1002/ana.22366

LITERATURVERZEICHNIS

16. Polman CH, Reingold SC, Edan G et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of neurology* 2005; 58: 840-846 DOI: 10.1002/ana.20703
17. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 2018; 17: 162-173 DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2
18. McDonald WI, Compston A, Edan G et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2001; 50: 121-127
19. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907-911
20. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF et al. Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1965; 122: 552-568
21. Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology* 2003; 61: 1528-1532
22. Scott TF, Schramke CJ. Poor recovery after the first two attacks of multiple sclerosis is associated with poor outcome five years later. *Journal of the neurological sciences* 2010; 292: 52-56 DOI: 10.1016/j.jns.2010.02.008
23. Novotna M, Paz Soldan MM, Abou Zeid N et al. Poor early relapse recovery affects onset of progressive disease course in multiple sclerosis. *Neurology* 2015; 85: 722-729 DOI: 10.1212/WNL.0000000000001856
24. Scott TF, Gettings EJ, Hackett CT et al. Specific clinical phenotypes in relapsing multiple sclerosis: The impact of relapses on long-term outcomes. *Multiple sclerosis and related disorders* 2016; 5: 1-6 DOI: 10.1016/j.msard.2015.10.001
25. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain : a journal of neurology* 1989; 112 (Pt 6): 1419-1428
26. Thompson AJ, Polman CH, Miller DH et al. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 1997; 120 (Pt 6): 1085-1096
27. Braley TJ, Chervin RD. Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms, evaluation, and treatment. *Sleep* 2010; 33: 1061-1067
28. Nortvedt MW, Riise T, Myhr KM et al. Reduced quality of life among multiple sclerosis patients with sexual disturbance and bladder dysfunction. *Multiple sclerosis* 2001; 7: 231-235 DOI: 10.1177/135245850100700404
29. Hurwitz BJ. Analysis of current multiple sclerosis registries. *Neurology* 2011; 76: S7-13 DOI: 10.1212/WNL.0b013e31820502f6
30. Poser S, Poser W, Schlaf G et al. Prognostic indicators in multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica* 1986; 74: 387-392

LITERATURVERZEICHNIS

31. Ragonese P, Aridon P, Salemi G et al. Mortality in multiple sclerosis: a review. *Eur J Neurol* 2008; 15: 123-127 DOI: 10.1111/j.1468-1331.2007.02019.x
32. Montalban X, Gold R, Thompson AJ et al.ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 2018; 24: 96-120 DOI: 10.1177/1352458517751049
33. Grigoriadis N, Linnebank M, Alexandri N et al. Considerations on long-term immuno-intervention in the treatment of multiple sclerosis: an expert opinion. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2016; 17: 2085-2095 DOI: 10.1080/14656566.2016.1232712
34. Boz C, Ozmenoglu M, Velioglu S et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta. *Clinical neurology and neurosurgery* 2006; 108: 124-128 DOI: 10.1016/j.clineuro.2005.01.005
35. Waubant E, Goodkin D, Bostrom A et al. IFNbeta lowers MMP-9/TIMP-1 ratio, which predicts new enhancing lesions in patients with SPMS. *Neurology* 2003; 60: 52-57
36. Kozovska ME, Hong J, Zang YC et al. Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology* 1999; 53: 1692-1697
37. Liu Z, Pelfrey CM, Cotleur A et al. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 2001; 112: 153-162
38. Chen M, Chen G, Nie H et al. Regulatory effects of IFN-beta on production of osteopontin and IL-17 by CD4+ T Cells in MS. *European journal of immunology* 2009; 39: 2525-2536 DOI: 10.1002/eji.200838879
39. Guo B, Chang EY, Cheng G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation* 2008; 118: 1680-1690 DOI: 10.1172/JCI33342
40. Mottonen M, Isomaki P, Saario R et al. Interleukin-10 inhibits the capacity of synovial macrophages to function as antigen-presenting cells. *British journal of rheumatology* 1998; 37: 1207-1214
41. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain : a journal of neurology* 1997; 120 (Pt 5): 865-916
42. Moseman EA, Wu T, de la Torre JC et al. Type I interferon suppresses virus-specific B cell responses by modulating CD8(+) T cell differentiation. *Science immunology* 2016; 1:
43. Ross CJ, Towfic F, Shankar J et al. A pharmacogenetic signature of high response to Copaxone in late-phase clinical-trial cohorts of multiple sclerosis. *Genome medicine* 2017; 9: 50 DOI: 10.1186/s13073-017-0436-y
44. Goodin DS. Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis. *Handbook of clinical neurology* 2014; 122: 455-464 DOI: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00020-0
45. Goodkin DE, Kinkel RP, Weinstock-Guttman B et al. A phase II study of i.v. methylprednisolone in secondary-progressive multiple sclerosis. *Neurology* 1998; 51: 239-245

LITERATURVERZEICHNIS

46. Frequin ST, Lamers KJ, Barkhof F et al. Follow-up study of MS patients treated with high-dose intravenous methylprednisolone. *Acta neurologica Scandinavica* 1994; 90: 105-110
47. Weinschenker BG, O'Brien PC, Petterson TM et al. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Annals of neurology* 1999; 46: 878-886
48. Martinelli Boneschi F, Rovaris M, Capra R et al. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *The Cochrane database of systematic reviews* 2005: CD002127 DOI: 10.1002/14651858.CD002127.pub2
49. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2006; 354: 899-910 DOI: 10.1056/NEJMoa044397
50. Kappos L, Radue EW, O'Connor P et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2010; 362: 387-401 DOI: 10.1056/NEJMoa0909494
51. Penn I, Starzl TE. Malignant tumors arising de novo in immunosuppressed organ transplant recipients. *Transplantation* 1972; 14: 407-417
52. Oh J, O'Connor PW. Established disease-modifying treatments in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Current opinion in neurology* 2015; 28: 220-229 DOI: 10.1097/WCO.0000000000000202
53. Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI et al. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2002; 346: 158-164 DOI: 10.1056/NEJMoa011341
54. Evangelou N, DeLuca GC, Owens T et al. Pathological study of spinal cord atrophy in multiple sclerosis suggests limited role of local lesions. *Brain : a journal of neurology* 2005; 128: 29-34 DOI: 10.1093/brain/awh323
55. Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet* 2018; 391: 1263-1273 DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30475-6
56. Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends in cell biology* 1993; 3: 191-197
57. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C et al. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26: 7907-7918 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1299-06.2006
58. Watanabe M, Toyama Y, Nishiyama A. Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion. *Journal of neuroscience research* 2002; 69: 826-836 DOI: 10.1002/jnr.10338
59. Rivers LE, Young KM, Rizzi M et al. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nature neuroscience* 2008; 11: 1392-1401 DOI: 10.1038/nn.2220

LITERATURVERZEICHNIS

60. Nishiyama A, Lin XH, Giese N et al. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *Journal of neuroscience research* 1996; 43: 299-314 DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960201)43:3<299::AID-JNR5>3.0.CO;2-E
61. Peferoen L, Kipp M, van der Valk P et al. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology* 2014; 141: 302-313 DOI: 10.1111/imm.12163
62. Cannella B, Raine CS. Multiple sclerosis: cytokine receptors on oligodendrocytes predict innate regulation. *Annals of neurology* 2004; 55: 46-57 DOI: 10.1002/ana.10764
63. Philips T, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *The Journal of clinical investigation* 2017; 127: 3271-3280 DOI: 10.1172/JCI90610
64. Weickenmeier J, de Rooij R, Budday S et al. The mechanical importance of myelination in the central nervous system. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 2017; 76: 119-124 DOI: 10.1016/j.jmbbm.2017.04.017
65. Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in immunology* 2005; 26: 485-495 DOI: 10.1016/j.it.2005.07.004
66. Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP et al. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 14108-14113 DOI: 10.1073/pnas.241508198
67. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 2013; 61: 1939-1958 DOI: 10.1002/glia.22575
68. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 2009; 32: 638-647 DOI: 10.1016/j.tins.2009.08.002
69. Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1812: 252-264 DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.06.017
70. Prinz M, Tay TL, Wolf Y et al. Microglia: unique and common features with other tissue macrophages. *Acta neuropathologica* 2014; 128: 319-331 DOI: 10.1007/s00401-014-1267-1
71. Gemma C, Bachstetter AD. The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience* 2013; 7: 229 DOI: 10.3389/fncel.2013.00229
72. Derecki NC, Cronk JC, Lu Z et al. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* 2012; 484: 105-109 DOI: 10.1038/nature10907
73. Fetler L, Amigorena S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 2005; 309: 392-393 DOI: 10.1126/science.1114852
74. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 1996; 19: 312-318
75. Petkovic F, Campbell IL, Gonzalez B et al. Reduced cuprizone-induced cerebellar demyelination in mice with astrocyte-targeted production of IL-6 is associated with chronically activated, but less

LITERATURVERZEICHNIS

- responsive microglia. *Journal of neuroimmunology* 2017; 310: 97-102 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.07.003
76. Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochemistry international* 2001; 39: 381-391
77. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y et al. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007; 27: 10714-10721 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1922-07.2007
78. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology* 2009; 4: 399-418 DOI: 10.1007/s11481-009-9164-4
79. Revesz T, Kidd D, Thompson AJ et al. A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 1994; 117 (Pt 4): 759-765
80. Fazekas F, Barkhof F, Filippi M et al. The contribution of magnetic resonance imaging to the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology* 1999; 53: 448-456
81. Gilmore CP, Bo L, Owens T et al. Spinal cord gray matter demyelination in multiple sclerosis-a novel pattern of residual plaque morphology. *Brain pathology* 2006; 16: 202-208 DOI: 10.1111/j.1750-3639.2006.00018.x
82. Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J et al. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain pathology* 2007; 17: 38-44 DOI: 10.1111/j.1750-3639.2006.00041.x
83. Gilmore CP, Donaldson I, Bo L et al. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2009; 80: 182-187 DOI: 10.1136/jnnp.2008.148767
84. Vercellino M, Plano F, Votta B et al. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2005; 64: 1101-1107
85. Calabrese M, Filippi M, Gallo P. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology* 2010; 6: 438-444 DOI: 10.1038/nrneurol.2010.93
86. Geurts JJ, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2008; 7: 841-851 DOI: 10.1016/S1474-4422(08)70191-1
87. Peterson JW, Bo L, Mork S et al. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* 2001; 50: 389-400
88. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum* 2013; 19: 901-921 DOI: 10.1212/01.CON.0000433291.23091.65
89. Bruck W, Porada P, Poser S et al. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* 1995; 38: 788-796 DOI: 10.1002/ana.410380514

LITERATURVERZEICHNIS

90. Ratelade J, Verkman AS. Neuromyelitis optica: aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012; 44: 1519-1530 DOI: 10.1016/j.biocel.2012.06.013
91. Vellinga MM, Oude Engberink RD, Seewann A et al. Pluriformity of inflammation in multiple sclerosis shown by ultra-small iron oxide particle enhancement. *Brain : a journal of neurology* 2008; 131: 800-807 DOI: 10.1093/brain/awn009
92. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain : a journal of neurology* 2009; 132: 1175-1189 DOI: 10.1093/brain/awp070
93. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW et al. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 1983; 62: 219-232
94. Hayashi T, Morimoto C, Burks JS et al. Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Annals of neurology* 1988; 24: 523-531 DOI: 10.1002/ana.410240408
95. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* 2000; 47: 707-717
96. Dutta R, Trapp BD. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Progress in neurobiology* 2011; 93: 1-12 DOI: 10.1016/j.pneurobio.2010.09.005
97. Fischer MT, Sharma R, Lim JL et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain : a journal of neurology* 2012; 135: 886-899 DOI: 10.1093/brain/aws012
98. Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* 1995; 37: 424-435 DOI: 10.1002/ana.410370404
99. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annual review of pathology* 2012; 7: 185-217 DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132443
100. Filippi M, Rocca MA, Barkhof F et al. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2012; 11: 349-360 DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70003-0
101. Sormani MP, Li DK, Bruzzi P et al. Combined MRI lesions and relapses as a surrogate for disability in multiple sclerosis. *Neurology* 2011; 77: 1684-1690 DOI: 10.1212/WNL.0b013e31823648b9
102. Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2006; 65: 855-865 DOI: 10.1097/01.jnen.0000235119.52311.16
103. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 2005; 128: 2705-2712 DOI: 10.1093/brain/awh641
104. Lovas G, Szilagyi N, Majtenyi K et al. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain : a journal of neurology* 2000; 123 (Pt 2): 308-317

LITERATURVERZEICHNIS

105. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N et al. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 2006; 129: 1507-1516 DOI: 10.1093/brain/awl074
106. Banati RB, Newcombe J, Gunn RN et al. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain : a journal of neurology* 2000; 123 (Pt 11): 2321-2337
107. De Groot CJ, Bergers E, Kamphorst W et al. Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions: increased yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. *Brain : a journal of neurology* 2001; 124: 1635-1645
108. Narayana PA, Doyle TJ, Lai D et al. Serial proton magnetic resonance spectroscopic imaging, contrast-enhanced magnetic resonance imaging, and quantitative lesion volumetry in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 1998; 43: 56-71 DOI: 10.1002/ana.410430112
109. van der Valk P, Amor S. Preactive lesions in multiple sclerosis. *Current opinion in neurology* 2009; 22: 207-213 DOI: 10.1097/WCO.0b013e32832b4c76
110. van Noort JM, Bsibsi M, Gerritsen WH et al. AlphaB-crystallin is a target for adaptive immune responses and a trigger of innate responses in preactive multiple sclerosis lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2010; 69: 694-703 DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181e4939c
111. Zeis T, Graumann U, Reynolds R et al. Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain : a journal of neurology* 2008; 131: 288-303 DOI: 10.1093/brain/awm291
112. Joseph FG, Hirst CL, Pickersgill TP et al. CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2009; 80: 292-296 DOI: 10.1136/jnnp.2008.150896
113. Amato MP, Ponziani G. A prospective study on the prognosis of multiple sclerosis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 2000; 21: S831-838
114. Kabat EA, Moore DH, Landow H. An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins. *The Journal of clinical investigation* 1942; 21: 571-577 DOI: 10.1172/JCI101335
115. Keegan M, Konig F, McClelland R et al. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 2005; 366: 579-582 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67102-4
116. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology today* 1993; 14: 426-430 DOI: 10.1016/0167-5699(93)90244-F
117. Wootla B, Eriguchi M, Rodriguez M. Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Autoimmune diseases* 2012; 2012: 969657 DOI: 10.1155/2012/969657

LITERATURVERZEICHNIS

118. Schmidt S, Haase CG, Bezman L et al. Serum autoantibody responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein in X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 2001; 119: 88-94
119. Karni A, Bakimer-Kleiner R, Abramsky O et al. Elevated levels of antibody to myelin oligodendrocyte glycoprotein is not specific for patients with multiple sclerosis. *Archives of neurology* 1999; 56: 311-315
120. Hellings N, Barea M, Verhoeven C et al. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Journal of neuroscience research* 2001; 63: 290-302 DOI: 10.1002/1097-4547(20010201)63:3<290::AID-JNR1023>3.0.CO;2-4
121. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology* 2007; 17: 210-218 DOI: 10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x
122. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2015; 14: 183-193 DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70256-X
123. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *Journal of neurology* 2004; 251: 261-268 DOI: 10.1007/s00415-004-0348-9
124. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T et al. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989; 1: 642-645
125. Hollensworth SB, Shen C, Sim JE et al. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 2000; 28: 1161-1174
126. di Penta A, Moreno B, Reix S et al. Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PloS one* 2013; 8: e54722 DOI: 10.1371/journal.pone.0054722
127. Rosenzweig S, Carmichael ST. Age-dependent exacerbation of white matter stroke outcomes: a role for oxidative damage and inflammatory mediators. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2013; 44: 2579-2586 DOI: 10.1161/STROKEAHA.113.001796
128. Haider L, Fischer MT, Frischer JM et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology* 2011; 134: 1914-1924 DOI: 10.1093/brain/awr128
129. Liu B, Chen X, Wang ZQ et al. DNA damage and oxidative injury are associated with hypomyelination in the corpus callosum of newborn Nbn(CNS-del) mice. *Journal of neuroscience research* 2014; 92: 254-266 DOI: 10.1002/jnr.23313
130. Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & redox signaling* 2007; 9: 233-244 DOI: 10.1089/ars.2007.9.ft-8
131. Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* 2015; 163: 560-569 DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.001
132. Kim KJ, Ramiro Diaz J, Iddings JA et al. Vasculo-Neuronal Coupling: Retrograde Vascular Communication to Brain Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2016; 36: 12624-12639 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1300-16.2016

LITERATURVERZEICHNIS

133. Filosa JA, Blanco VM. Neurovascular coupling in the mammalian brain. *Experimental physiology* 2007; 92: 641-646 DOI: 10.1113/expphysiol.2006.036368
134. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 2017; 96: 17-42 DOI: 10.1016/j.neuron.2017.07.030
135. Licht-Mayer S, Wimmer I, Traffehn S et al. Cell type-specific Nrf2 expression in multiple sclerosis lesions. *Acta neuropathologica* 2015; 130: 263-277 DOI: 10.1007/s00401-015-1452-x
136. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV et al. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current molecular medicine* 2008; 8: 207-220
137. Balabanov R, Strand K, Goswami R et al. Interferon-gamma-oligodendrocyte interactions in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007; 27: 2013-2024 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4689-06.2007
138. Ramesh G, Bengte S, Pahar B et al. A possible role for inflammation in mediating apoptosis of oligodendrocytes as induced by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Journal of neuroinflammation* 2012; 9: 72 DOI: 10.1186/1742-2094-9-72
139. Marracci GH, Jones RE, McKeon GP et al. Alpha lipoic acid inhibits T cell migration into the spinal cord and suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 2002; 131: 104-114
140. Lehmann D, Karussis D, Misrachi-Koll R et al. Oral administration of the oxidant-scavenger N-acetyl-L-cysteine inhibits acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 1994; 50: 35-42
141. Ruuls SR, Bauer J, Sontrop K et al. Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Journal of neuroimmunology* 1995; 56: 207-217
142. Hansen LA, Willenborg DO, Cowden WB. Suppression of hyperacute and passively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis by the anti-oxidant, butylated hydroxyanisole. *Journal of neuroimmunology* 1995; 62: 69-77
143. Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 2009; 462: 94-98 DOI: 10.1038/nature08478
144. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006; 52: 61-76 DOI: 10.1016/j.neuron.2006.09.011
145. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine* 2001; 7: 115-121
146. Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Current opinion in neurology* 2008; 21: 242-247 DOI: 10.1097/WCO.0b013e3282fee94a
147. Dutta R, Trapp BD. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 68: S22-31; discussion S43-54 DOI: 10.1212/01.wnl.0000275229.13012.32

LITERATURVERZEICHNIS

148. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007; 8: 913-919 DOI: 10.1038/ni1507
149. Alvarez JI, Saint-Laurent O, Godschalk A et al. Focal disturbances in the blood-brain barrier are associated with formation of neuroinflammatory lesions. *Neurobiology of disease* 2015; 74: 14-24 DOI: 10.1016/j.nbd.2014.09.016
150. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J et al. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nature reviews Neuroscience* 2012; 13: 507-514 DOI: 10.1038/nrn3275
151. Rodriguez M, Scheithauer B. Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastructural pathology* 1994; 18: 3-13
152. Coles AJ, Wing MG, Molyneux P et al. Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 1999; 46: 296-304
153. Molyneux PD, Kappos L, Polman C et al. The effect of interferon beta-1b treatment on MRI measures of cerebral atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *European Study Group on Interferon beta-1b in secondary progressive multiple sclerosis. Brain : a journal of neurology* 2000; 123 (Pt 11): 2256-2263
154. Filippi M, Rovaris M, Rice GP et al. The effect of cladribine on T(1) 'black hole' changes in progressive MS. *Journal of the neurological sciences* 2000; 176: 42-44
155. Mancardi G, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2008; 7: 626-636 DOI: 10.1016/S1474-4422(08)70138-8
156. Metz I, Lucchinetti CF, Openshaw H et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation fails to stop demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 2007; 130: 1254-1262 DOI: 10.1093/brain/awl370
157. International Multiple Sclerosis Genetics C, Wellcome Trust Case Control C, Sawcer S et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; 476: 214-219 DOI: 10.1038/nature10251
158. Sawcer S, Ban M, Maranian M et al. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *American journal of human genetics* 2005; 77: 454-467 DOI: 10.1086/444547
159. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nature reviews Immunology* 2016; 16: 626-638 DOI: 10.1038/nri.2016.90
160. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology* 2010; 9: 520-532 DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70064-8
161. Minderhoud JM. On the pathogenesis of multiple sclerosis. A revised model of the cause(s) of multiple sclerosis, especially based on epidemiological data. *Clinical neurology and neurosurgery* 1994; 96: 135-142
162. Hagemeyer K, Bruck W, Kuhlmann T. Multiple sclerosis - remyelination failure as a cause of disease progression. *Histology and histopathology* 2012; 27: 277-287 DOI: 10.14670/HH-27.277

LITERATURVERZEICHNIS

163. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE et al. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Annals of neurology* 1993; 33: 137-151 DOI: 10.1002/ana.410330203
164. Raine CS, Wu E. Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1993; 52: 199-204
165. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain : a journal of neurology* 2006; 129: 3165-3172 DOI: 10.1093/brain/awl217
166. Prineas JW, Connell F. Remyelination in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 1979; 5: 22-31 DOI: 10.1002/ana.410050105
167. Barkhof F, Bruck W, De Groot CJ et al. Remyelinated lesions in multiple sclerosis: magnetic resonance image appearance. *Archives of neurology* 2003; 60: 1073-1081 DOI: 10.1001/archneur.60.8.1073
168. Duncan ID, Marik RL, Broman AT et al. Thin myelin sheaths as the hallmark of remyelination persist over time and preserve axon function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017; 114: E9685-E9691 DOI: 10.1073/pnas.1714183114
169. Albert M, Antel J, Bruck W et al. Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain pathology* 2007; 17: 129-138 DOI: 10.1111/j.1750-3639.2006.00043.x
170. Franklin RJ, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nature reviews Neuroscience* 2008; 9: 839-855 DOI: 10.1038/nrn2480
171. Hildebrand C, Hahn R. Relation between myelin sheath thickness and axon size in spinal cord white matter of some vertebrate species. *Journal of the neurological sciences* 1978; 38: 421-434
172. Prineas JW, Kwon EE, Cho ES et al. Continual breakdown and regeneration of myelin in progressive multiple sclerosis plaques. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1984; 436: 11-32
173. Luo T, Oladosu O, Rawji KS et al. Characterizing Structural Changes With Devolving Remyelination Following Experimental Demyelination Using High Angular Resolution Diffusion MRI and Texture Analysis. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 2018: DOI: 10.1002/jmri.26328
174. Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nature reviews Neuroscience* 2002; 3: 705-714 DOI: 10.1038/nrn917
175. Hanafy KA, Sloane JA. Regulation of remyelination in multiple sclerosis. *FEBS letters* 2011; 585: 3821-3828 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.03.048
176. Boyd A, Zhang H, Williams A. Insufficient OPC migration into demyelinated lesions is a cause of poor remyelination in MS and mouse models. *Acta neuropathologica* 2013; 125: 841-859 DOI: 10.1007/s00401-013-1112-y
177. Nyamoya S, Leopold P, Becker B et al. G-Protein-Coupled Receptor Gpr17 Expression in Two Multiple Sclerosis Remyelination Models. *Molecular neurobiology* 2018: DOI: 10.1007/s12035-018-1146-1
178. Ghatak NR, Leshner RT, Price AC et al. Remyelination in the human central nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1989; 48: 507-518

LITERATURVERZEICHNIS

179. Rhodes KE, Raivich G, Fawcett JW. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience* 2006; 140: 87-100 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.055
180. Glezer I, Lapointe A, Rivest S. Innate immunity triggers oligodendrocyte progenitor reactivity and confines damages to brain injuries. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006; 20: 750-752 DOI: 10.1096/fj.05-5234fje
181. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J et al. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain : a journal of neurology* 1999; 122 (Pt 12): 2279-2295
182. Bruck W, Schmied M, Suchanek G et al. Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 1994; 35: 65-73 DOI: 10.1002/ana.410350111
183. Kuhlmann T, Miron V, Cui Q et al. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 2008; 131: 1749-1758 DOI: 10.1093/brain/awn096
184. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R et al. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2002; 346: 165-173 DOI: 10.1056/NEJMoa010994
185. Acs P, Kipp M, Norkute A et al. 17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia* 2009; 57: 807-814 DOI: 10.1002/glia.20806
186. Harsan LA, Steibel J, Zaremba A et al. Recovery from chronic demyelination by thyroid hormone therapy: myelinogenesis induction and assessment by diffusion tensor magnetic resonance imaging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008; 28: 14189-14201 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4453-08.2008
187. Kipp M, Beyer C. Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. *Frontiers in neuroendocrinology* 2009; 30: 188-200 DOI: 10.1016/j.yfrne.2009.04.004
188. Voskuhl RR. Hormone-based therapies in MS. *International MS journal* 2003; 10: 60-66
189. Gold SM, Voskuhl RR. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Progress in brain research* 2009; 175: 239-251 DOI: 10.1016/S0079-6123(09)17516-7
190. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM et al. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. The New England journal of medicine* 1998; 339: 285-291 DOI: 10.1056/NEJM199807303390501
191. Vukusic S, Ionescu I, El-Etr M et al. The Prevention of Post-Partum Relapses with Progestin and Estradiol in Multiple Sclerosis (POPART'MUS) trial: rationale, objectives and state of advancement. *Journal of the neurological sciences* 2009; 286: 114-118 DOI: 10.1016/j.jns.2009.08.056
192. Sicotte NL, Liva SM, Klutch R et al. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Annals of neurology* 2002; 52: 421-428 DOI: 10.1002/ana.10301
193. Goldschmidt T, Antel J, Konig FB et al. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 2009; 72: 1914-1921 DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181a8260a

LITERATURVERZEICHNIS

194. Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD et al. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001; 21: 7046-7052
195. Moyon S, Dubessy AL, Aigrot MS et al. Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2015; 35: 4-20 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0849-14.2015
196. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *The Journal of experimental medicine* 1999; 189: 865-870
197. McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT et al. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998; 18: 5354-5365
198. Bogie JF, Stinissen P, Hellings N et al. Myelin-phagocytosing macrophages modulate autoreactive T cell proliferation. *Journal of neuroinflammation* 2011; 8: 85 DOI: 10.1186/1742-2094-8-85
199. Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta neuropathologica* 2014; 128: 191-213 DOI: 10.1007/s00401-014-1310-2
200. Kotter MR, Setzu A, Sim FJ et al. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia* 2001; 35: 204-212
201. Liu Y, Hao W, Letiembre M et al. Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26: 12904-12913 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2531-06.2006
202. Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M et al. Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 2006; 129: 517-526 DOI: 10.1093/brain/awh707
203. Loughlin AJ, Copelman CA, Hall A et al. Myelination and remyelination of aggregate rat brain cell cultures enriched with macrophages. *Journal of neuroscience research* 1997; 47: 384-392
204. Kotter MR, Li WW, Zhao C et al. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26: 328-332 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2615-05.2006
205. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003; 302: 1760-1765 DOI: 10.1126/science.1088417
206. Ibanez C, Shields SA, El-Etr M et al. Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats. *Neuropathology and applied neurobiology* 2004; 30: 80-89

LITERATURVERZEICHNIS

207. Shields SA, Gilson JM, Blakemore WF et al. Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination. *Glia* 1999; 28: 77-83
208. Gilson J, Blakemore WF. Failure of remyelination in areas of demyelination produced in the spinal cord of old rats. *Neuropathology and applied neurobiology* 1993; 19: 173-181
209. Sim FJ, Zhao C, Penderis J et al. The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002; 22: 2451-2459 DOI: 20026217
210. Hinks GL, Franklin RJ. Delayed changes in growth factor gene expression during slow remyelination in the CNS of aged rats. *Molecular and cellular neurosciences* 2000; 16: 542-556 DOI: 10.1006/mcne.2000.0897
211. Shen S, Sandoval J, Swiss VA et al. Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. *Nature neuroscience* 2008; 11: 1024-1034 DOI: 10.1038/nn.2172
212. Patani R, Balaratnam M, Vora A et al. Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathology and applied neurobiology* 2007; 33: 277-287 DOI: 10.1111/j.1365-2990.2007.00805.x
213. Luyt K, Slade TP, Dorward JJ et al. Developing oligodendrocytes express functional GABA(B) receptors that stimulate cell proliferation and migration. *Journal of neurochemistry* 2007; 100: 822-840 DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04255.x
214. Stevens B, Porta S, Haak LL et al. Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 2002; 36: 855-868
215. Pintado C, Revilla E, Vizuete ML et al. Regional difference in inflammatory response to LPS-injection in the brain: role of microglia cell density. *Journal of neuroimmunology* 2011; 238: 44-51 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2011.06.017
216. Barres BA, Raff MC. Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 1993; 361: 258-260 DOI: 10.1038/361258a0
217. Kipp M, Norkute A, Johann S et al. Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS exposure. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2008; 35: 235-243 DOI: 10.1007/s12031-008-9057-7
218. Mohyeddin Bonab M, Yazdanbakhsh S, Lotfi J et al. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients: Report of a pilot study. *Iran J Immunol* 2007; 4: 50-57
219. Robinson AP, Harp CT, Noronha A et al. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handbook of clinical neurology* 2014; 122: 173-189 DOI: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X

LITERATURVERZEICHNIS

220. Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Current protocols in immunology* 2010; Chapter 15: Unit 15 11 DOI: 10.1002/0471142735.im1501s88
221. Flugel A, Berkowicz T, Ritter T et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2001; 14: 547-560
222. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009; 10: 514-523 DOI: 10.1038/ni.1716
223. Wekerle H, Schwab M, Linington C et al. Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *European journal of immunology* 1986; 16: 1551-1557 DOI: 10.1002/eji.1830161214
224. Kawakami N, Nagerl UV, Odoardi F et al. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *The Journal of experimental medicine* 2005; 201: 1805-1814 DOI: 10.1084/jem.20050011
225. Mues M, Bartholomäus I, Thestrup T et al. Real-time in vivo analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator. *Nature medicine* 2013; 19: 778-783 DOI: 10.1038/nm.3180
226. Pierson E, Simmons SB, Castelli L et al. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunological reviews* 2012; 248: 205-215 DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01126.x
227. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta neuropathologica* 2017; 133: 223-244 DOI: 10.1007/s00401-016-1631-4
228. Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Seminars in neurology* 2016; 36: 103-114 DOI: 10.1055/s-0036-1579693
229. Nexø BA, Jensen SB, Nissen KK et al. Two endogenous retroviral loci appear to contribute to Multiple Sclerosis. *BMC neurology* 2016; 16: 57 DOI: 10.1186/s12883-016-0580-9
230. Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ et al. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology* 2011; 18: 21-29 DOI: 10.1016/j.pathophys.2010.04.004
231. Bieber AJ, Ure DR, Rodriguez M. Genetically dominant spinal cord repair in a murine model of chronic progressive multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2005; 64: 46-57
232. Pachner AR, Li L, Lagunoff D. Plasma cells in the central nervous system in the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 2011; 232: 35-40 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.09.026
233. Rodriguez M, Oleszak E, Leibowitz J. Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Critical reviews in immunology* 1987; 7: 325-365

LITERATURVERZEICHNIS

234. Franklin RJ, French-Constant C, Edgar JM et al. Neuroprotection and repair in multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology* 2012; 8: 624-634 DOI: 10.1038/nrneurol.2012.200
235. Franklin RJ, Gallo V. The translational biology of remyelination: past, present, and future. *Glia* 2014; 62: 1905-1915 DOI: 10.1002/glia.22622
236. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z et al. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2014; 47: 485-505 DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.004
237. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain pathology* 2001; 11: 107-116
238. Clarner T, Janssen K, Nellessen L et al. CXCL10 triggers early microglial activation in the cuprizone model. *Journal of immunology* 2015; 194: 3400-3413 DOI: 10.4049/jimmunol.1401459
239. Buschmann JP, Berger K, Awad H et al. Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2012; 48: 66-76 DOI: 10.1007/s12031-012-9773-x
240. Faizi M, Salimi A, Seydi E et al. Toxicity of cuprizone a Cu(2+) chelating agent on isolated mouse brain mitochondria: a justification for demyelination and subsequent behavioral dysfunction. *Toxicology mechanisms and methods* 2016; 26: 276-283 DOI: 10.3109/15376516.2016.1172284
241. Shepherd RK, Checcarelli N, Naini A et al. Measurement of ATP production in mitochondrial disorders. *Journal of inherited metabolic disease* 2006; 29: 86-91 DOI: 10.1007/s10545-006-0148-8
242. Clarner T, Parabucki A, Beyer C et al. Corticosteroids impair remyelination in the corpus callosum of cuprizone-treated mice. *Journal of neuroendocrinology* 2011; 23: 601-611 DOI: 10.1111/j.1365-2826.2011.02140.x
243. Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A et al. Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *The American journal of pathology* 2008; 172: 1053-1061 DOI: 10.2353/ajpath.2008.070850
244. Clarner T, Diederichs F, Berger K et al. Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. *Glia* 2012; 60: 1468-1480 DOI: 10.1002/glia.22367
245. Groebe A, Clarner T, Baumgartner W et al. Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrogliosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum* 2009; 8: 163-174 DOI: 10.1007/s12311-009-0099-3
246. Norkute A, Hieble A, Braun A et al. Cuprizone treatment induces demyelination and astrogliosis in the mouse hippocampus. *Journal of neuroscience research* 2009; 87: 1343-1355 DOI: 10.1002/jnr.21946
247. Pfeifenbring S, Nessler S, Wegner C et al. Remyelination After Cuprizone-Induced Demyelination Is Accelerated in Juvenile Mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2015; 74: 756-766 DOI: 10.1097/NEN.0000000000000214

LITERATURVERZEICHNIS

248. Schmidt T, Awad H, Slowik A et al. Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: topographical aspects of the midline of the corpus callosum. *Journal of molecular neuroscience* : MN 2013; 49: 80-88 DOI: 10.1007/s12031-012-9896-0
249. Herder V, Hansmann F, Stangel M et al. Lack of cuprizone-induced demyelination in the murine spinal cord despite oligodendroglial alterations substantiates the concept of site-specific susceptibilities of the central nervous system. *Neuropathology and applied neurobiology* 2011; 37: 676-684 DOI: 10.1111/j.1365-2990.2011.01168.x
250. Pott F, Gingele S, Clarner T et al. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain research* 2009; 1305: 137-149 DOI: 10.1016/j.brainres.2009.09.084
251. McMahon EJ, Cook DN, Suzuki K et al. Absence of macrophage-inflammatory protein-1alpha delays central nervous system demyelination in the presence of an intact blood-brain barrier. *Journal of immunology* 2001; 167: 2964-2971
252. Komoly S. Experimental demyelination caused by primary oligodendrocyte dystrophy. Regional distribution of the lesions in the nervous system of mice [corrected]. *Ideggyogyaszati szemle* 2005; 58: 40-43
253. Kipp M, Clarner T, Dang J et al. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica* 2009; 118: 723-736 DOI: 10.1007/s00401-009-0591-3
254. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T et al. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014; 8: 73 DOI: 10.3389/fncel.2014.00073
255. Mana P, Fordham SA, Staykova MA et al. Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation. *Journal of neuroimmunology* 2009; 210: 13-21 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.013
256. Emerson MR, Biswas S, LeVine SM. Cuprizone and piperonyl butoxide, proposed inhibitors of T-cell function, attenuate experimental allergic encephalomyelitis in SJL mice. *Journal of neuroimmunology* 2001; 119: 205-213
257. Draheim T, Liessem A, Scheld M et al. Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia* 2016; 64: 2219-2230 DOI: 10.1002/glia.23058
258. Liessem-Schmitz A, Teske N, Scheld M et al. Nrf2 Signaling in Sodium Azide-Treated Oligodendrocytes Restores Mitochondrial Functions. *Journal of molecular neuroscience* : MN 2018; DOI: 10.1007/s12031-018-1159-2
259. Scheld M, Ruther BJ, Grosse-Veldmann R et al. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *The Journal of neuroscience* : the official journal of the Society for Neuroscience 2016; 36: 1410-1415 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016
260. Fabrick BO, Zwemmer JN, Teunissen CE et al. In vivo detection of myelin proteins in cervical lymph nodes of MS patients using ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology. *Journal of neuroimmunology* 2005; 161: 190-194 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.12.018

LITERATURVERZEICHNIS

261. Scheld M, Fragoulis A, Nyamoya S et al. Mitochondrial Impairment in Oligodendroglial Cells Induces Cytokine Expression and Signaling. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2018; DOI: 10.1007/s12031-018-1236-6
262. Ruther BJ, Scheld M, Drey Mueller D et al. Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia* 2017; 65: 1900-1913 DOI: 10.1002/glia.23202
263. Trebst C, Sorensen TL, Kivisakk P et al. CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *The American journal of pathology* 2001; 159: 1701-1710
264. Kutzelnigg A, Lassmann H. Cortical demyelination in multiple sclerosis: a substrate for cognitive deficits? *Journal of the neurological sciences* 2006; 245: 123-126 DOI: 10.1016/j.jns.2005.09.021
265. Hulst HE, Geurts JJ. Gray matter imaging in multiple sclerosis: what have we learned? *BMC neurology* 2011; 11: 153 DOI: 10.1186/1471-2377-11-153
266. Koutsoudaki PN, Skripuletz T, Gudi V et al. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neuroscience letters* 2009; 451: 83-88 DOI: 10.1016/j.neulet.2008.11.058
267. Wagenknecht N, Becker B, Scheld M et al. Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2016; 60: 102-114 DOI: 10.1007/s12031-016-0790-z
268. Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM et al. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Veterinary pathology* 2012; 49: 32-43 DOI: 10.1177/0300985811429314
269. Antonovaitė N, Beekmans SV, Hol EM et al. Regional variations in stiffness in live mouse brain tissue determined by depth-controlled indentation mapping. *Scientific reports* 2018; 8: 12517 DOI: 10.1038/s41598-018-31035-y
270. Tagge I, O'Connor A, Chaudhary P et al. Spatio-Temporal Patterns of Demyelination and Remyelination in the Cuprizone Mouse Model. *PloS one* 2016; 11: e0152480 DOI: 10.1371/journal.pone.0152480
271. Day M. Histopathology of EAE. *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. L E and C C Springer: New York 2005: pp. 25–43
272. Tanuma N, Shin T, Matsumoto Y. Characterization of acute versus chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *Journal of neuroimmunology* 2000; 108: 171-180
273. Barnard RO, Triggs M. Corpus callosum in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1974; 37: 1259-1264
274. Gilmore CP, DeLuca GC, Bo L et al. Spinal cord atrophy in multiple sclerosis caused by white matter volume loss. *Archives of neurology* 2005; 62: 1859-1862 DOI: 10.1001/archneur.62.12.1859
275. Dowling P, Husar W, Menonna J et al. Cell death and birth in multiple sclerosis brain. *Journal of the neurological sciences* 1997; 149: 1-11

LITERATURVERZEICHNIS

276. Bo L, Vedeler CA, Nyland H et al. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Multiple sclerosis* 2003; 9: 323-331 DOI: 10.1191/1352458503ms917oa
277. Bo L, Vedeler CA, Nyland HI et al. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2003; 62: 723-732
278. Raine CS, Scheinberg L, Waltz JM. Multiple sclerosis. Oligodendrocyte survival and proliferation in an active established lesion. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1981; 45: 534-546
279. Lassmann H. Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Schriftenreihe Neurologie* 1983; 25: 1-135
280. Bonetti B, Raine CS. Multiple sclerosis: oligodendrocytes display cell death-related molecules in situ but do not undergo apoptosis. *Annals of neurology* 1997; 42: 74-84 DOI: 10.1002/ana.410420113
281. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Annals of neurology* 2004; 55: 458-468 DOI: 10.1002/ana.20016
282. Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD et al. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of neurology* 2009; 66: 739-753 DOI: 10.1002/ana.21800
283. Oluich LJ, Stratton JA, Xing YL et al. Targeted ablation of oligodendrocytes induces axonal pathology independent of overt demyelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2012; 32: 8317-8330 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1053-12.2012
284. Traka M, Podojil JR, McCarthy DP et al. Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination. *Nature neuroscience* 2016; 19: 65-74 DOI: 10.1038/nn.4193
285. Yang HJ, Wang H, Zhang Y et al. Region-specific susceptibilities to cuprizone-induced lesions in the mouse forebrain: Implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Brain research* 2009; 1270: 121-130 DOI: 10.1016/j.brainres.2009.03.011
286. Doan V, Kleindienst AM, McMahon EJ et al. Abbreviated exposure to cuprizone is sufficient to induce demyelination and oligodendrocyte loss. *Journal of neuroscience research* 2013; 91: 363-373 DOI: 10.1002/jnr.23174
287. Charcot M. Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hop (Paris)* 1868; 41: 554-555, 557-558, 566
288. Bitsch A, Kuhlmann T, Da Costa C et al. Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia* 2000; 29: 366-375
289. Kornek B, Storch MK, Weissert R et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *The American journal of pathology* 2000; 157: 267-276 DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64537-3
290. Evangelou N, Esiri MM, Smith S et al. Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2000; 47: 391-395

LITERATURVERZEICHNIS

291. Bjartmar C, Kinkel RP, Kidd G et al. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology* 2001; 57: 1248-1252
292. DeLuca GC, Ebers GC, Esiri MM. Axonal loss in multiple sclerosis: a pathological survey of the corticospinal and sensory tracts. *Brain: a journal of neurology* 2004; 127: 1009-1018 DOI: 10.1093/brain/awh118
293. Trapp BD, Bo L, Mork S et al. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *Journal of neuroimmunology* 1999; 98: 49-56
294. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S et al. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain : a journal of neurology* 2000; 123 (Pt 6): 1174-1183
295. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A et al. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain : a journal of neurology* 2002; 125: 2202-2212
296. Lassmann H. Axonal injury in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2003; 74: 695-697
297. Dutta R, McDonough J, Yin X et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Annals of neurology* 2006; 59: 478-489 DOI: 10.1002/ana.20736
298. Hoflich KM, Beyer C, Clarner T et al. Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain research* 2016; 1650: 125-133 DOI: 10.1016/j.brainres.2016.08.048
299. Vercellino M, Masera S, Lorenzatti M et al. Demyelination, inflammation, and neurodegeneration in multiple sclerosis deep gray matter. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2009; 68: 489-502 DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181a19a5a
300. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 1998; 338: 278-285 DOI: 10.1056/NEJM199801293380502
301. De Stefano N, Matthews PM, Fu L et al. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain : a journal of neurology* 1998; 121 (Pt 8): 1469-1477
302. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2011; 365: 2188-2197 DOI: 10.1056/NEJMoa1100648
303. Nikic I, Merkler D, Sorbara C et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* 2011; 17: 495-499 DOI: 10.1038/nm.2324
304. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annual review of neuroscience* 2008; 31: 247-269 DOI: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313
305. Neumann H. Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Current opinion in neurology* 2003; 16: 267-273 DOI: 10.1097/01.wco.0000073926.19076.29

LITERATURVERZEICHNIS

306. Yin X, Baek RC, Kirschner DA et al. Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *The Journal of cell biology* 2006; 172: 469-478 DOI: 10.1083/jcb.200509174
307. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences* 2003; 26: 523-530 DOI: 10.1016/j.tins.2003.08.008
308. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM et al. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *Journal of neurochemistry* 2004; 89: 1092-1100 DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02420.x
309. Bsibsi M, Holtman IR, Gerritsen WH et al. Alpha-B-crystallin induces an immune-regulatory and antiviral microglial response in preactive multiple sclerosis lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2013; 72: 970-979 DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182a776bf
310. Ulvestad E, Williams K, Vedeler C et al. Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG. *Journal of the neurological sciences* 1994; 121: 125-131
311. van Horssen J, Singh S, van der Pol S et al. Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *Journal of neuroinflammation* 2012; 9: 156 DOI: 10.1186/1742-2094-9-156
312. Krauspe BM, Dreher W, Beyer C et al. Short-term cuprizone feeding verifies N-acetylaspartate quantification as a marker of neurodegeneration. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2015; 55: 733-748 DOI: 10.1007/s12031-014-0412-6
313. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain : a journal of neurology* 2009; 132: 288-295 DOI: 10.1093/brain/awn109
314. Ulvestad E, Williams K, Mork S et al. Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1994; 53: 492-501
315. Huizinga R, van der Star BJ, Kipp M et al. Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis. *Glia* 2012; 60: 422-431 DOI: 10.1002/glia.22276
316. Traugott U, McFarlin DE, Raine CS. Immunopathology of the lesion in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Cellular immunology* 1986; 99: 395-410
317. Traugott U, Stone SH, Raine CS. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Correlation of circulating lymphocyte fluctuations with disease activity in suppressed and unsuppressed animals. *Journal of the neurological sciences* 1979; 41: 17-29
318. Boyle EA, McGeer PL. Cellular immune response in multiple sclerosis plaques. *The American journal of pathology* 1990; 137: 575-584
319. McCallum K, Esiri MM, Tourtellotte WW et al. T cell subsets in multiple sclerosis. Gradients at plaque borders and differences in nonplaque regions. *Brain : a journal of neurology* 1987; 110 (Pt 5): 1297-1308

LITERATURVERZEICHNIS

320. Renno T, Krakowski M, Piccirillo C et al. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *Journal of immunology* 1995; 154: 944-953
321. Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clinical immunology and immunopathology* 1995; 77: 4-13
322. Villasenor R, Kuennecke B, Ozmen L et al. Region-specific permeability of the blood-brain barrier upon pericyte loss. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2017; 37: 3683-3694 DOI: 10.1177/0271678X17697340
323. Grabert K, Michoel T, Karavolos MH et al. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature neuroscience* 2016; 19: 504-516 DOI: 10.1038/nn.4222
324. De Biase LM, Schuebel KE, Fusfeld ZH et al. Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. *Neuron* 2017; 95: 341-356 e346 DOI: 10.1016/j.neuron.2017.06.020
325. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G et al. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience* 2013; 7: 45 DOI: 10.3389/fncel.2013.00045
326. Caravagna C, Jaouen A, Desplat-Jego S et al. Diversity of innate immune cell subsets across spatial and temporal scales in an EAE mouse model. *Scientific reports* 2018; 8: 5146 DOI: 10.1038/s41598-018-22872-y
327. Locatelli G, Wortge S, Buch T et al. Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity. *Nature neuroscience* 2012; 15: 543-550 DOI: 10.1038/nn.3062
328. Okuda Y, Okuda M, Bernard CC. Gender does not influence the susceptibility of C57BL/6 mice to develop chronic experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Immunology letters* 2002; 81: 25-29
329. Bo L, Dawson TM, Wesselingh S et al. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Annals of neurology* 1994; 36: 778-786 DOI: 10.1002/ana.410360515
330. Hvas J, McLean C, Justesen J et al. Perivascular T cells express the pro-inflammatory chemokine RANTES mRNA in multiple sclerosis lesions. *Scandinavian journal of immunology* 1997; 46: 195-203
331. Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *Journal of neuroimmunology* 1998; 84: 238-249
332. Berard JL, Zarruk JG, Arbour N et al. Lipocalin 2 is a novel immune mediator of experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis and is modulated in multiple sclerosis. *Glia* 2012; 60: 1145-1159 DOI: 10.1002/glia.22342
333. Marques F, Mesquita SD, Sousa JC et al. Lipocalin 2 is present in the EAE brain and is modulated by natalizumab. *Frontiers in cellular neuroscience* 2012; 6: 33 DOI: 10.3389/fncel.2012.00033

LITERATURVERZEICHNIS

334. Al Nimer F, Elliott C, Bergman J et al. Lipocalin-2 is increased in progressive multiple sclerosis and inhibits remyelination. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation* 2016; 3: e191 DOI: 10.1212/NXI.0000000000000191
335. Ni W, Zheng M, Xi G et al. Role of lipocalin-2 in brain injury after intracerebral hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2015; 35: 1454-1461 DOI: 10.1038/jcbfm.2015.52
336. Jang E, Lee S, Kim JH et al. Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013; 27: 1176-1190 DOI: 10.1096/fj.12-222257
337. Nam Y, Kim JH, Seo M et al. Lipocalin-2 protein deficiency ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis: the pathogenic role of lipocalin-2 in the central nervous system and peripheral lymphoid tissues. *The Journal of biological chemistry* 2014; 289: 16773-16789 DOI: 10.1074/jbc.M113.542282
338. Chang NC, Hung SI, Hwa KY et al. A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 17497-17506 DOI: 10.1074/jbc.M010417200
339. Harbord M, Novelli M, Canas B et al. Ym1 is a neutrophil granule protein that crystallizes in p47phox-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 5468-5475 DOI: 10.1074/jbc.M110635200
340. Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P et al. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *Journal of immunology* 2005; 174: 6561; author reply 6561-6562
341. Boot RG, Blommaert EF, Swart E et al. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 6770-6778 DOI: 10.1074/jbc.M009886200
342. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual review of physiology* 2011; 73: 479-501 DOI: 10.1146/annurev-physiol-012110-142250
343. Correale J, Fiol M. Chitinase effects on immune cell response in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 2011; 17: 521-531 DOI: 10.1177/1352458510392619
344. Raes G, De Baetselier P, Noel W et al. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2002; 71: 597-602
345. Maresz K, Ponomarev ED, Barteneva N et al. IL-13 induces the expression of the alternative activation marker Ym1 in a subset of testicular macrophages. *Journal of reproductive immunology* 2008; 78: 140-148 DOI: 10.1016/j.jri.2008.01.001
346. Giannetti N, Moyse E, Ducray A et al. Accumulation of Ym1/2 protein in the mouse olfactory epithelium during regeneration and aging. *Neuroscience* 2004; 123: 907-917

LITERATURVERZEICHNIS

347. Webb DC, McKenzie AN, Foster PS. Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: identification of a novel allergy-associated protein. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 41969-41976 DOI: 10.1074/jbc.M106223200
348. Sutherland TE, Ruckerl D, Logan N et al. Ym1 induces RELM α and rescues IL-4R α deficiency in lung repair during nematode infection. *PLoS pathogens* 2018; 14: e1007423 DOI: 10.1371/journal.ppat.1007423
349. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 2004; 304: 1678-1682 DOI: 10.1126/science.1095336
350. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends in neurosciences* 1996; 19: 331-338
351. Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S et al. Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003; 23: 7922-7930
352. Skuljec J, Sun H, Pul R et al. CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in vitro. *Cellular immunology* 2011; 270: 164-171 DOI: 10.1016/j.cellimm.2011.05.001
353. Szczucinski A, Losy J. CCL5, CXCL10 and CXCL11 chemokines in patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 2011; 18: 67-72 DOI: 10.1159/000317394
354. Gu SM, Park MH, Yun HM et al. CCR5 knockout suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Oncotarget* 2016; 7: 15382-15393 DOI: 10.18632/oncotarget.8097
355. Rottman JB, Slavin AJ, Silva R et al. Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. *European journal of immunology* 2000; 30: 2372-2377 DOI: 10.1002/1521-4141(2000)30:8<2372::AID-IMMU2372>3.0.CO;2-D
356. Campanella GS, Luster AD. Chapter 18. A chemokine-mediated in vivo T-cell recruitment assay. *Methods in enzymology* 2009; 461: 397-412 DOI: 10.1016/S0076-6879(09)05418-4
357. Veenstra M, Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR2: physiology regulator and neuroinflammation controller? *Journal of neuroimmunology* 2012; 246: 1-9 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.016
358. van Weering HR, Boddeke HW, Vinet J et al. CXCL10/CXCR3 signaling in glia cells differentially affects NMDA-induced cell death in CA and DG neurons of the mouse hippocampus. *Hippocampus* 2011; 21: 220-232 DOI: 10.1002/hipo.20742
359. Olah M, Amor S, Brouwer N et al. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia* 2012; 60: 306-321 DOI: 10.1002/glia.21266
360. Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML et al. Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and applied neurobiology* 2000; 26: 133-142

LITERATURVERZEICHNIS

361. Sonobe Y, Liang J, Jin S et al. Microglia express a functional receptor for interleukin-23. *Biochemical and biophysical research communications* 2008; 370: 129-133 DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.03.059
362. Jackson LJ, Pheneger JA, Pheneger TJ et al. The role of PIM kinases in human and mouse CD4+ T cell activation and inflammatory bowel disease. *Cellular immunology* 2012; 272: 200-213 DOI: 10.1016/j.cellimm.2011.10.011
363. Capuccini B, Lin J, Talavera-Lopez C et al. Transcriptomic profiling of microglia reveals signatures of cell activation and immune response, during experimental cerebral malaria. *Scientific reports* 2016; 6: 39258 DOI: 10.1038/srep39258
364. Thakker P, Leach MW, Kuang W et al. IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 2007; 178: 2589-2598
365. Zhang GX, Yu S, Gran B et al. Role of IL-12 receptor beta 1 in regulation of T cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 2003; 171: 4485-4492
366. Shajarian M, Alsahebhosoul F, Etemadifar M et al. IL-23 plasma level measurement in relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) patients compared to healthy subjects. *Immunological investigations* 2015; 44: 36-44 DOI: 10.3109/08820139.2014.930477
367. Li Y, Chu N, Hu A et al. Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain : a journal of neurology* 2007; 130: 490-501 DOI: 10.1093/brain/awl273
368. Perrier S, Darakhshan F, Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS letters* 2006; 580: 6289-6294 DOI: 10.1016/j.febslet.2006.10.061
369. Liu JS, Amaral TD, Brosnan CF et al. IFNs are critical regulators of IL-1 receptor antagonist and IL-1 expression in human microglia. *Journal of immunology* 1998; 161: 1989-1996
370. Seckinger P, Lowenthal JW, Williamson K et al. A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. *Journal of immunology* 1987; 139: 1546-1549
371. Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia. *Glia* 2006; 53: 551-556 DOI: 10.1002/glia.20308
372. Chiu IM, Morimoto ET, Goodarzi H et al. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell reports* 2013; 4: 385-401 DOI: 10.1016/j.celrep.2013.06.018
373. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 2017; 169: 1276-1290 e1217 DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.018
374. Sousa C, Golebiewska A, Poovathingal SK et al. Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO reports* 2018; 19: DOI: 10.15252/embr.201846171
375. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2007; 55: 443-452 DOI: 10.1369/jhc.6A7101.2006

LITERATURVERZEICHNIS

376. Okamura RM, Lebkowski J, Au M et al. Immunological properties of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cells. *Journal of neuroimmunology* 2007; 192: 134-144 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2007.09.030
377. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *The American journal of pathology* 2008; 172: 146-155 DOI: 10.2353/ajpath.2008.070690
378. Merabova N, Kaminski R, Krynska B et al. JCV agnoprotein-induced reduction in CXCL5/LIX secretion by oligodendrocytes is associated with activation of apoptotic signaling in neurons. *Journal of cellular physiology* 2012; 227: 3119-3127 DOI: 10.1002/jcp.23065
379. Swardfager W, Lanctot K, Rothenburg L et al. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry* 2010; 68: 930-941 DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.06.012
380. Fisher J, Mizrahi T, Schori H et al. Increased post-traumatic survival of neurons in IL-6-knockout mice on a background of EAE susceptibility. *Journal of neuroimmunology* 2001; 119: 1-9
381. Maiti AK, Sharba S, Navabi N et al. IL-4 Protects the Mitochondria Against TNFalpha and IFNgamma Induced Insult During Clearance of Infection with *Citrobacter rodentium* and *Escherichia coli*. *Scientific reports* 2015; 5: 15434 DOI: 10.1038/srep15434
382. de Araujo EG, da Silva GM, Dos Santos AA. Neuronal cell survival: the role of interleukins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1153: 57-64 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2008.03974.x
383. Penkowa M, Giralt M, Carrasco J et al. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 2000; 32: 271-285
384. Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A et al. Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Annals of neurology* 2015; 78: 814-823 DOI: 10.1002/ana.24506
385. Bonaterra GA, Zugel S, Thogersen J et al. Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury. *Journal of the American Heart Association* 2012; 1: e002550 DOI: 10.1161/JAHA.112.002550
386. Schlittenhardt D, Schmiedt W, Bonaterra GA et al. Colocalization of oxidized low-density lipoprotein, caspase-3, cyclooxygenase-2, and macrophage migration inhibitory factor in arteriosclerotic human carotid arteries. *Cell and tissue research* 2005; 322: 425-435 DOI: 10.1007/s00441-005-0024-0
387. Kempf T, Eden M, Strelau J et al. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circulation research* 2006; 98: 351-360 DOI: 10.1161/01.RES.0000202805.73038.48
388. Jiang J, Wen W, Sachdev PS. Macrophage inhibitory cytokine-1/growth differentiation factor 15 as a marker of cognitive ageing and dementia. *Current opinion in psychiatry* 2016; 29: 181-186 DOI: 10.1097/YCO.0000000000000225
389. Deverman BE, Patterson PH. Exogenous leukemia inhibitory factor stimulates oligodendrocyte progenitor cell proliferation and enhances hippocampal remyelination. *The Journal of neuroscience*

LITERATURVERZEICHNIS

- : the official journal of the Society for Neuroscience 2012; 32: 2100-2109 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3803-11.2012
390. Basu A, Krady JK, Enterline JR et al. Transforming growth factor beta1 prevents IL-1beta-induced microglial activation, whereas TNFalpha- and IL-6-stimulated activation are not antagonized. *Glia* 2002; 40: 109-120 DOI: 10.1002/glia.10118
391. Mahad D, Lassmann H, Turnbull D. Review: Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology* 2008; 34: 577-589 DOI: 10.1111/j.1365-2990.2008.00987.x
392. Su K, Bourdette D, Forte M. Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Frontiers in physiology* 2013; 4: 169 DOI: 10.3389/fphys.2013.00169
393. Mao Z, Zheng YL, Zhang YQ. Behavioral impairment and oxidative damage induced by chronic application of nonylphenol. *International journal of molecular sciences* 2010; 12: 114-127 DOI: 10.3390/ijms12010114
394. Wang CH, Wu SB, Wu YT et al. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 2013; 238: 450-460 DOI: 10.1177/1535370213493069
395. Thorburne SK, Juurlink BH. Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *Journal of neurochemistry* 1996; 67: 1014-1022
396. Sáez GT, Bannister WH, Bannister JV. Free radicals and thiol compounds - the role of glutathione against free radical toxicity. *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions* 1991:
397. Sáez GT, Sáez JR, Vina J. The role of free radicals in the cytotoxicity of cysteine. *CRC Handbook of Free Radicals And Antioxidants in Biomedicine* 1991; Vol. I:
398. Halliwell B. Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free radical research communications* 1989; 5: 315-318
399. Volterra A, Trotti D, Tromba C et al. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1994; 14: 2924-2932
400. Matute C, Sanchez-Gomez MV, Martinez-Millan L et al. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 8830-8835
401. McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL et al. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nature medicine* 1998; 4: 291-297
402. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature medicine* 2000; 6: 67-70 DOI: 10.1038/71555
403. Lee JM, Li J, Johnson DA et al. Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005; 19: 1061-1066 DOI: 10.1096/fj.04-2591hyp

LITERATURVERZEICHNIS

404. Lee YW, Kuhn H, Hennig B et al. IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2001; 33: 83-94 DOI: 10.1006/jmcc.2000.1278
405. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *International journal of molecular medicine* 1999; 4: 223-230
406. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain pathology* 1999; 9: 119-131
407. Kuo PC, Abe KY, Schroeder RA. Oxidative stress increases hepatocyte iNOS gene transcription and promoter activity. *Biochemical and biophysical research communications* 1997; 234: 289-292 DOI: 10.1006/bbrc.1997.6562
408. Leppert D, Hauser SL, Kishiyama JL et al. Stimulation of matrix metalloproteinase-dependent migration of T cells by eicosanoids. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1995; 9: 1473-1481
409. Leppert D, Waubant E, Galardy R et al. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *Journal of immunology* 1995; 154: 4379-4389
410. Stuve O, Chabot S, Jung SS et al. Chemokine-enhanced migration of human peripheral blood mononuclear cells is antagonized by interferon beta-1b through an effect on matrix metalloproteinase-9. *Journal of neuroimmunology* 1997; 80: 38-46
411. Yeo YA, Martinez Gomez JM, Croxford JL et al. CD137 ligand activated microglia induces oligodendrocyte apoptosis via reactive oxygen species. *Journal of neuroinflammation* 2012; 9: 173 DOI: 10.1186/1742-2094-9-173
412. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine* 2006; 354: 942-955 DOI: 10.1056/NEJMra052130
413. Leech S, Kirk J, Plumb J et al. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology* 2007; 33: 86-98 DOI: 10.1111/j.1365-2990.2006.00781.x
414. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine* 2007; 13: 1173-1175 DOI: 10.1038/nm1651
415. McQuaid S, Cunnea P, McMahon J et al. The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis. *Biochemical Society transactions* 2009; 37: 329-331 DOI: 10.1042/BST0370329
416. Prineas JW, Wright RG. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1978; 38: 409-421
417. Mohan H, Krumbholz M, Sharma R et al. Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. *Brain pathology* 2010; 20: 966-975 DOI: 10.1111/j.1750-3639.2010.00399.x

LITERATURVERZEICHNIS

418. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA et al. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274: 23463-23467
419. Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF et al. Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. *Acta neurochirurgica Supplement* 2006; 96: 444-450
420. Schreibelt G, Kooij G, Reijerkerk A et al. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2007; 21: 3666-3676 DOI: 10.1096/fj.07-8329com
421. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y et al. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 1977-1982 DOI: 10.1073/pnas.0808698106
422. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2003; 23: 137-149 DOI: 10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C
423. Cardona AE, Li M, Liu L et al. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *Journal of leukocyte biology* 2008; 84: 587-594 DOI: 10.1189/jlb.1107763
424. Sozen T, Tsuchiyama R, Hasegawa Y et al. Role of interleukin-1beta in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2009; 40: 2519-2525 DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.549592
425. Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS letters* 2011; 585: 3770-3780 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.04.066
426. Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain pathology* 2007; 17: 243-250 DOI: 10.1111/j.1750-3639.2007.00067.x
427. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovascular research* 1996; 32: 733-742
428. Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Steiner E et al. Loss of astrocyte polarity marks blood-brain barrier impairment during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta neuropathologica* 2009; 118: 219-233 DOI: 10.1007/s00401-009-0558-4
429. Parratt JD, Prineas JW. Neuromyelitis optica: a demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes. *Multiple sclerosis* 2010; 16: 1156-1172 DOI: 10.1177/1352458510382324
430. Sharma R, Fischer MT, Bauer J et al. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta neuropathologica* 2010; 120: 223-236 DOI: 10.1007/s00401-010-0704-z

LITERATURVERZEICHNIS

431. Nelson E, Osterberg K, Blaw M et al. Electron microscopic and histochemical studies in diffuse sclerosis (sudanophilic type). *Neurology* 1962; 12: 896-909
432. Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 2003; 126: 2738-2749 DOI: 10.1093/brain/awg285
433. Graesser D, Mahooti S, Madri JA. Distinct roles for matrix metalloproteinase-2 and alpha4 integrin in autoimmune T cell extravasation and residency in brain parenchyma during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 2000; 109: 121-131
434. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M et al. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203: 1007-1019 DOI: 10.1084/jem.20051342
435. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2007; 27: 697-709 DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600375
436. Tveita AA, Rekvig OP, Zykova SN. Increased glomerular matrix metalloproteinase activity in murine lupus nephritis. *Kidney international* 2008; 74: 1150-1158 DOI: 10.1038/ki.2008.308
437. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L et al. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 37258-37265 DOI: 10.1074/jbc.M106089200
438. Kang SS, Ren Y, Liu CC et al. Lipocalin-2 protects the brain during inflammatory conditions. *Molecular psychiatry* 2018; 23: 344-350 DOI: 10.1038/mp.2016.243

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mir während meiner Promotion mit Rat und Tat zur Seite standen!

Ich möchte mich beim Prüfungskomitee dafür bedanken, dass Sie sich bereit erklärt haben, meine Doktorarbeit zu betreuen. Ich danke Ihnen, Prof. Beyer, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in Ihrem Institut anfertigen zu dürfen. Ich habe hier sehr viel gelernt und mich gefreut, mich in die Lehre einzubringen zu können und meine Selbstständigkeit zu stärken.

Ich danke besonders PD Dr. Tim Clarner, für Deine exzellente Betreuung im Labor, Deine große Unterstützung beim Publikations-Kampf und dass Du mir ein spannendes Forschungsthema geboten hast. Danke an Dr. Adib Zendedel, dass ich mich im letzten Jahr in Dein Schlaganfall-Projekt einbringen konnte. Auch wenn der Weg etwas holprig war, konnte ich dadurch viele „FACSen machen“.

Prof. Dr. Andreas Ludwig möchte ich herzlich für Ihre offizielle Betreuung, konstruktive Kritik und wertvollen Anregungen zur Erstellung meiner Dissertation danken.

Ich danke vor allem den besten MTAs der Welt: Helga, Petra und Uta! Ohne Euch hätte ich meine Projekte, hauptsächlich mein Oper-Projekt, nie alleine zu Ende gebracht. Tausend Dank!

Ein ebenfalls großer Dank geht an meine Kollegen und Kolleginnen, die mich immer tatkräftig unterstützt haben, sei es methodisch oder mental, und ein tolles Arbeitsklima geschaffen haben. Danke Birte, Linda, Bernd, Natalie, Vanessa, Steffi, Fatemeh, Clara und natürlich dir, Markus, von Dir habe ich sehr viel in meiner „Neuroanatomie-Zeit“ gelernt! Besonderer Dank geht an Stella für eine tolle Zeit bei gemeinsamer Lehre sowie im Labor, sodass auch so manche 20 Realties innerhalb von 2 Tagen fertig waren...

Zuletzt möchte ich mich bei Stefan, Sarah, meinen Eltern und meinen Freunden bedanken, die vor allem in der „harten Phase“ der Doktorarbeit für mich da waren und mich bedingungslos unterstützt haben. Unsäglicher Dank geht an den wohl weltbesten Papa! Danke für das intensive und schier endlose Korrektur-Ping-Pong, das nun tatsächlich ein Ende gefunden hat!! Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit Dir zusammen zu arbeiten!

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Miriam Scheld,

erklärt hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden. Hiermit erkläre ich an Eides statt:

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;
2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;
3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;
4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;
5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;
6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;
7. Ein Teil oder Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht und zwar in:

1. Scheld M, Fragoulis A, Nyamoya S, Zendedel A, Denecke B, Krauspe B, Teske N, Kipp M, Beyer C, Clarner T. Mitochondrial impairment in oligodendrocyte cells induces cytokine expression and signaling. *J Mol Neurosci*, 2018 Dec 13;10.1007/s12031-018-1236-6, PMID: 30547416
2. Liessem-Schmitz A, Teske N, Scheld M, Nyamoya S, Zendedel A, Beyer C, Clarner T, Fragoulis A. Nrf2-signaling in sodium azide-treated oligodendrocytes restores mitochondrial functions. *J Mol Neurosci*, 2018 Aug 23, 10.1007/s12031-018-1159-2, PMID: 30140996
3. Rüter BJ, Scheld M, Drey Mueller D, Clarner T, Kress E, Brandenburg LO, Swartenbroekx T, Hoornaert C, Ponsaerts P, Fallier-Becker P, Beyer C, Rohr SO, Schmitz C, Chrzanowski U, Hochstrasser T, Nyamoya S, Kipp M. Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia*, 2017 Dec;65(12):1900-1913, PMID: 28836302

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

4. Draheim T, Liessem A, Scheld M, Wilms F, Weißflog M, Denecke B, Wruck CJ, Kensler TW, Zendedel A, Beyer C, Kipp M, Fragoulis A, Clarner T. Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia*, 2016 Dec; 64(12):2219-2230, PMID: 27641725
5. Scheld M, Rütger B, Große-Veldmann R, Ohl K, Tenbrock K, Dreymüller D, Fallier-Becker P, Zendedel A, Beyer C, Clarner T, Kipp M. Neurodegeneration triggers peripheral immune cell recruitment into the forebrain. *J Neurosci*, 2016 Jan 27;36(4):1410-5, PMID: 26818526

24.05.2019

Datum



Miriam Scheld

Appendix

Modifiziert übernommene Abbildungen und Textpassagen

Die Abbildung 3 C und Abbildung 19 wurden nach Scheld und Kollegen 2016 modifiziert übernommen [259]. Die Abbildung 9 C und Abbildung 16 wurden modifiziert nach Rüter und Kollegen 2017 übernommen [262]. Abbildung 5, Abbildung 22 – Abbildung 25 sind modifiziert nach Scheld und Kollegen 2018 übernommen [261]. Abbildung 26 A - C ist modifiziert nach Liessem-Schmitz und Kollegen 2018 übernommen [258]. Abbildung 26 D - I ist modifiziert nach Draheim und Kollegen 2016 übernommen [257]. Abbildung 3 A, Abbildung 9 A, D – F, Abbildung 10, Abbildung 14 A, D – G, Abbildung 17 B und Abbildung 18 A – D, F sind modifiziert übernommen aus Masterarbeit Scheld 2015.

Reagenzien

Reagenz	Bestellnummer/ Firma
594 anti-Maus IgG	A11032/ Thermo Fisher Scientific
594 anti-Ziege IgG	A11058/ Thermo Fisher Scientific
488 anti-Kaninchen IgG	A11008/ Thermo Fisher Scientific
488 anti-Kaninchen IgG	A21206/ Thermo Fisher Scientific
488 anti-Maus IgG	A21121/ Thermo Fisher Scientific
7-AAD	559925/ BD Biosciences
Affymetrix GeneChip® (Clariom™ D Array, mouse)	902511/ Thermo Fisher Scientific
Agarose Standard	3810.3/ Carl Roth
Albumin Fraktion V, biotinfrei, ≥ 98 % [66.000 g/mol]	0163.4/ Carl Roth
Albumin Fraktion V, endotoxin-geprüft, CELLPURE® > 98 % [66.000 g/mol]	CP84.2/ Carl Roth
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur,BP,USP [474,39 g/mol]	101047/ Merck
APP Antikörper aus Maus	MAB348/ Millipore
Aquaporin-4 Antikörper aus Kaninchen	Sc20812/ Santa Cruz
BIOTAQ™ DNA Polymerase	BIO-21040/ Boline
Biotin [244.31 g/mol]	B4639/ Sigma-Aldrich

Bis(cyclohexanone) oxaldihydrazone (Cuprizon) [278,35 g/mol]	C9012/ Sigma-Aldrich
Blue Alkaline Phosphatase (Blue AP) Substrate Kit	SK-5300/ Vector Labs
B5Ac 10 %	900.022/Aurion
CD11b eFluor®450 Antikörper aus Ratte	48-0112-82/ eBioscience
CD16/32 Antikörper aus Ratte	553141/ BD Biosciences
CD3 Antikörper aus Kaninchen	A0452/ DAKO
CD45 APC-eFluor®780 aus Ratte	47-0451-80/ eBioscience
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit (CTB)	G8081/ Promega
Chloral hydrate ≥99,5 %, Ph. Eur., BP, USP Trichloroacetalhydrate [165,40 g/mol]	K318.1/ Carl Roth
Citronensäure, ≥ 99,5 %, p.a., ACS [192,13 g/mol]	X863.1/ Carl Roth
Citronensäure, wasserfrei gepulvert EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur, BP, JP, USP, E 330, FCC [192,12 g/mol]	100241/ Merck
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (LDH)	G1780/ Promega
D(+)-Glucose, p.a., ACS, wasserfrei [180,16 g/mol]	X997.2/ Carl Roth
DAB working solution (DAB, substrate buffer pH 7.5)	K3468/ Dako
Dako Pen	S200230-2 / Dako
DePeX	18243/ Serva
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, ≥ 99.5 %, p.a. (Na ₂ HPO ₄) [177,99 g/mol]	4984.3/ Carl Roth
DNA loading buffer 5X	BIO-37068/ Biorline
dNTP Mix 10 mM	BIO-39044/ Biorline
Dulbecco's modified eagle medium 1X (DMEM)	41966.029/ Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 1X, no calcium, no magnesium (DPBS)	14190/ Thermo Fisher Scientific
EAE Induktionskit	EK-2110/ Hooke
Easy Ladder I, 100 lanes	BIO-33045/ Biorline
EnVision-anti rabbit HRP	K4002/ Dako
Eosin [691,86 g/mol]	115935/ Merck
Essigsäure ROTIPURAN® 100 %, p.a. [60,05 g/mol]	3738.5/ Carl Roth
Ethanol 100 %	Pathomed
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99 %, p.a., ACS (EDTA) [372,24 g/mol]	8043.2/ Carl Roth

Fetal Bovine Serum "GOLD" Heat Inactivated EU approved	A15-152/ PAA
Formaldehydlösung, ≥ 37 %, Ph. Eur. [30,03 g/mol]	CP10.2/ Carl Roth
Gelatin from cold water fish skin (CWFS)	G7041/ Sigma-Aldrich
GFAP Antikörper aus Kaninchen	RPCA-GFAP/ Encore
GFAP Antikörper aus Ziege	Sc6170/ Santa Cruz
Glycin, Pufferan ≥ 99 %, p.a. [75,07 g/mol]	3908.2/ Carl Roth
Hämatoxylin krist. [302,28 g/mol]	104302/ Merck
HBSS, calcium, magnesium	24020-091/ Thermo Fisher Scientific
HBSS, calcium, magnesium, no phenol red	14025-050/ Thermo Fisher Scientific
HEPES, PUFFERAN® ≥ 99,5 %, p.a. [238,31 g/mol]	9105.3/ Carl Roth
Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrat, 10 mg/mL Lösung in Wasser	H3570/ Thermo Fisher Scientific
IBA1 Antikörper aus Kaninchen	019-19741/ WAKO
IL6 Antikörper aus Kaninchen	ab7737/ Abcam
Kaliumchlorid, ≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO [74,56 g/mol]	6781.1/Carl Roth
Ketamin 10 %	Ceva
Lipopolysaccharid von E. coli O111:B4	L4391/ Sigma-Aldrich
Lithiumcarbonat, EMPLURA® [73,89 g/mol]	105670/ Merck
Ly6C-APC Antikörper	17-5932-80/ eBioscience
Maus IL6 Antikörper	MAB406-SP/ R&D Systems
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	K1641/ Thermo Fisher Scientific
Maxwell RSC miRNA Tissue Kit	AS1460/ Promega
Mehlfutter	V1530-000/ ssniff
MgCl ₂ 50 mM Stock Solution	BIO-37026/ Biotline
Midori Green Advance	617004/ Biozym
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μL) Kit	28025-021/ Thermo Fisher Scientific
Mouse Lipocalin-2/NGAL Quantikine ELISA Kit	MLCN20/ R&D Systems
N-2 Supplement (100X)	17502-048/ Thermo Fisher Scientific
N-Acetyl-L-cystein (NAC) [163,19 g/mol]	A9165/ Sigma-Aldrich
NaOH 10 M [40 g/mol]	72068/ Sigma-Aldrich
Natriumchlorid 99,5 - 100,5 %, AnalaR NORMAPUR® ACS, Reag. Ph. Eur. zur Analyse [58,44 g/mol]	27810.295/VWR
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, zur Analyse EMSURE®	106346/ Millipore

ACS,Reag. Ph Eur (NaH ₂ PO ₄) [137,99 g/mol]	
Natriumhydroxid, granuliert EMPLURA® [40 g/mol]	1064625000/ Merck Millipore
Natriumiodat, EMSURE® zur Analyse [197,89 g/mol]	1.06525.0100/ Merck
NeuN Antikörper aus Maus	MAB377/ Millipore
Normal Goat Serum Blocking Solution	S-1000/ Vector Labs
Normal Horse Serum Blocking Solution	S-2000/ Vector Labs
NRF2 Antikörper aus Kaninchen	GTX103322/ GeneTex
OLIG2 Antikörper aus Kaninchen	AB9610/ Millipore
OLIG2 Antikörper aus Maus	MABN50/ Millipore
Paraffin, Erstarrungspunkt 57 – 60 °C, Pastillenform Ph. Eur., BP, NF	1.07158.9025/ VWR
PBS-Trockensubstanz ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ [9,55 g/mol]	L 182-50/ Biochrom
PCR Buffer 10X, Minus Mg	18067017/ Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin 100X, 10,000 U/mL (Pen/Strep)	15140-122/ Thermo Fisher Scientific
peqGOLD TriFast™	30-2020/ Peqlab
Percoll	P1644/ Sigma-Aldrich
Periodsäure, zur Analyse EMSURE® [277,94 g/mol]	1.00524.0025/ Merck
PLP Antikörper aus Maus	MCA839G/ Bio-Rad
Poly-D-lysine hydrobromide [70.000 – 150.000 g/mol]	P6407/ Sigma-Aldrich
Primer	Thermo Fisher Scientific
Propanol-2 ROTIPURAN ≥ 99,8 %, p.a., ACS, ISO [60,10 g/mol]	6752.4/ Carl Roth
Random Primers	48190-011/ Thermo Fisher Scientific
Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit	R6000B/ R&D Systems
Rekombinantes murines IL6	216-16A/ Peprotech
Pferd-anti-Maus IgG biotinyliert	BA-2000/ Vector Labs
Pferd-anti-Ziege IgG biotinyliert	BA-9500/ Vector Labs
Ringer-Infusionslösung Ecoflac	B. Braun
RNeasy Micro Kit	74004/ Qiagen
RT2 First Strand Kit	330404/ Qiagen
RT2 Profiler PCR Array	PARN-150ZD/ Qiagen
Schiffs Reagenz	1.09033.0500/ Merck
SensiMix™ SYBR® & Fluorescein Kit	QT615-05/ Bioline
Shandon™ Immu-Mount™	9990402/ Thermo Fisher Scientific

Sodiumazide, ReagentPlus®, ≥ 99,5 % [65,01 g/mol]	S2002-100G/ Sigma-Aldrich
Solvent blue 38 (C.I. 74180), Luxol® Fast Blue MBSN [778,15 g/mol]	7709/ Carl Roth
SYBR Green qPCR Master Mix	B21202/ bimake
Trichlormethan/Chloroform, ROTIPURAN® ≥99 %, p.a. [119,38 g/mol]	3313.1/ Carl Roth
TRIS Hydrochlorid, PUFFERAN®, ≥ 99 %, p.a. [157,60 g/mol]	9090.3/ Carl Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, TRIS, ≥ 99,9 %, p.a. (121,14 g/mol)	4855.2/ Carl Roth
Trypan Blue Solution 0,4 % [960,81 g/mol]	93595/ Fluka Analytical
Trypsin 2,5 % (10X), no phenol red	15090-046/ Thermo Fisher Scientific
Tween20, Ph.Eur.	9127.1/ Carl Roth
UltraPure™ DNase/RNase-Freies Destilliertes Wasser (up H ₂ O)	10977/ Thermo Fisher Scientific
VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (Peroxidase, Standard)	PK-6100/ Vector Labs
ViewRNA™ ISH Tissue 2-Plex Assay Kit	QVT0012/ Thermo Fisher Scientific
ViewRNA™ Probe (Mus musculus Ubc/ RefSeq NM_019639.4)	VB1-10202/ Thermo Fisher Scientific
ViewRNA™ Probe (Mus musculus Olig2/ RefSeq NM_016967.2)	VB6-14496/ Thermo Fisher Scientific
ViewRNA™ Probe (Mus musculus Il6/ RefSeq NM_031168.1)	VB1-10012/ Thermo Fisher Scientific
Wasserstoffperoxid 30 %, ROTIPURAN® p.a., ISO, stabilisiert [34,01 g/mol]	8070.2/ Carl Roth
Xylazin 2 %	Medistar
Xylol	Pathomed
Ziege-anti-Kaninchen IgG biotinyliert	BA-1000/ Vector Labs
ZytoChem Plus (AP) Polymer anti- Rabbit	ZUC031-006/ Zytomed Systems
ZytoChem Plus AP Polymer Kit	POLAP-100/ Zytomed Systems

Geräte und Materialien

Gerät/ Material	Bestellnummer/ Firma
1,4 mm Zirkoniumoxid-Kügelchen	Bertin Technologies
40 µm Cell Strainer	431750/ Corning Inc.
70 µm Cell Strainer	352350/ Corning Inc.
BD FACSCanto II	BD Biosciences

BD Plastipak™ Spritze	303172/ BD Biosciences
Centrifuge 5418	Eppendorf
Centrifuge 5424 R	Eppendorf
Centrifuge 5702 R	Eppendorf
CFX Connect™ Real-Time Detektionssystem	Bio-Rad
Deckgläser	1871/ Carl Roth
DMI 6000 B Mikroskop	Leica
Einmal-Injektions-Kanülen Sterican® 27 G x 3/4“	4657705/ B. Braun
Geldokumentationssystem E-BOX VX2	Vilber
Gelelektrophoresegerät Power Pac 300	Bio-Rad
Glashomogenisator 15 cm ³	432-0203/ VWR
Humidity Cards	3800-004970-001/ Leica
Hybridisierungssystem StatSpin® ThermoBrite® S500	Abbott
Infusomat® Space Leitungen	8700036SP/ B. Braun
Inkubator HERAccl® 150	Heraeus
LSM710	Carl Zeiss
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf
Mikrotom 2065 Jung Supercut	Leica
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	718605/Brand® Sigma-Aldrich
Opti-Seal Optical Disposable Adhesive	157300/ Bioplastics
Original-Perfusor®-Leitungen	8722935/ B. Braun
PCR Platte, 96 x 0,1 mL	B70671/ Bioplastics
PCR Reaktionsgefäße 0,2 mL	0030124.332/ Eppendorf
Pipettenspitzen bis 1.000 µL	1130401/ Heinz Herenz Medizinalbedraf
Pipettenspitzen bis 10 µL	S111-3000/ Starlab Group
Pipettenspitzen bis 200 µL	70.760.002/ Sarstedt
Pipettierhilfe Easypet®	Eppendorf
Precellys 24 Tissue Homogenizer	Bertin Technologies
Probengefäß 1,1 mL Z-Gel	41.1500.005/Sarstedt
Reagiergefäß 1,5 mL	72.690.001/ Sarstedt
Research Plus Pipetten	Eppendorf
Rotana 460R Zentrifuge	Hettich

Safety-Multifly® 21G, 200 mm lang	85.1638.235/ Sarstedt
Schraubdeckelgefäße mit Deckel	91-PCS TC,TV/Peqlab
Serologische Pipette, Costar® Stripette®, 10 mL	4488/ Corning Inc.
Sicherheitswerkbank Herasafe™	Thermo Fisher Scientific
StarFrost Advanced Adhesive Objektträger, 76 mm x 26 mm	11270/ Engelbrecht
Tecan infinite® M200	Tecan
Test Röhren 12 x 75 mm	352235/ BD Biosciences
Thermomixer Comfort/ Compact	Eppendorf
Zellkulturplatte Mikrowell Schwarz, 96 Wells	655090/ Greiner Bio One International
Zellkulturplatte Mikrowell, 96 Wells	353072/ Corning Inc.
Zellkulturplatte Multiwell, 12 Wells	665180/ Greiner Bio One International
Zellkulturplatte Multiwell, 24 Well	353047/ Corning Inc.
Zellkulturplatte Multiwell, 6 Well	353046/ Corning Inc.
Zellkulturschale 100 x 20 mm, TC-Schale 100, Cell+	83.3902.300/ Sarstedt

Lösungen

ABC-Lösung 1:50 (IHC)

50	µL	Avidin DH	Vector Labs
50	µL	biotinylierte HRP	Vector Labs
2.400	µL	1X PBS	

Agarosegel (Molekularbiologie)

2	g	Agarose Standard	Carl Roth
100	mL	TAE 1X Puffer zum Kochen bringen	
1	µL	Midori Green Advance	Biozym

Aldehyd Block-Lösung für CD3 Färbung (IHC)

0,74	g	Glycin [75,07 g/mol]	Carl Roth	0,05	M
200	mL	1X PBS			

anti-APC-Lösung (IHC)				
2,5	µL	anti-APP Antikörper	Millipore	1:250
622,5	µL	Blocking-Solution	Zytomed	
anti-APP-Lösung (IHC)				
0,5	µL	anti-APP Antikörper	Millipore	1:5.000
2.499,5	µL	NHS 5 %		
anti-AQP4-Lösung (IHC)				
1,25	µL	anti-AQP4 Antikörper	Santa Cruz	1:2.000
2.498,75	µL	NGS 5 %		
anti-CD3-Lösung (IHC)				
0,625	µL	anti-CD3 Antikörper	Dako	1:4.000
2.499,375	µL	BSAc Wasch-Lösung, pH 7,4		
anti-GFAP-Lösung (IHC)				
0,03	µL	anti-GFAP Antikörper	Biozol	1:75.000
2.499,97	µL	NGS 5 %		
anti-GFAP-Lösung (IHC)				
3	µL	anti-GFAP Antikörper	Santa Cruz	1:200
597	µL	Blocking-Lösung	Zytomed	
anti-IBA1-Lösung (IHC)				
0,25	µL	anti-IBA1 Antikörper	Wako	1:10.000
2.499,75	µL	NGS 5 %		
anti-IBA1-Lösung (IHC)				
1,6	µL	anti-IBA1 Antikörper	Millipore	1:1.000

1.598,4	µL	Blocking-Lösung	Zytomed	
<i>anti-IL6-Lösung (IHC)</i>				
0,5	µL	anti-IL6 Antikörper	Abcam	1:4.000
1.999,5	µL	Blocking-Lösung	Zytomed	
<i>anti-IL6-Lösung, 1 µg/mL (in vitro)</i>				
28	µL	anti-IL6 Antikörper, 250 µg/mL	R&D Systems	1 µg/mL
6.972	µL	DMEM 0,5 %		
<i>anti-OLIG2-Lösung (IHC)</i>				
1,25	µL	anti-Olig2 Antikörper	Millipore	1:2.000
2.498,75	µL	NGS 5 %		
<i>anti-OLIG2-IL6-Lösung (IF)</i>				
2,5	µL	anti-Olig2 Antikörper	Millipore	1:1.000
50	µL	Anti-IL6 Antikörper (ab7737)	Abcam	1:50
2.447,5	µL	IFF Puffer		
<i>anti-Maus-Lösung 1:50, Sekundärantikörper (IHC)</i>				
50	µL	Pferd-anti-Maus IgG biotinyliert	Vector Labs	
2.450	µL	NHS 5 %		
<i>anti-Maus-Lösung 1:50, Sekundärantikörper (IHC)</i>				
12	µL	Pferd-anti-Maus IgG biotinyliert	Vector Labs	
588	µL	Blocking-Lösung	Zytomed	
<i>anti-Kaninchen-Lösung 1:50, Sekundärantikörper (IHC)</i>				
50	µL	Ziege-anti-Kaninchen IgG biotinyliert	Vector Labs	
2.450	µL	NHS 5 %		

anti-Ziege-Lösung 1:50, Sekundärantikörper (IHC)

12	µL	Pferd-anti-Ziege IgG biotinyliert	Vector Labs		
588	µL	Blocking-Lösung	Zytomed		

Block-Lösung CD3 (IHC)

0.1	g	CWFS Gelatine	Sigma-Aldrich		
1	g	Albumin Fraktion V, biotinfrei [66.000 g/mol]	Carl Roth	152	µM
2	mL	NGS 5 %			
500	µL	Tween20 10 %			
98	mL	1X PBS			

Blaues AP-Substrat-Lösung (IHC)

2,5	mL	Tris-HCl-Lösung 1 M		100	mM
5	µL	Tween20 10 %		0,1 %	
40	µL	Reagenz 1 (Blaues AP-Substrat)	Vector Labs		
40	µL	Reagenz 2 (Blaues AP-Substrat)	Vector Labs		
22,5	µL	Reagenz 3 (Blaues AP-Substrat)	Vector Labs		

Biotin Stock, steril filtriert (*in vitro*)

23,431	mg	Biotin [244.31 g/mol]	Sigma-Aldrich	1	mM
100	mL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		
		mit NaOH 1 M Lösung klären			

Biotin Stock 1:100 (*in vitro*)

10	µL	Biotin Stock, steril filtriert		10	µM
990	µL	DMEM			

BSA Stock, steril filtriert (*in vitro*)

50	g	Albumin Fraktion V, endotoxin-geprüft [66.000 g/mol]	Carl Roth	1,5	mM
500	mL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		

BSAc Wasch-Lösung, pH 7,4 (*IHC*)

5	mL	BSAc 10 %	Aurion		
996	mL	1X PBS			

Citrat-Lösung, pH 6,0 (*IHC*)

1,92	g	Citronensäure	Carl Roth		
auf 1.000	mL	A. dest.			

Cuprizon Futter 0,25 % (*in vivo*) *CytoTox 96 Reagenz*

1	g	bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone	Sigma-Aldrich		
400	g	Mehlfutter	ssniff		

CytoTox 96 Reagenz (in vitro)

12	mL	Assay Puffer	Promega		
1,5	mL	Substrat Mix	Promega		

DAB-Lösung 1:50 (*IHC*)

50	µL	3,3'-diaminobenzidine	Dako		
2.450	µL	Substrat Puffer pH 7,5	Dako		

DMEM 0,5 % (*in vitro*)

495	mL	DMEM	Thermo Fisher Scientific		
2,5	mL	Fetal Bovine Serum	PAA		
2,5	mL	Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific		

DMEM 5 % (*in vitro*)

472,5	mL	DMEM	Thermo Fisher Scientific
25	mL	Fetal Bovine Serum	PAA
2,5	mL	Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific

DMEM 10 % (*in vitro*)

447,5	mL	DMEM	Thermo Fisher Scientific
50	mL	Fetal Bovine Serum	PAA
2,5	mL	Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific

EDTA Stock, steril filtriert (*FACS*)

0,186	g	EDTA [372,24 g/mol]	Carl Roth	0,5	M
1	mL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		

Eosin Stock (*IHC*)

2	g	Eosin [691,86 g/mol]	Merck	30	mM
100	mL	Ethanol 50 %			

Eosin-Lösung (*IHC*)

25	mL	Eosin Stock			
225	mL	Ethanol 50 %			
150	µL	Citronensäure	Carl Roth		

Ethanol 50 % (*IHC*)

50	mL	Ethanol 100 %	Pathomed		
50	mL	A. dest.			

Ethanol 70 % (*IHC / Molekularbiologie*)

70	mL	Ethanol 100 %	Pathomed/ Carl Roth		
----	----	---------------	---------------------	--	--

30 mL A. dest./ up H₂O - / Thermo Fisher Scientific

Ethanol 80 % (*Molekularbiologie*)

80 mL Ethanol 100 % Carl Roth

20 mL A. dest.

Ethanol 95 % (*IHC*)

95 mL Ethanol 100 % Pathomed

5 mL A. dest.

Ethanol 96 % (*IHC*)

96 mL Ethanol 100 % Pathomed

4 mL A. dest.

Formalin-Lösung 3,7 %, pH 7,4 (*Gewebeaufarbeitung*)

100 mL Formaldehydlösung Carl Roth

900 mL A. dest.

4,6 g NaH₂PO₄ [137,99 g/mol] Millipore 33 mM

8,0 g Na₂HPO₄ [177,99 g/mol] Carl Roth 45 mM

Formalin-Lösung 3,7 % (*in situ*)

1 mL Formaldehydlösung Carl Roth

9 mL A. dest.

Formalin-Lösung 10 % (*in situ*)

2,7 mL Formaldehydlösung Carl Roth

7,3 mL A. dest.

Glucose-Lösung 45 %, steril filtriert (*FACS*)

0,45 g Glucose [180,16 g/mol] Carl Roth 2,5 M

1	mL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		
Hydrogenperoxid-Lösung 0,3 % (IHC)					
0,6	mL	Wasserstoffperoxid	Carl Roth		
199,4	mL	1X PBS			
HEPES-Lösung, steril filtriert (FACS)					
1,787	mg	HEPES [238,31 g/mol]	Carl Roth	7,5	mM
1	mL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		
Hoechst 33342 (IF)					
1	µL	Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific		1:10.000
10	mL	1X PBS			
IFF Puffer (IF)					
0,5	g	Albumin Fraktion V, biotinfrei [66.000 g/mol]	Carl Roth	150	µM
1	mL	Fetal Bovine Serum	PAA		
49	mL	1X PBS			
Ketamin/ Xylazin (in vivo)					
300	µL	Ketamine 10 %	Ceva		
75	µL	Xylazine 2 %	Medistar		
auf 7.500	µL	DPBS	Thermo Fisher Scientific		
Label Sonde 6-AP-Lösung (in situ)					
1	µL	Label Sonde 6-AP			1:1.000
999	µL	Label Probe Diluent QF			
Label Sonde 1-AP-Lösung (in situ)					
1	µL	Label Sonde 1-AP			1:1.000

999	µL	Label Probe Diluent QF			
Lithiumcarbonat-Lösung 0,05 % (IHC)					
0,05	g	Lithiumcarbonat [73,89 g/mol]	Merck	6,8	mM
100	mL	A. dest.			
LPS-Stock-Lösung, 10 ng/mL (in vitro)					
10	µL	LPS, 1 mg/mL	Life Technologies	10	µg/mL
990	µL	DPBS	Thermo Fisher Scientific		
LPS-Lösung, 100 ng/mL (in vitro)					
70	µL	LPS-Stock-Lösung, 10 µg/mL		100	ng/mL
6.930	µL	DMEM 0,5 %			
Luxol Fast Blue-Lösung 0,1 % (IHC)					
0,1	g	Solvent blue 38 [778,15 g/mol]	Carl Roth	1,5	mM
100	mL	Ethanol 95 %			
0,5	mL	Essigsäure	Carl Roth		
Mastermix Reverse Transkription (Molekularbiologie)					
4	µL	5X First Strand Buffer	Thermo Fisher Scientific		
2	µL	DTT	Thermo Fisher Scientific	0,1	M
1	µL	dNTP Mix	Bioline	10	mM
0,1	µL	Random Primers	Thermo Fisher Scientific		
1	µL	M-MLV	Thermo Fisher Scientific		
Mastermix Check PCR (Molekularbiologie)					
9,3	µL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		
1,25	µL	PCR Buffer 10X, Minus Mg	Thermo Fisher Scientific		

0,38	μL	MgCl ₂	Bioline	50	mM
0,25	μL	dNTP Mix	Bioline	10	mM
0,25	μL	Primer forward			
0,25	μL	Primer reverse			
0,08	μL	BIOTAQ™ DNA Polymerase	Bioline		

Mastermix RT-qPCR (*Molekularbiologie*)

5	μL	SensiMix™ SYBR® & Fluorescein Kit	Bioline		
2	μL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		
0,5	μL	Primer forward			
0,5	μL	Primer reverse			

Mayer's Hämatoxylin-Lösung (*IHC*)

1	g	Hämatoxylin [302,28 g/mol]	Merck	3,3	mM
800	mL	Leitungswasser			
0,2	g	Natriumiodat [197,89 g/mol]	Merck	1,0	mM
50	g	Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat [474,39 g/mol]	Merck	105	mM
1	g	Citronensäure	Carl Roth		
50	g	Chloralhydrat [165,40 g/mol]	Carl Roth	302	mM
auf 1.000	mL	Leitungswasser			

Medium A mit Phenolrot (*FACS*)

973	μL	HBSS mit Phenolrot	Thermo Fisher Scientific		
14	μL	HEPES-Lösung		7,5	mM
13	μL	Glucose-Lösung 45 %			

Medium A ohne Phenolrot (FACS)

970	µL	HBSS ohne Phenolrot mit Phenolrot	Thermo Fisher Scientific		
15	µL	HEPES-Lösung			
13	µL	Glucose-Lösung 45 %			
2	µL	EDTA Stock 0,5 M			

Myelin Gradienten Puffer Stock I (FACS)

0,78	g	NaH ₂ PO ₄ [137,99 g/mol]	Millipore	5,6	mM
1	L	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		

Myelin Gradienten Puffer Stock II (FACS)

3,56	g	Na ₂ HPO ₄ [177,99 g/mol]	Carl Roth	20	mM
1	L	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		

Myelin Gradienten Puffer, steril filtriert (FACS)

Myelin Gradienten Puffer Stock I

mit Myelin Gradienten Puffer Stock II auffüllen bis pH 7,4, dann

8	g/ L	NaCl [58,44 g/mol]	VWR	140	mM
0,4	g/ L	KCl [74,56 g/mol]	Carl Roth	5,4	mM
2,0	g/ L	Glucose zufügen [180,16 g/mol]	Carl Roth	11	mM

NAC Stock, pH 7 (in vitro)

100	mg	NAC [163,19 g/mol]	Sigma-Aldrich	30	mM
20	mL	DMEM	Thermo Fisher Scientific		
		mit NaOH 1 M pH 7 einstellen			

NaCl-Lösung, steril filtriert (FACS)

1,75	g	NaCl [58,44 g/mol]	VWR	1,5	M
------	---	--------------------	-----	-----	---

20	mL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		
NaOH 1 M (<i>in vitro</i>)					
4	g	Natriumhydroxid	Merck Millipore	1	M
100	mL	A. dest.	-		
NGS 5 % (IHC)					
50	µL	Normal Goat Serum Blocking Solution	Vector Labs		
950	µL	1X PBS			
NHS 5 % (IHC)					
50	µL	Normal Horse Serum Blocking Solution	Vector Labs		
950	µL	1X PBS			
1X PBS, pH 7,4 (IHC / IF)					
9,55	g	PBS Dulbecco [9,55 g/mol]	Biochrom	100	mM
10	L	A. dest.			
Percoll Gradienten Puffer 22 %, steril filtriert (FACS)					
756	µL	Myelin Gradienten Puffer			
220	µL	Percoll	Sigma-Aldrich		
24	µL	NaCl-Lösung			
PAS-Lösung 0,5 % (IHC)					
0,5	g	Periodsäure [277,94 g/mol]	Merck	20	mM
100	mL	A. dest.			
PDL-Lösung (<i>in vitro</i>)					
5	mg	Poly-D-lysine Hydrobromid	Sigma-Aldrich		
50	mL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		

Proteaseverdau-Lösung (*in situ*)

1	µL	Protease QF, ViewRNA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	1:100
99	µL	DPBS	Thermo Fisher Scientific	

Rekombinante IL6-Stock-Lösung, 1 µg/mL (*in vitro*)

2	µL	Rekombinantes IL6, 100 µg/mL	Peprotech	1 µg/mL
198	µL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific	

Rekombinante IL6-Lösung, 10 ng/mL (*in vitro*)

70	µL	IL6-Stock-Lösung, 1 µg/mL		10 ng/mL
6.930	µL	DMEM 0,5 %		

SATO Medium (*in vitro*)

484,49	mL	DMEM	Thermo Fisher Scientific	
5	mL	BSA Stock		
5	mL	Penicillin/ Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	
5	mL	N-2 Supplement	Thermo Fisher Scientific	
500	µL	NAC Stock		
10	µL	Biotin Stock 1:100		

Sodiumazid Stock 1 M (*in vitro*)

0,65	g	Sodiumazid [65,01 g/mol]	Sigma-Aldrich	1	M
10	mL	up H ₂ O	Thermo Fisher Scientific		

TAE 10X (*Molekularbiologie*)

96,88	g	TRIS [121,14 g/mol]	Carl Roth	400	mM
22,84	mL	Essigsäure [60,05 g/mol]	Carl Roth	190	mM
40	mL	EDTA Stock 0,5 M			

Zu 2 L mit A. dest. auffüllen und pH 8 einstellen

TAE 1X (*Molekularbiologie*)

200 mL TAE 10X

1.800 mL A. dest.

Tris-EDTA-Lösung, pH 9,0 (*IHC*)

0,37 g EDTA [372,24 g/mol] Carl Roth 994 μ M

1,21 g TRIS [121,14 g/mol] Carl Roth 10 mM

auf 1.000 mL A. dest.

Tris-HCl-Lösung, 1 M (*IHC*)

157,60 g TRIS Hydrochlorid Carl Roth 1 M

1.000 mL A. dest.

Tween20 10 % (*IHC*)

50 μ L Tween20 Carl Roth

450 μ L 1X PBS

Working Probe Solution (*in situ*)

2 μ L ViewRNA™ Probe Olig2 Thermo Fisher Scientific 1:50

2 μ L ViewRNA™ Probe Il6 Thermo Fisher Scientific 1:50

96 μ L Probe Set Diluent QT Thermo Fisher Scientific

Working Probe Solution Ubc (*in situ*)

2 μ L ViewRNA™ Probe Ubc Thermo Fisher Scientific 1:50

98 μ L Probe Set Diluent QT Thermo Fisher Scientific