

Aus dem Institut für Anatomie

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp

**Myelindegeneration als treibende Kraft der Immunzellrekrutierung:**

**Myelinproteom, Schnittkulturen, Tiermodell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften (Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

M. sc. Sarah Maria Elisabeth Joost, geboren am 29.11.1989 in Göttingen

wohnhaft in Rostock

Rostock, 2020

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00003196](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003196)

**Gutachter:**

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, Institut für Anatomie, Universitätsmedizin  
Rostock

Prof. Dr. med. Dr. rer. med. Andreas Hermann, Klinik und Poliklinik für Neurologie,  
Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht Kossel“, Universitätsmedizin  
Rostock

Prof. Dr. med. Stefanie Kürten, Institut für Anatomie, Lehrstuhl für Neuroanatomie,  
Universität Bonn

**Datum der Einreichung:** 22.9.2020

**Datum der Verteidigung:** 21.7.2021

Wenn man es nur versucht, dann geht's, das heißt mitunter, doch nicht stets.

Wilhelm Busch

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Myelin.....	3
2.1.1	Myelinstruktur und -proteine .....	3
2.1.2	Humane Myelinopathien .....	4
2.2	Modelle der experimentellen Demyelinisierung.....	7
2.2.1	Lysophosphatidylcholin .....	7
2.2.2	Cuprizone.....	8
2.2.3	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	9
2.2.4	Kombination aus Cuprizone-Behandlung und experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis.....	10
2.3	Immunzellrekrutierung in das Zentralnervensystem.....	11
2.3.1	Präsentation von Myelinantigenen im Zentralnervensystem .....	12
2.3.2	Migration von Lymphozyten ins Zentralnervensystem .....	13
2.3.3	Immunzellen in humanen Myelinopathien .....	15
2.4	Fragestellungen .....	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1	Maushaltung .....	19
3.1.1	Cuprizone-Behandlung .....	19
3.1.2	Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis .....	19
3.1.3	Kombination von Cuprizone-Behandlung und experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis.....	21
3.2	Proteomanalyse.....	21
3.2.1	Gewebeentnahme .....	22
3.2.2	Plasmamembranproteinanreicherung .....	22
3.2.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	24
3.2.4	Probenaufarbeitung für Massenspektrometrie .....	25

3.2.5	Flüssigkeitschromatografie-gekoppelte Massenspektrometrie.....	26
3.2.6	Proteinidentifizierung und -quantifizierung.....	27
3.3	Organotypische Schnittkulturen.....	28
3.3.1	Anlegen von sagittalen und frontalen Schnittkulturen mit Agaroseeinbettung.....	28
3.3.2	Immunfluoreszenzfärbung an sagittalen und frontalen Schnittkulturen.....	30
3.3.3	Anlegen von cerebellaren organotypischen Schnittkulturen.....	32
3.3.4	Lysophosphatidylcholin-Behandlung von cerebellaren Schnittkulturen.....	33
3.3.5	Immunfluoreszenzfärbung an cerebellaren Schnittkulturen.....	33
3.3.6	Analyse des Myelinisierungsstatus an cerebellaren Schnittkulturen.....	34
3.4	Durchflusszytometrische Analysen.....	35
3.4.1	Perfusion und Gewebeentnahme.....	35
3.4.2	Gewebeverdau.....	36
3.4.3	Aufreinigung CD45-positiver Zellen.....	36
3.4.4	Extra- und intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung.....	37
3.4.5	Durchflusszytometrische Messung.....	39
3.4.6	Auswertung durchflusszytometrischer Daten.....	39
3.5	Histologische Methoden.....	41
3.5.1	Perfusion und Gewebeentnahme.....	41
3.5.2	Kryoeinbettung und -schnitte.....	42
3.5.3	Immunfluoreszenzmarkierung von Tyrosinhydroxylase.....	42
3.5.4	Paraffineinbettung und -schnitte.....	43
3.5.5	Immunhistochemische Markierung von CD3.....	43
3.5.6	Histochemische Färbungen.....	45
3.5.7	Bildaquisition und Quantifizierung.....	46
3.6	Statistische Auswertung.....	47
3.7	Beteiligung weiterer Experimentatoren.....	47

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1	Nachweis von Proteinen des Myelinproteoms .....	49
4.2	Gewebekulturen als Modell für Neurone und Oligodendrozyten .....	53
4.2.1	Sagittale organotypische Gewebekulturen .....	54
4.2.2	Frontale organotypische Gewebekulturen .....	56
4.2.3	Sagittal-frontale organotypische Kokulturen .....	58
4.2.4	Demyelinisierung in cerebellaren Gewebekulturen .....	60
4.3	Immunzellinfiltrate in demyelinisierenden Mausmodellen.....	62
4.3.1	Leukozyten.....	62
4.3.2	T-Lymphozyten.....	67
4.3.3	B-Lymphozyten.....	71
4.3.4	Phagozytierende Zellen.....	72
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
5.1	Proteomanalyse als Werkzeug in der Analyse von Myelinproteinen .....	75
5.2	Myelinisierung und Demyelinisierung in organotypischen Gewebekulturen ...	77
5.3	Immunzellinfiltrate in demyelinisierenden Mausmodellen.....	80
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XVII</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XIX</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XX</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>XXI</b>
10.1	Chemikalien.....	XXI
10.2	Puffer und Lösungen .....	XXVI
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XXXI</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>XXXII</b>
	<b>Wissenschaftlicher Lebenslauf .....</b>	<b>XXXIII</b>

## 1 Zusammenfassung

Myelin umhüllt neuronale Fortsätze und unterstützt die schnelle, energieeffiziente Aktionspotentialweiterleitung sowie die Homöostase des umhüllten Fortsatzes. Im Rahmen der komplex strukturierten Myelinbiosynthese verknüpfen Oligodendrozyten eine Vielzahl von Myelinproteinen mit den Fettsäuren der Myelinmembran. Myelindegeneration kann zur Demyelinisierung und axonalen Schäden führen. Solche degenerativen Prozesse, wie sie bei der Multiplen Sklerose beobachtet werden können, werden von Neuroinflammation und einer Rekrutierung peripherer Immunzellen begleitet. Die sich daraus ergebende Interaktion zwischen Myelin und peripheren Immunzellen ist nicht gut untersucht, vor allem weil geeignete Modellsysteme fehlen. Um diese Interaktion weiter aufzuklären wurden im Rahmen dieser Arbeit erstens Methoden zur massenspektrometrischen Analyse von Myelinproteinen aus kleinsten Gewebeproben sowie zur experimentellen Myelindegeneration in Schnittkulturen etabliert und zweitens der Einfluss unterschiedlicher Tiermodelle der Myelindegeneration auf Immunzellrekrutierung in das Zentralnervensystem untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit beschreibe ich eine neu entwickelte Methode zur Isolation und Quantifizierung von Myelinmembranproteinen aus kleinsten Gewebemengen, wie sie beispielsweise bei organotypischen Schnittkulturen zur Verfügung stehen. Mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie kann so das Myelinproteom in Zukunft untersucht werden (Joost et al., 2019; Cells).

In einem zweiten Schritt entwickelte ich eine Methode zur Kultivierung großflächiger organotypischer Schnittkulturen ohne die zeitintensive Nutzung eines Vibratoms für den Schneideprozess. Hierbei werden ganze postnatale murine Gehirne in Agarose eingebettet und anschließend zur Kultur in frontaler oder sagittaler Schnittrichtung aufgearbeitet. Nach einer Applikation des Membrandetergenz Lysophosphatidylcholin konnte in cerebellaren Schnittkulturen eine reproduzierbare experimentelle Demyelinisierung induziert und durch Immunfluoreszenzfärbung von Basischem Myelinprotein und Calbindin analysiert werden (Joost et al., 2017; J Neurosci Methods).

Im dritten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwiefern Gehirn-intrinsische degenerative Prozesse zu einer Rekrutierung peripherer Immunzellen führen, und somit im Rahmen der Pathogenese entzündlicher fokaler Läsionen bei Multipler Sklerose eine Rolle spielen könnten. Hierfür wurde im Mausmodell eine metabolisch-induzierte Degeneration der Oligodendrozyten durch Cuprizone-Intoxikation herbeigeführt oder

---

autoimmun vermittelte Neuroinflammation in Form einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis induziert. Durch Kombination beider Modelle wurde die Immunzellrekrutierung unter autoimmun-inflammatorischen Bedingungen in Gebiete mit bestehender Myelindegeneration untersucht. Verschiedene Subklassen peripherer Immunzellen wurden durchflusszytometrisch und immunhistochemisch bestimmt. Immunzellrekrutierung konnte in allen Modellen durchflusszytometrisch und immunhistochemisch nachgewiesen werden. Im reinen Cuprizone-Modell war die Anzahl rekrutierter Immunzellen generell niedriger als in den beiden autoimmunen Modellen. Lymphozyteninfiltrate bestanden im Cuprizone-Modell überwiegend aus CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, in den autoimmunen Modellen hingegen überwiegend aus CD4-positiven T-Helferzellen.

Diese Arbeit zeigt damit die Robustheit von massenspektrometrischer Myelinproteinanalyse in kleinen Probenvolumina, die Anwendbarkeit von Gewebekulturen zur Induktion von experimenteller Demyelinisierung und die unterschiedlichen Auswirkungen von autoimmunen gegenüber primär zytodegenerativ demyelinisierenden Bedingungen auf die Immunzellrekrutierung ins Zentralnervensystem.

## 2 Einleitung

### 2.1 Myelin

Ein Großteil der Axone des Zentralnervensystems (ZNS) sind von einer vielschichtigen isolierenden Membranhülle umgeben, dem Myelin. Es ermöglicht die sehr schnelle saltatorische Erregungsleitung entlang des Axons und erhält die Versorgung des Axons mit Nährstoffen aufrecht [1, 2].

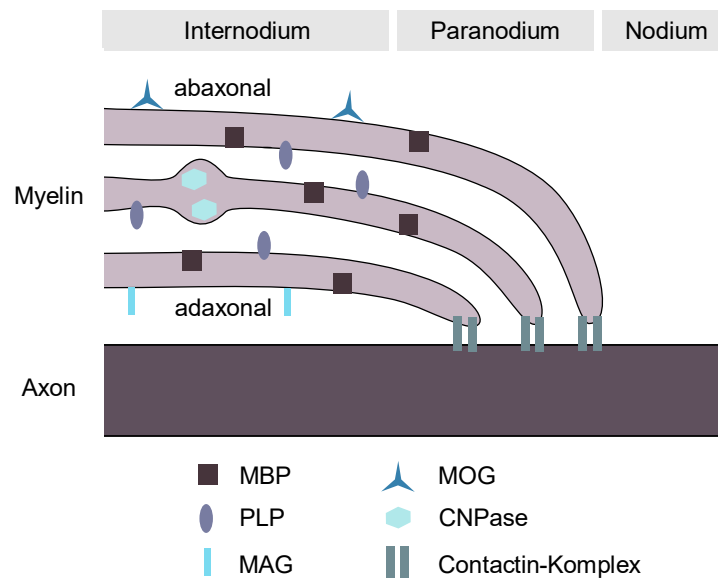
#### 2.1.1 Myelinstruktur und -proteine

Myelin wird aus kompakt um Axone gewickelten Zellmembranfortsätzen von Oligodendrozyten gebildet. Durch die vielfache Umwicklung des Axons entsteht im Myelin eine sich wiederholende Abfolge von Lipiddoppelschicht, Zytoplasma, Lipiddoppelschicht und Extrazellularraum. Die Membranen liegen dabei derart kompakt aneinander, dass die genannte Abfolge nur etwa 12 nm breit ist, Zytoplasma und Extrazellularraum sind also sehr schmal (Übersichtsartikel in [3]).

Oligodendrozyten umhüllen Axone abschnittsweise, dadurch bilden sich Myelin-umhüllte Internodien mit dazwischenliegenden nicht umhüllten Nodien, an denen die Ausbildung von Aktionspotentialen stattfindet. Im an das Nodium angrenzenden Paranodium bilden die Ränder jeder einzelnen Schicht der Myelinscheide mit dem Axon feste Verbindungen, die Nodium und Internodium elektrisch voneinander isolieren. Innerhalb der Myelinscheide wird zwischen der innersten adaxonalen Myelinschicht, der äußersten abaxonalen Myelinschicht und dem dazwischenliegenden kompakten Myelin unterschieden. Diese Kompartimente werden durch unterschiedliche Myelinproteine, die in die Lipiddoppelschichten eingelagert oder eng mit ihnen assoziiert sind, charakterisiert (Abbildung 1).

Das am häufigsten vorkommende Myelinprotein ist das Myelin Proteolipid-Protein (PLP). Es besitzt 4 Transmembrandomänen und ist in den Membranen des kompakten Myelins lokalisiert. Seine Funktion ist nicht abschließend geklärt, es vermittelt aber wahrscheinlich die Adhäsion der nach extrazellulär gerichteten Lipiddoppelschichten zueinander [4, 5]. Das zweithäufigste Myelinprotein des ZNS ist das Basische Myelinprotein (MBP). Es liegt zytosolisch innerhalb des kompakten Myelins vor. Durch teilweises Einlagern in die Lipiddoppelschichten und Wechselwirkungen untereinander verbinden MBP-Moleküle die zytosolisch ausgerichteten Membranen miteinander und reduzieren so den zytosolischen Raum im Myelin auf eine Breite von etwa

3 nm [6, 7]. Um die Versorgung von Myelin und dem Axon unter anderem mit Metaboliten sicherzustellen, bilden sich zytoplasmatische Kanäle innerhalb des Myelins [8]. Sie werden unter anderem von 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNPase) entgegen der komprimierenden Wirkung von MBP offengehalten [9]. In die äußere, abaxonale Membran ist Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG) eingelagert, dessen Funktion bisher ungeklärt ist [10, 11]. Der adaxonale Raum zwischen dem Axon und der adaxonalen Myelinmembran wird von Dimeren von Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) durchspannt und auf eine Breite von etwa 15 nm fixiert [12, 13]. Außerdem vermittelt die Assoziation mit MAG über verschiedene Kinase-abhängige Signalkaskaden die axonale Reifung [14, 15]. In den Paranodien hingegen wird die Verbindung zwischen Axon und Myelinmembran über die Zelladhäsionsmoleküle Contactin, Contactin-assoziiertes Protein und Neurofascin vermittelt [16].



**Abbildung 1: Myelinproteine**

Myelin besteht aus den Zellmembranen von Oligodendrozyten, die mehrfach um ein Axon gewickelt sind. Myelinproteine liegen in unterschiedlichen Kompartimenten des Myelins vor. MBP liegt zytosolisch innerhalb von kompaktem Myelin. PLP liegt im extrazellulären Kompartiment des kompakten Myelins. MAG liegt an der adaxonalen Membran und MOG an der abaxonalen Membran. CNPase hält zytosolische Kanäle zur Versorgung von Myelin und Axon offen. Im Paranodium vermitteln Komplexe aus Contactin, Neurofascin und Contactin-assoziiertem Protein den Kontakt zum Axon. Modifiziert nach [3].

Diese Zusammenstellung einiger Myelinproteine soll betonen, dass Myelin eine hochorganisierte Struktur ist, deren Kompartimente sich in Struktur und Funktion und damit einhergehend in ihren Proteinprofilen wesentlich unterscheiden.

## 2.1.2 Humane Myelinopathien

Erkrankungen des Myelins sind vielseitig und können diverse Ursachen haben. Es lassen sich Leukodystrophien (hereditäre Defekte von struktur- oder stoffwechselrelevanten

Myelinproteinen) und erworbene Myelinopathien (z.B. autoimmun oder toxisch) unterscheiden (Übersichtsartikel in [17]). Die klinischen Erscheinungsbilder sind ebenso wie die strukturellen Veränderungen des Myelins heterogen. Im Folgenden sollen ein paar Beispiele vorgestellt werden, um diese Variabilität zu verdeutlichen.

Die häufigste erworbene Myelinopathie ist die Multiple Sklerose (MS). Die Erkrankung beginnt bei den meisten Patienten als schubförmige MS (relapse-remitting MS, RRMS), bei der sich Phasen der zentralnervösen Inflammation, begleitet von neurologischen Symptomen, mit Phasen der Remission ohne oder mit schwächeren neurologischen Symptomen abwechseln. Bei einem Großteil der Patienten geht die Krankheit nach einigen Dekaden in einen progressiven Verlauf (sekundär progressive MS, SPMS) über, der durch fortschreitende Verschlechterung der klinischen Symptomatik ohne inflammatorische Schübe gekennzeichnet ist [18]. Histopathologisch wird die Erkrankung durch fokal auftretende Demyelinisierung der weißen und auch grauen Substanz gekennzeichnet, die von Inflammation und axonalem Schaden begleitet wird. Die Läsionen können generell im gesamten ZNS auftreten, häufen sich aber insbesondere angrenzend an den inneren und äußeren Liquorraum [19, 20]. Das histologische Erscheinungsbild der Läsionen variiert, was den Myelinisierungszustand und die Infiltration durch Immunzellen betrifft (vgl. 2.3.3). Insbesondere in symptomarmen Intervallen der RRMS kommt es außerdem zur Remyelinisierung von Läsionen [21, 22]. Die Myelinscheide wird also teilweise wieder aufgebaut, ultrastrukturell lassen sich aber Unterschiede zu physiologisch myelinisiertem Myelin feststellen [23]. Die Pathogenese der MS ist bis auf die Identifikation einiger epidemiologischer Risikofaktoren weitestgehend ungeklärt [24]. Der Mechanismus der Demyelinisierung beruht auf verschiedenen Faktoren, wie direkter Zytotoxizität durch antigen-spezifische [25] oder -unspezifische [26] T-Lymphozyten, Autoantikörper gegen Myelinproteine [27] oder mitochondrialen Schädigungen von Oligodendrozyten, die wahrscheinlich durch Mikroglia vermittelt werden [28, 29]. Der genaue Mechanismus und die beteiligten Faktoren sind aber unbekannt [30].

Eine weitere inflammatorische demyelinisierende Erkrankung des ZNS ist die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM). Dabei kommt es, in der Regel im Anschluss an eine Infektion, zur Entwicklung von perivenösen demyelinisierenden und inflammatorischen Läsionen [31]. Diese Läsionen unterscheiden sich von MS-Läsionen durch ihre exklusiv perivenöse Lage und einen monophasischen Krankheitsverlauf [32].

Außerdem werden bei ADEM oft MOG-Autoantikörper im Blut nachgewiesen, was bei MS selten der Fall ist [33]. Die genaue Pathogenese dieser Erkrankung ist aber unklar.

Die Leukodystrophie Pelizaeus-Merzbacher-Syndrom beruht auf einer Mutation im PLP-kodierenden Gen *PLP1* und führt zu unterschiedlich stark ausgeprägter Demyelinisierung [34]. Abhängig von der Art der Mutation variiert der Mechanismus der Myelinschädigung ebenso wie die Schwere der klinischen Manifestation [35]. Missense-Mutationen führen zur Expression von fehlgefaltetem PLP [36]. Dadurch wird in Oligodendrozyten eine unfolded protein response<sup>1</sup> aktiviert, die zur Apoptose des Oligodendrozyten führen kann. Es kommt durch den Untergang von Oligodendrozyten zur massiven Dysmyelinisierung (Fehlen der Myelinscheide). Eine Duplikation des *PLP1*-Gens hingegen führt zur Überexpression des Proteins, mit der Folge, dass PLP im späten Endosom akkumuliert und PLP-assoziierte myelinaufbauende Prozesse unterbrochen werden. Auch dies führt zur Dysfunktion von Oligodendrozyten und zu massiver Dysmyelinisierung [38, 39]. Bei einer Nullmutation des *PLP1*-Gens hingegen wird kein PLP exprimiert, der Oligodendrozyt wird dadurch aber nicht wesentlich geschädigt. Myelin wird in vollem Umfang gebildet, weist aber ultrastrukturelle Veränderungen auf [40]. Es kommt außerdem zur Entwicklung von progressiven axonalen Schäden, was zu vergleichsweise milden neurologischen Symptomen führt [41]. Der zugrundeliegende Mechanismus der axonalen Schädigung ist ungeklärt.

Aus dieser unvollständigen Auswahl von humanen demyelinisierenden Erkrankungen geht hervor, dass Ursachen sowie Ausprägung und morphologisches Erscheinungsbild von Myelinschäden divers und oftmals im Kern unverstanden sind. Die Untersuchung von Demyelinisierungsvorgängen an humanem Material wird durch die geringe Verfügbarkeit von Autopsiematerial eingeschränkt, insbesondere für (ultra)strukturelle Analysen ist das Material durch eingeschränkte Möglichkeiten der Probenaufarbeitung oft nicht optimal. Dementsprechend werden für Studien der Demyelinisierung häufig Tiermodelle verwendet.

---

<sup>1</sup> Unfolded protein response: Die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum aktiviert diverse Signalkaskaden, die zur Verringerung der Proteinbiosynthese, zur Verstärkung der Proteindegredation und zur verstärkten Expression von zur Proteinfaltung relevanten Hilfsproteinen (z.B. Chaperone) führen. Kann die Proteinakkumulation so nicht aufgehoben werden, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet (Übersichtsartikel in [37]).

## 2.2 Modelle der experimentellen Demyelinisierung

Im Tiermodell lassen sich im Wesentlichen toxische, virale, autoimmune und genetisch induzierte Demyelinisierung unterscheiden (Übersichtsartikel in [42]). Im Folgenden sollen die Modellsysteme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, näher erläutert werden.

### 2.2.1 Lysophosphatidylcholin

Lysophosphatidylcholin (LPC) ist ein endogenes Lysophospholipid<sup>2</sup>. Bei stereotaktischer Injektion in das ZNS von Nagetieren verursacht LPC eine fokale Demyelinisierung [44]. LPC lagert sich unspezifisch in die Zellmembranen am Wirkort ein und stört die Membranpermeabilität. Das führt zur Auflockerung und schließlich zum Untergang der Myelinscheide [45]. Axone sind weniger stark betroffen, zeigen aber trotzdem eine Schädigung. Nach der LPC-Behandlung kommt es zur spontanen Remyelinisierung axonaler Fasern. Die neu gebildete Myelinscheide ist allerdings dünner als die ursprüngliche [46, 47].

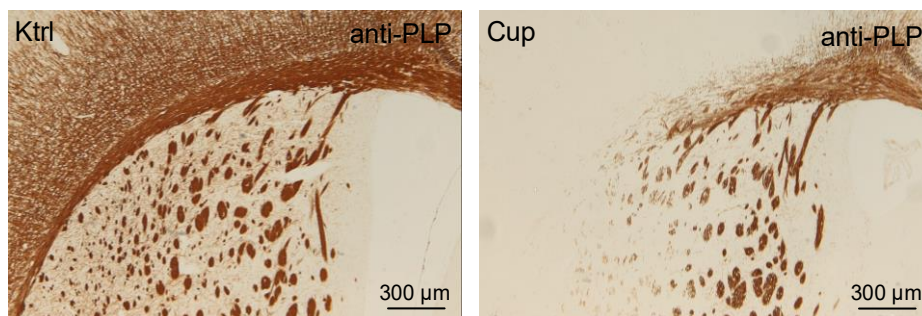
Neben der stereotaktischen Applikation in das ZNS kann LPC verwendet werden, um *ex vivo* in organotypischen Gewebekulturen Demyelinisierung zu induzieren. Organotypische Gewebekulturen sind 300-500 µm dicke Schnitte aus Nervengewebe, die in der Regel nach der Stoppini-Methode auf semipermeablen Membranen kultiviert werden [48]. In ihnen bleibt die dreidimensionale Anordnung verschiedener Zelltypen erhalten, so auch die Myelinisierung von Axonen. Ein gängiges System zur Analyse von Demyelinisierung in Gewebekulturen sind sagittale Kulturen des Cerebellums von 8-10 Tage alten Mäusen [49]. Die Myelinisierung von Purkinje-Zell-Axonon des Cerebellums hat in dem Gewebe zu Kulturbeginn bereits begonnen und schreitet während der Kultur weiter fort [50]. Durch Zugabe von LPC in das Kulturmedium für einen begrenzten Zeitraum kann eine Demyelinisierung bei Erhalt der Purkinje-Zell-Axone experimentell induziert werden [51]. Im Anschluss kann eine endogene Remyelinisierung beobachtet werden [52]. Dieses Modellsystem wurde beispielsweise verwendet um den Einfluss von Wirkstoffen oder genetischen Veränderungen auf die Remyelinisierung zu testen [53–55].

---

<sup>2</sup> Lysophospholipide leiten sich von Glycerophospholipiden ab. Letztere bestehen aus einer Kopfgruppe aus Glycerin, an das zwei hydrophobe Alkylketten sowie, über eine Phosphodiesterbindung, eine polare Alkoholgruppe gebunden sind. Lysophospholipide entstehen durch die Abspaltung einer Alkylkette von Glycerophospholipiden. Sie haben amphipatischen Charakter und besitzen dementsprechend emulgierende Eigenschaften. Sie kommen in geringen Mengen in biologischen Membranen vor und modulieren als Signalmoleküle diverse biologische Funktionen. [43].

## 2.2.2 Cuprizone

Cuprizone ist ein Kupferchelator, der bei oraler Gabe in Mäusen eine toxische Demyelinisierung induziert [56] (Abbildung 2). Nach Beenden der Cuprizone-Gabe kommt es zur Remyelinisierung aller betroffenen Hirnregionen [57]. Die Demyelinisierung ist in diversen Hirnregionen in weißer und grauer Substanz beschrieben, darunter Corpus callosum [58, 59], Cerebellum [60], Hippocampus [61], Basalganglien [62], Thalamus [63] und Kortex [64], das Rückenmark hingegen ist nicht betroffen [65]. Die Demyelinisierung entsteht durch Störung des mitochondrialen Energiestoffwechsels mit darauffolgender Apoptose reifer Oligodendrozyten [66]. Wahrscheinlich werden durch den Cuprizone-vermittelten Kupfermangel Kupfer-abhängige Enzyme der Atmungskette inaktiviert [67, 68]. Es ist unklar, weshalb Oligodendrozyten anfälliger für diesen Kupfermangel sind als andere gliale und neuronale Zelltypen [69].



**Abbildung 2: Demyelinisierung im Cuprizone-Modell**

Durch Fütterung mit dem Kupferchelator Cuprizone wird in Mäusen eine toxische Demyelinisierung ausgelöst. Nach fünf Wochen Cuprizone-Behandlung lässt sich massiver Myelinverlust durch immunohistochemische PLP-Markierung insbesondere im Corpus callosum und Kortex nachweisen. Ktrl: Kontrolle, Cup: Cuprizone. Mit freundlicher Genehmigung von Hannes Kaddatz, Institut für Anatomie Rostock.

Die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung wird sekundär von verschiedenen histopathologischen Merkmalen begleitet [70]. Es kommt zur Astroglie [56, 71], axonalem Schaden [72] und einer Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen. Letztere differenzieren zum Großteil zu adulten Oligodendrozyten aus [73] und führen zur Remyelinisierung. In demyelinisierenden Regionen tritt außerdem eine starke Mikroglie auf [74]. Mikroglia phagozytieren Myelindebris, außerdem wird diskutiert, dass Mikroglia durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in Cuprizone-induzierten Läsionen die Oligodendrozytendifferenzierung und damit Remyelinisierung verstärken und inflammatorische Reaktionen unterdrücken können [74, 75].

Neben einer Aktivierung der ortsständigen Immunzellen werden neutrophile Granulozyten [76] und Makrophagen [77, 78] aus der Peripherie an den Ort der Demyelinisierung rekrutiert. Zur Rekrutierung von peripheren Lymphozyten hingegen gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. In mehreren Studien wurde das Vorhandensein von Lymphozyten in Cuprizone-induzierten demyelinisierten Regionen ausgeschlossen [79–81]. Andere Arbeiten konnten allerdings geringe Zahlen von T-Lymphozyten im Gehirn von Cuprizone-behandelten Tieren nachweisen [77, 78]. Neben dem demyelinisierenden Effekt führt der Cuprizone-induzierte Kupfermangel über eine Inhibition der Interleukin-2-Synthese [82] auch zu Reifungsstörungen von Lymphozyten [83, 84]. Dieser Lymphozyten-depletierende Effekt könnte der Grund für die geringe Rekrutierung von peripheren Lymphozyten in demyelinisierende Cuprizone-Läsionen sein.

Die Blut-Hirn-Schranke wird im Cuprizone-Modell in der Regel als intakt beschrieben [85, 86]. Jüngere Studien zeigen allerdings eine früh nach Beginn der Cuprizone-Gabe einsetzende leicht erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke [87–89].

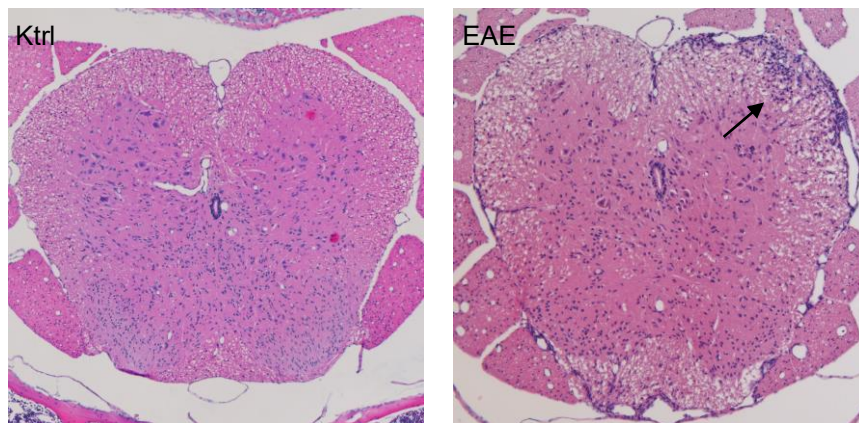
Das Cuprizone-Modell wird als Modell der SPMS eingesetzt. Die nicht auto-immun vermittelte fortschreitende Demyelinisierung mit geringer Rekrutierung peripherer Immunzellen rekapituliert die wesentlichen histopathologischen Merkmale der SPMS (vgl. 2.3.3) und grenzt sich ab zu Modellen mit massiven Immunreaktionen, die eine RRMS modellieren sollen (vgl. 2.2.3).

### **2.2.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis**

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine inflammatorisch vermittelte Demyelinisierung, die auf unterschiedliche Art ausgelöst werden kann. Eine EAE kann in Nagetieren durch Transplantation von Myelin-spezifischen T-Lymphozyten (adaptiver Transfer) oder durch Immunisierung mit Myelinantigenen bei gleichzeitiger Immunstimulation induziert werden (Übersichtsartikel in [90]). Ausprägung und Verlauf der EAE sind wesentlich von Methode und Tierstamm abhängig. An dieser Stelle möchte ich auf die in dieser Arbeit verwendete Variante der EAE, die Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit MOG-Antigen näher eingehen.

Die EAE wird durch Immunisierung mit einem MOG-Peptid in einem Adjuvanz mit hitzeinaktivierten Mykobakterien und zusätzlicher Stimulation der Immunantwort durch Injektion von Pertussistoxin induziert. Es kommt dadurch zu einem monophasischen Krankheitsverlauf, bei dem die Tiere eine vom Schwanz über die Hinterläufe zu den

Vorderläufen aufsteigende Paralyse entwickeln [91]. Histopathologisch ist die EAE durch inflammatorische Infiltrate in Rückenmark, Hirnstamm und Cerebellum gekennzeichnet (Abbildung 3). Weitaus weniger häufig finden sich auch Infiltrate im Vorderhirn [92]. Die Infiltrate liegen bevorzugt perivaskulär, periventriculär oder subpial [93]. Sie induzieren akuten axonalen Schaden [72, 94]. Dieser wird von sekundärer Demyelinisierung begleitet [95], die aber weniger stark ausgeprägt ist als im Cuprizone-Modell und sich vor allem ultrastrukturell nachweisen lässt [96]. Die inflammatorischen Infiltrate werden von T-Helferzellen [97] dominiert, aber auch Mikroglia [93, 98], Makrophagen [98], dendritische Zellen [99], zytotoxische T-Zellen [100] und Granulozyten [101, 102] werden rekrutiert. B-Lymphozyten werden kaum ins ZNS rekrutiert, sie spielen aber eine wesentliche Rolle in der Aktivierung von T-Lymphozyten während der EAE [103, 104]. Die Blut-Hirn-Schranke weist bei EAE Defekte in der Tight-Junction-Expression [105] und Permeabilität [106] auf.



**Abbildung 3: Immunzellinfiltrate in EAE**

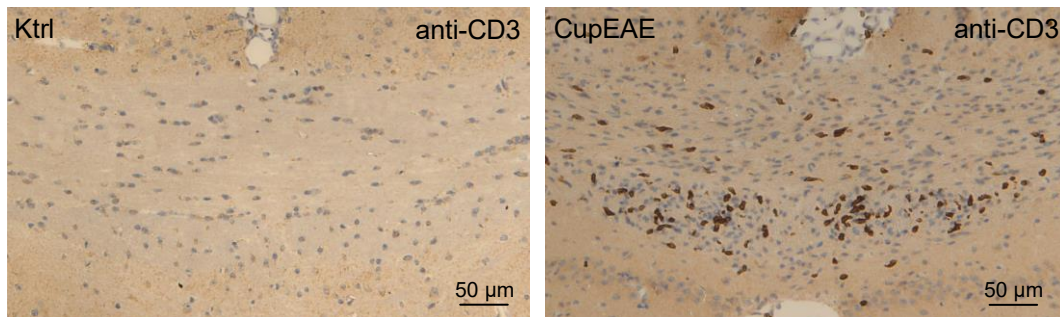
Im EAE-Modell bilden sich im Rückenmark und Kleinhirn inflammatorische Infiltrate, die mit Demyelinisierung und Funktionsverlust von Axonen einhergehen. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sind subpiale und perivaskuläre Infiltrate als Ansammlungen basophiler Zellkerne zu erkennen.

Das Modellsystem EAE ist das am häufigsten verwendete Modell für MS. Es zeigt fokale Läsionen mit massiver Rekrutierung von Immunzellen, was vergleichbar mit akuten Schüben der RRMS ist. Insbesondere Mechanismen der Immunzellrekrutierung ins ZNS und Interaktionen verschiedener Immunzellen können am Modell der EAE untersucht werden [107].

#### **2.2.4 Kombination aus Cuprizone-Behandlung und experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis**

Um die Migration von Immunzellen in Regionen mit bestehenden Myelinschäden zu untersuchen, können Cuprizone-Behandlung und EAE-Induktion kombiniert werden (CupEAE). Dazu wird zunächst eine leichte Demyelinisierung durch Cuprizone-

Behandlung induziert. Anschließend wird eine EAE induziert. Die Tiere entwickeln unter dieser Behandlung die gleichen Symptome wie bei einer reinen EAE. Inflammatorische Läsionen sind im ZNS aber nicht auf Rückenmark, Hirnstamm und Cerebellum beschränkt, sondern befinden sich auch im Vorderhirn (Abbildung 4). Der Schwerpunkt liegt dabei auf den Regionen, die durch Cuprizone-Behandlung vorrangig demyelinisiert werden [108].



**Abbildung 4: Immunzellrekrutierung im kombinierten Cuprizone-EAE-Modell**

Bei der Kombination von Cuprizone-induzierter Demyelinisierung im Vorderhirn und dem Auslösen einer EAE kommt es zur Bildung von Lymphozyteninfiltraten im Vorderhirn, die bei einer reinen EAE nicht auftreten. Die Lymphozyten werden vor allem an Orte der primären Demyelinisierung, wie hier am medialen Corpus callosum gezeigt, rekrutiert. Mit freundlicher Genehmigung von Hannes Kaddatz, Institut für Anatomie Rostock.

Die Histopathologie der Läsionen zeigt wesentliche Merkmale des Cuprizone- sowie des EAE-Modells: mitochondriale Schäden und Apoptose von Oligodendrozyten, Mikrogliose, Demyelinisierung, akute axonale Schäden und perivaskuläre und parenchymale inflammatorische Infiltrate [109]. Die Zusammensetzung der inflammatorischen Infiltrate ist weniger detailliert charakterisiert als im EAE-Modell. Die Infiltrate beinhalten Mikroglia, T-Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten [102, 108]. Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke ist in diesem Modell nicht explizit untersucht, die Rekrutierung von Immunzellen ins Parenchym lässt aber auf eine erhöhte Permeabilität schließen. Hinzu kommt, dass die Aquaporin4-Expression entlang von zentralnervösen Blutgefäßen Störungen aufweist, die auf eine Veränderung der Blut-Hirn-Schranke hindeuten [108].

Dieses Modell eignet sich zur Untersuchung der Immunzellrekrutierung und hieran beteiligten Faktoren in ein ZNS mit beginnenden Myelinschäden. Das Modell wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert und charakterisiert.

### 2.3 Immunzellrekrutierung in das Zentralnervensystem

Der generelle Ablauf einer spezifischen Immunantwort ist folgender: Ein Antigen wird am Infektionsort von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), in der Regel dendritischen Zellen, phagozytiert und prozessiert. Die APZ verlässt das Gewebe über die

Lymphbahn und gelangt in einen lokalen Lymphknoten. Hier präsentiert die APZ das Antigen auf ihrer Zelloberfläche mit Hilfe von major histocompatibility complex II (MHC II)-Molekülen. B-Lymphozyten mit Antigen-spezifischem B-Zell-Rezeptor werden aktiviert und verbleiben im Lymphknoten. Durch Kontakt mit einer aktivierten T-Helfer-Zelle können diese B-Lymphozyten proliferieren und zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren. T-Lymphozyten mit Antigen-spezifischem T-Zell-Rezeptor werden durch Kontakt mit dem Antigen und durch die Kostimulation der APZ aktiviert und verlassen den Lymphknoten in die Blutbahn. Am Infektionsort verlassen die T-Lymphozyten das Blutgefäß durch Adhäsion an spezifische Adhäsionsmoleküle von Endothelzellen und migrieren ins Parenchym. Am Ort der Infektion ist ein zweiter Antigenkontakt über eine APZ notwendig, um den T-Lymphozyten endgültig zu einer Effektorzelle zu aktivieren. Nach diesem Kontakt beginnt der Lymphozyt zu proliferieren und differenziert in seinen reifen Phänotyp. Zytotoxische T-Zellen induzieren Apoptose in Zielzellen, T-Helferzellen modulieren durch Zytokinsekretion die Immunantwort (Übersichtsartikel in [110]).

Das ZNS ist allerdings ein immunprivilegiertes Organ. Es sind nur wenig dendritische Zellen im Gewebe ansässig und das ZNS besitzt keine klassischen Lymphgefäße, über die APZ nach Antigenkontakt migrieren können. Die Blut-Hirn-Schranke erschwert die Migration von aktivierten Immunzellen aus dem Blut in das Parenchym. Die Mechanismen für Antigenpräsentation und Immunzell-Rekrutierung sind dementsprechend andere als in den meisten anderen Geweben (Abbildung 5).

### **2.3.1 Präsentation von Myelinantigenen im Zentralnervensystem**

Der erste Antigenkontakt zwischen naiven Lymphozyten und von APZ präsentierten Myelinantigenen findet wahrscheinlich in tiefen zervikalen Lymphknoten statt [111]. In EAE-Modellen und MS-Patienten konnten mit Myelinantigenen beladene Dendritische Zellen oder Makrophagen in tiefen zervikalen Lymphknoten nachgewiesen werden [112] und die chirurgische Entfernung dieser Lymphknoten vermindert die Symptome einer induzierten EAE wesentlich. Es ist nicht abschließend geklärt, auf welchem Weg Antigene oder Antigen-beladene Zellen in die Lymphknoten gelangen. Das ZNS besitzt zwar keine klassischen Lymphgefäße, es existiert aber ein System von Lymphgefäßen innerhalb der Dura mater, das Makromoleküle und Zellen aus dem ZNS in tiefe zervikale Lymphknoten drainiert [113, 114]. Außerdem ist die Drainage von APZ über die Lamina cribrosa in nasale Lymphgefäße beschrieben [115]. Beide Wege ermöglichen die Drainage von APZ aus dem Subarachnoidalraum. Darüber hinaus wird diskutiert,

ob über den glymphatischen Fluss<sup>3</sup> Antigene aus dem Parenchym des ZNS ausgeschwemmt und im Subarachnoidalraum oder in Lymphknoten außerhalb des ZNS von APZ phagozytiert werden können [117].

Der zweite Antigenkontakt von Lymphozyten findet innerhalb des ZNS statt und ermöglicht den Lymphozyten nach Verlassen der Blutbahn die Migration ins Parenchym [118]. Der Ort dieses Antigenkontaktes sind der Subarachnoidalraum und mit ihm verbundene perivaskuläre Räume [118, 119] und das Stroma des Plexus choroideus [120] (siehe 2.3.2). Wahrscheinlich werden die Antigene von Dendritischen Zellen präsentiert [99, 121], aber auch Mikroglia [122, 123], Makrophagen [124, 125], B-Lymphozyten [103], Astrozyten [126] und Endothelzellen [127, 128] werden als potentielle APZ in Betracht gezogen. Bei fortgeschrittener Inflammation und permeabler Blut-Hirn-Schranke kann ein zweiter Antigenkontakt auch im Parenchym stattfinden. In diesem Fall spielen wahrscheinlich Mikroglia als APZ eine wesentliche Rolle [129].

### **2.3.2 Migration von Lymphozyten ins Zentralnervensystem**

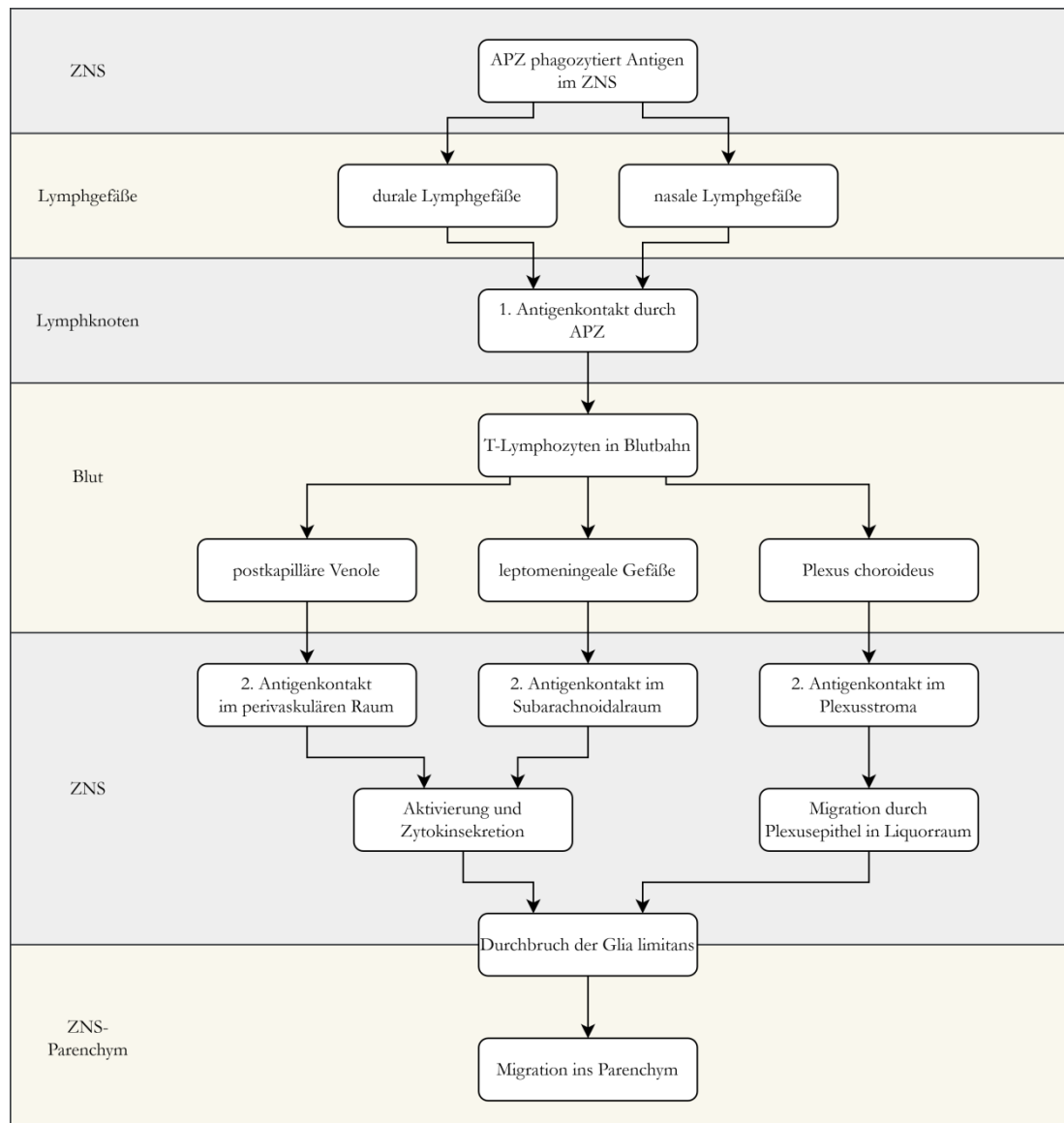
Lymphozyten und auch andere Immunzellen können unter inflammatorischen Bedingungen aus der Blutbahn in das Parenchym des ZNS eindringen. Dabei muss entweder die Blut-Hirn-Schranke oder die Blut-Liquor-Schranke überwunden werden.

Die Blut-Hirn-Schranke wird von Endothelzellen zentralnervöser Gefäße gebildet, die mit Tight junctions miteinander verbunden sind und so den passiven Austritt von Molekülen und die Migration von Zellen aus dem Blut verhindern können. Zur Aufrechterhaltung der Schrankenfunktion ist der Kontakt mit astrozytären Endfüßchen notwendig, die die Expression von Tight junctions in Endothelzellen induzieren und eine zweite Barriere für die Migration von Lymphozyten bilden (Glia limitans perivascularis, Übersichtsartikel in [130]). Aktivierte T-Lymphozyten können in postkapillären Venolen oder in leptomeningealen Venen durch die Gefäßwand migrieren und gelangen in den perivaskulären Raum oder den Subarachnoidalraum [131, 132]. Wenn es hier zum zweiten Antigenkontakt mit einer APZ kommt, wird der Lymphozyt zur Effektorzelle und verändert durch Sekretion proinflammatorischer

---

<sup>3</sup> Das glymphatische System beschreibt einen Flüssigkeitsstrom im ZNS ausgehend von periarteriellen Räumen durch das Interstitium in perivenöse Räume. Liquor cerebrospinalis dringt aus dem Subarachnoidalraum in den periarteriellen Raum von penetrierenden Gefäßen vor (Virchow-Robin-Raum). Astrozytäre Endfüßchen ermöglichen über Aquaporin 4 den Austritt von Flüssigkeit aus dem periarteriellen Raum in das Interstitium. Beim Durchfließen des Interstitiums werden Stoffwechselprodukte in Richtung von venösen Gefäßen transportiert und dort über den perivenösen Raum wieder in den Liquor cerebrospinalis resorbiert (Übersichtsartikel in [116]).

Zytokine die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, so dass weitere Immunzellen eindringen können [133, 134]. Auf diese Art rekrutierte myeloide Zellen sekretieren Metalloproteinasen, die die Basalmembran der Glia limitans auflockern und so den Immunzellen die Migration tiefer ins Parenchym ermöglichen [135, 136]. Durch intravitale 2-Photonen-Mikroskopie konnte die Migration von T-Lymphozyten aus leptomeningealen Gefäßen und ihre Aktivierung durch APZ in EAE-Modellen nachgewiesen werden [137].



**Abbildung 5: T-Lymphozytenaktivierung und -migration ins ZNS-Parenchym**

Im ZNS phagozytieren APZ Antigene und migrieren über durale und nasale Lymphgefäße in zervikale Lymphknoten. Dort werden T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation aktiviert und gelangen in die Blutbahn. Über postkapilläre Venolen, leptomeningeale Gefäße oder den Plexus choroideus gelangen T-Lymphozyten in den perivaskulären Raum, den Subarachnoidalraum oder ins Plexusstroma. Hier werden sie durch Antigenpräsentation durch APZ aktiviert und vermitteln durch Zytokinsekretion eine Auflockerung der Blut-Hirn-Schranke oder Blut-Liquor-Schranke.

Die Blut-Liquor-Schranke wird von den Epithelzellen des Plexus choroideus gebildet. Die Plexusepithelzellen sind durch Tight junctions miteinander verbunden und grenzen

das Stroma des Plexus choroideus gegenüber dem Liquorraum ab. Blutgefäße innerhalb des Plexusstromas besitzen fenestriertes Epithel, das den Übertritt von Immunzellen aus der Blutbahn ermöglicht (Übersichtsartikel in [138]). Im Plexusstroma ist der Kontakt zu APZ möglich [120]. Um in den Liquorraum überzutreten müssen Lymphozyten das Plexusepithel durchqueren. Vom Liquorraum aus können Lymphozyten dann wie oben beschrieben über die Pia mater oder über perivaskuläre Räume in das Parenchym vordringen. Möglicherweise können Lymphozyten auch innerhalb des Plexusstromas über die Anhaftungsstelle des Plexus choroideus an das Gehirnparenchym in das Parenchym migrieren ohne die beschriebenen Schranken überqueren zu müssen [139]. Die Migration von Lymphozyten über den Plexus choroideus ist in Schlaganfall-Modellen und in frühen Phasen des EAE-Modells nachgewiesen, die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen sind aber noch nicht geklärt [139, 140].

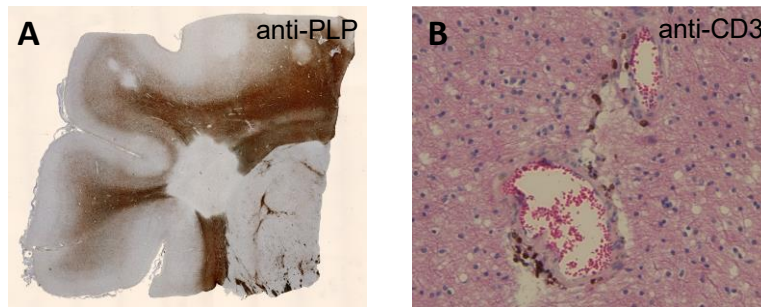
### 2.3.3 Immunzellen in humanen Myelinopathien

Der Untergang von Myelin geht nicht zwangsweise mit Neuroinflammation einher. Bei der Pelizäus-Merzbacher-Krankheit, die durch Mutation im *Pmp22*-Gen ausgelöst wird, kommt es zwar zur Aktivierung von Mikroglia, aber nicht zur Rekrutierung weiterer Immunzellen [141]. In der häufigsten humanen Myelinopathie, der MS, stehen Demyelinisierung und Immunzellrekrutierung in das ZNS hingegen in engem Zusammenhang.

Ein Kennzeichen von MS sind fokale demyelinisierende und inflammatorische Läsionen (Abbildung 6). Sie sind vor allem mit der RRMS assoziiert, während der SPMS kommt es vermehrt zu diffusen Gewebeschäden. Läsionen sind während der aktiven Demyelinisierung durch eine hohe Zahl von Mikroglia oder Makrophagen gekennzeichnet, die Myelinbestandteile phagozytieren. Ist das Myelin vollständig abgebaut, nimmt auch die Zahl phagozytischer Zellen ab. Anhand des Demyelinisierungs- und Inflammationsgrades lassen sich MS-Läsionen histopathologisch klassifizieren [20]. Unabhängig von der Art der Läsion sind außerdem Lymphozyteninfiltrate vorhanden. Sie sind qualitativ in allen Läsionsarten gleich zusammengesetzt, nehmen aber in ihrer Menge im Verlauf von RRMS zur SPMS ab [142, 143].

Der Großteil infiltrierender Lymphozyten bei MS sind zytotoxische T-Lymphozyten. Sie liegen zum einen perivaskulär vor, migrieren aber auch in das Parenchym von Läsionen [142]. Auch T-Helferzellen werden rekrutiert, sie machen aber nur etwa ein Zehntel aller

rekrutierten T-Lymphozyten aus [144]. Die Anzahl von B-Lymphozyten in MS-Läsionen variiert stark von massiver Rekrutierung bis zum Fehlen von B-Lymphozyten [142]. Wenn B-Lymphozyteninfiltrate vorhanden sind, liegen sie in der Regel perivaskulär. Die Zahl von Dendritischen Zellen ist perivaskulär [145] und im Liquor cerebrospinalis [146] bei MS erhöht. Die Rolle von Granulozyten in MS ist noch wenig untersucht, sie kommen im Liquor cerebrospinalis vor [147], werden aber nur minimal ins Gewebe rekrutiert [148].



**Abbildung 6: Histopathologie von akuten MS-Läsionen**

**A** MS wird durch fokale demyelinisierende Läsionen gekennzeichnet. **B** Es bilden sich perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate. Mit freundlicher Genehmigung von Hannes Kaddatz, Institut für Anatomie Rostock.

Es wird diskutiert, ob bei der MS am Beginn der Pathogenese eine Störung des Immunsystems steht, die zur Rekrutierung von Immunzellen ins ZNS und zur Bildung von demyelinisierenden Läsionen führt (Outside-in-Theorie) oder ob es primär zu Myelenschäden kommt, die dann sekundär eine autoimmune Reaktion auslösen (Inside-out-Theorie) [149]. Die Outside-in-Hypothese galt lange Zeit als etabliert, jüngere Studien liefern aber zunehmend Argumente für einen Inside-out-Mechanismus (Übersichtsartikel in [150]). Insbesondere der Nachweis, dass die Induktion von Myelin- oder Oligodendrozytenschäden im Tiermodell autoimmune Reaktionen gegen Myelin auslösen oder modulieren kann, spricht für die Inside-out-Hypothese [108, 151, 152].

## 2.4 Fragestellungen

Die Myelinhülle um Fortsätze von Nervenzellen ist für eine schnelle, energieeffiziente Weiterleitung von Aktionspotentialen wichtig. Sie besteht vor allem aus Lipiden und assoziierten Myelinproteinen. Aus transgenen Tiermodellen ist bekannt, dass Veränderungen des Myelinproteoms, also der Gesamtheit aller in der Myelinscheide vorkommenden Proteine, zu schwerwiegenden neuropathologischen Veränderungen führen können, wie beispielsweise Demyelinisierung und axonalem Schaden. Bei der MS, die mit dem Untergang der Myelinscheide einhergeht, handelt es sich um eine autoimmune Erkrankung, die im Verlauf zu einer chronisch-progredienten Entzündungsreaktion im Gehirn führt. Auf zellulärer Ebene sind Lymphozyten und Gliazellen an der Myelindegeneration beteiligt. Die Auswirkung der Myelin-Lymphozyten-Glia-Interaktion auf das Myelinproteom im Kontext der MS sind wenig untersucht und dementsprechend nur bruchstückhaft verstanden.

Im Rahmen meiner Promotion habe ich deswegen folgende drei Fragestellungen bearbeitet:

**1. Können Myelinproteine insbesondere in kleinen Probenvolumina massenspektrometrisch quantifiziert werden, um Proteinprofile von Myelin zu untersuchen?**

Hierfür wurden Membranproteine aus ZNS-Gewebe isoliert, massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Anschließend wurden Myelinproteine durch Datenbankabgleich identifiziert. Die Robustheit der Methode bei geringen Ausgangsgewebemengen wurde geprüft.

**2. Sind Gewebekulturen ein geeignetes Modellsystem zur Analyse von Myelinproteinen während der De- und Remyelinisierung?**

Neben Zellkulturen und *in vivo* Tierversuchen haben sich in den Neurowissenschaften sogenannte organotypische Schnittkulturen als wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen etabliert. Inwiefern sich solche Schnittkulturen zur Induktion einer experimentellen Myelindegeneration eignen, wird kontrovers diskutiert. Im Rahmen meiner Promotion habe ich verschiedene organotypische Schnittkulturen etabliert und untersucht, inwiefern eine Behandlung mit dem Membrandetergenz LPC zu einer Demyelinisierung führt.

---

### **3. Verändert sich die Immunzellrekrutierung in das ZNS bei experimenteller Myelindegeneration?**

Veränderungen des Myelinproteoms scheinen gemäß der Inside-Out-Hypothese bei der Entstehung der MS sekundär zu einer Invasion peripherer Immunzellen zu führen. Inwiefern die Art der Veränderung des Myelinproteoms bevorzugt zu einer Invasion spezifischer Immunzell-Subtypen führt, ist nicht bekannt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Demyelinisierung durch Cuprizone-Behandlung, EAE-Induktion und Kombination beider Modelle in Mäusen ausgelöst. In das ZNS rekrutierte Immunzellen wurden aufgereinigt und durchflusszytometrisch identifiziert.

### **3 Material und Methoden**

Die verwendeten Chemikalien sind im Anhang unter 10.1 in Tabelle 8 aufgeführt. Die verwendeten Pufferlösungen, Medien und andere Lösungen sind im Anhang unter 10.2 in Tabelle 9 aufgeführt.

#### **3.1 Maushaltung**

Die verwendeten Tiere wurden in Polycarbonat-Käfigen mit mindestens 100 cm<sup>2</sup> Grundfläche je Tier unter einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Käfige waren mit Einstreu, Versteckmöglichkeit, Nestbaumaterial, Kauholz, Standard-Haltungsfutter und frischem Wasser ausgestattet. Der Umgang mit Tieren erfolgte nach Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA) und wurde von den zuständigen Landesbehörden genehmigt. Bei der jährlichen Kontrolle des Tierhygienestatus nach FELASA-Richtlinien wurden in Sentineltieren in der Tierhaltung teilweise *Helicobacter*, Murines Norovirus, Oxyuren (*Syphacia* spp.) und Flagellen nachgewiesen.

##### **3.1.1 Cuprizone-Behandlung**

Für die Behandlung mit Cuprizone wurden 11 Wochen alte weibliche C57BL/6J-Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Staint-Iles, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden für eine, drei oder fünf Wochen mit Cuprizone behandelt. Je fünf Tiere wurden in 820 cm<sup>2</sup> Käfigen mit Standardausstattung mit Ausnahme von Standard-Haltungsfutter gehalten. Die Tiere wurden stattdessen mit 0,25% Cuprizone in Futtermehl gefüttert. Futtermehl und Cuprizone wurden täglich frisch mit einer handelsüblichen Küchenmaschine (Kult X, WMF, Geislingen, Deutschland) eine Minute lang vermengt und dann in Petrischalen in die Käfige gegeben. Je Käfig wurden 140 g Futtermehl auf zwei Petrischalen verteilt. Käfige und Einstreu wurden dreimal wöchentlich gewechselt. Die Gesundheit der Tiere wurde täglich nach den Kriterien Aktivität, Atmung, Bewegung, Fell, Konstitution und Dehydrierung kontrolliert. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen.

##### **3.1.2 Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis**

Für die Induktion einer EAE wurden 16 Wochen alte weibliche C57BL/6J-Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Staint-Iles, Frankreich) verwendet. Je fünf Tiere wurden in 820 cm<sup>2</sup> Käfigen mit Standardausstattung gehalten. Die verwendete Antigenemulsion und die Pertussistoxin-(PTX)-Stammlösung stammen aus einem kommerziellen EAE-Induktions-Kit. Jedem Tier wurde an zwei Injektionsstellen (Nacken und

Schwanzansatz) je 100 µl Antigenemulsion subkutan bzw. intrakutan injiziert. Die PTX-Stammlösung wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 3 ng/µl verdünnt und jedem Tier wurde 2 Stunden nach der Antigeninjektion eine Dosis von 300 ng PTX intraperitoneal injiziert. Diese Injektion wurde in gleicher Dosis 24 h später wiederholt. Kontrolltiere erhielten keine Antigen- oder PTX-Injektionen.

**Tabelle 1: Kriterien für die Bestimmung des EAE-Scores**

<b>Score</b>	<b>Definition</b>	<b>Untersuchung</b>
Score 0	Keine Veränderungen der motorischen Funktion	Tier an der Schwanzwurzel anheben, Schwanz nach oben gestreckt
Score 0,5	Unvollständige Lähmung des Schwanzes	Tier an der Schwanzwurzel anheben, Restspannung im Schwanz vorhanden
Score 1	Vollständige Lähmung des Schwanzes	Tier an der Schwanzwurzel anheben, Schwanz hängt schlaff herunter
Score 1,5	Beeinträchtigung der Funktion der Hinterbeine	Einschränkung der Koordination der Hinterbeine beim Laufen auf einem Metallgitter
Score 2	Schwäche der Hinterbeine	Tier an der Schwanzwurzel anheben, Hinterbeine nicht gespreizt
Score 2,5	Unvollständige Lähmung der Hinterbeine	Beim Laufen auf ebenem Untergrund werden ein Hinterbein komplett oder beide Hinterbeine teilweise nachgezogen
Score 3	Vollständige Lähmung der Hinterbeine	Beim Laufen auf ebenem Untergrund werden beide Hinterbeine nachgezogen
Score 3,5	Vollständige Lähmung der Hinterbeine, kein Aufstehen möglich	Kein Aufrichten aus Seitenlage möglich
Score 4	Vollständige Lähmung der Hinterbeine, teilweise Lähmung der Vorderbeine	Auf ebenem Untergrund kaum Fortbewegung möglich, Tier frisst und reagiert auf Reize
Score 4,5	Vollständige Lähmung der Hinterbeine, und Vorderbeine	Keine Fortbewegung auf ebenem Untergrund, Apathie
Score 5	Tod oder Euthanasie aufgrund der Lähmung	

Die Gesundheit der Tiere wurde täglich nach den Kriterien Aktivität, Atmung, Bewegung, Fell, Konstitution und Dehydrierung kontrolliert. Zur Minimierung von Stress wurden die Tiere die ersten sieben Tage nach Injektion nur durch Sichtkontrolle überwacht. Ab Tag 8 wurde täglich der EAE-Score der Tiere nach den Kriterien aus Tabelle 1 bestimmt. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen.

Falls sich offene Wunden an den Injektionsstellen bildeten, wurden sie täglich mit Bepanthen-Salbe behandelt. Sobald das erste Tier einen Score von 2,5 erreichte, wurden alle Käfige zusätzlich mit Wassergel ausgestattet. Tiere mit einem Score von mindestens 3 erhielten täglich eine subkutane Injektion von 1 ml Ringer-Lösung. Bei einem Score von 4 wurde das betroffene Tier nach spätestens zwei Tagen getötet. Bei einem Score von 4,5 wurde das Tier sofort getötet.

### **3.1.3 Kombination von Cuprizone-Behandlung und experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis**

Für die Kombination von Cuprizone-Behandlung und EAE-Induktion wurden 11 Wochen alte weibliche C57BL/6J-Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Staint-Iles, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden zunächst drei Wochen lang wie unter 3.1.1 beschrieben mit 0,25% Cuprizone in Futtermehl gefüttert, dann erhielten sie zwei Wochen lang Standard-Haltungsfutter. Es erfolgte dann die EAE-Induktion wie unter 3.1.2 beschrieben.

## **3.2 Proteomanalyse**

Unter dem Proteom versteht man die Gesamtheit aller in einem Gewebe exprimierten Proteine. Um eine große Zahl von Proteinen zeitgleich zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Die Fraktion der Membranproteine wurde mit einem Polymer-basierten Zwei-Phasen-System aufgereinigt. Die Proteine wurden zu Peptiden verdaut, die im Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert werden können. Durch den Abgleich der gemessenen Peptide mit Proteindatenbanken lassen sich die ursprünglichen Proteine identifizieren.

Das verwendete Massenspektrometer kombiniert Hochleistungsflüssigkeitschromatografie mit Ionen-Mobilitäts-Separation und Tandem-Massenspektrometrie. Durch die vorgeschaltete Flüssigkeitschromatografie wird das Peptidgemisch schon vor Eintritt in das Massenspektrometer aufgetrennt. Im Massenspektrometer werden die Peptide durch Ionisation in einen ionisierten, gasförmigen Zustand überführt. Nacheinander werden dann mittels Ionen-Mobilitäts-Separation die Driftzeit der

ionisierten Peptide in der Gasphase (abhängig von Größe und Form der Moleküle) und im eigentlichen Massenspektrometer die Flugzeit der ionisierten Peptide im Vakuum (abhängig von Ladung und Gewicht der Moleküle) gemessen. Dabei werden alternierend die intakten Peptide (Vorläuferionen) gemessen oder es wird eine Fragmentierung der Peptide in kleinere Ionen (Fragmentionen) induziert und die Fragmentionen werden gemessen. Diese große Menge an Informationen zu den in den Proben vorhandenen Peptiden ermöglicht durch Abgleich mit Proteindatenbanken die sichere Identifikation und Quantifizierung der Proteine der ursprünglichen Probe.

### **3.2.1 Gewebeentnahme**

Für die Analyse von Membranproteinen wurden zwei männliche adulte Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Wilmington, Vereinigte Staaten) wie unter 3.4.1 beschrieben narkotisiert und mit 250 ml Natriumchloridlösung (0,9%) perfundiert. Das Cerebellum wurde entnommen, gewogen und sofort in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Analyse von postnatalem Mausgewebe wurden sieben fünf Tage alte C57BL/6-Mäuse (Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung, Universitätsmedizin Rostock) verwendet. Das Gewebe wurde in Form von Gewebeschnitten, wie sie auch für sagittale Schnittkulturen verwendet werden, gewonnen (siehe 3.3.1). Die Schnittebenen der einzelnen Gewebeschnitte wurden dokumentiert und nur Schnitte derselben Ebene aus beiden Hemisphären (zwei Schnitte pro Tier) wurden weiterverwendet. Die Schnitte wurden einzeln in Kryoröhrchen überführt, gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Analyse des Corpus callosum wurden adulte C57BL/6-Mäuse (Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung, Universitätsmedizin Rostock) wie unter 3.4.1 beschrieben mit PBS perfundiert, das Gehirn wurde entnommen und das Corpus callosum wurde mit Hilfe einer feinen Pinzette ohne Kontaminationen durch kortikales Gewebe präpariert. Das Corpus callosum von je drei adulten Mäusen wurde zusammen prozessiert.

### **3.2.2 Plasmamembranproteinanreicherung**

Die Anreicherung von Plasmamembranproteinen erfolgte nach dem Protokoll von Schindler et al. [153] mit einem wässrigen Zwei-Phasen-System aus Polyethylenglykol und Dextran. Das Zwei-Phasen-System wurde einen Tag vor der Aufarbeitung aus Tris-Stammlösung, Polyethylenglykol-Stammlösung und Dextran-Stammlösung angesetzt.

Für jede Probe wurden ein Polystyrolröhrchen (4 ml) mit Zwei-Phasen-System A und sechs Röhrchen mit Zwei-Phasen-System B angesetzt und über Nacht bei 4° C gelagert. Die Füllhöhe der Röhrchen wurde markiert und die obere Phase der Zwei-Phasen-Systeme B wurde abgenommen und gesammelt.

Die gesamte Aufarbeitung wurde in vorgekühlten Ständern durchgeführt. Die Probe (0,1 g Cerebellum der Ratte oder ein einzelner Gewebeschnitt der Maus, etwa 20 mg) wurde in ein Röhrchen mit Zwei-Phasen-System A gegeben und mit einem Potter-Elvehjem-Handhomogenisator (10 Hübe bei 250 rpm) und dann mittels Ultraschall (45 Sekunden) homogenisiert. Zum Herbeiführen der Phasentrennung wurde das Zwei-Phasen-System bei 1089 g für 5 Minuten zentrifugiert. Dann wurde die obere Phase abgenommen und in eines der vorbereiteten Zwei-Phasensysteme B gegeben. Dem Zwei-Phasen-System A wurde zuvor abgenommene obere Phase zugegeben bis die ehemalige Füllhöhe wieder erreicht war. Die Phasen wurden durch 20-maliges Invertieren des Röhrchens, 10 Sekunden Vibrationsmischen und abermals 20-maliges Invertieren gemischt. Anschließend wurde abermals durch Zentrifugation die Phasentrennung erreicht. Die obere Phase des Systems B wurde in ein frisches System B-Röhrchen gegeben und die obere Phase des Systems A wurde in das bereits verwendete System B-Röhrchen überführt. Die Reste des Zwei-Phasen-Systems A wurden dann verworfen. Anschließend wurden die Phasen abermals gemischt, durch Zentrifugation getrennt und die oberen Phasen wurden wie oben beschrieben in das nächste Röhrchen gegeben. Dies wurde bis zum sechsten Röhrchen wiederholt, dann wurden bei den Mausproben die oberen Phasen aus beiden Röhrchen gesammelt, bei den Rattenproben wurde nur mit der oberen Phase des sechsten Röhrchens weitergearbeitet.

Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 0,5 ml gepufferter Kaliumchloridlösung je 1 ml Probe verdünnt und in dickwandige Polycarbonatröhrchen überführt. Dann wurden die Proben eine Stunde bei 229502 g in einer Ultrazentrifuge (Beckman Optima™ TLX, Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit gepufferter Kaliumchloridlösung und dreimal mit Natriumcarbonatlösung (0,2 M) gewaschen, indem die Waschlösung zugegeben, die Probe 10 Sekunden vibrationsgemischt und der Überstand vorsichtig abgekippt wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde die verbleibende Flüssigkeit auf ein Papiertuch ausgeklopft und das Röhrchen kopfüber trocknen gelassen.

Das Pellet wurde mit 100  $\mu$ l Lysepuffer versetzt, eine Minute vibrationsgemischt, 20 Sekunden ins Ultraschallbad getaucht und abermals eine Minute vibrationsgemischt. Bei den Proben von Mausgewebe wurden die Proteinlösungen aus dem gleichen Gewebeschnitt gepoolt um die Ausbeute zu erhöhen. Die Proteinkonzentration wurde fotometrisch bestimmt indem 4  $\mu$ l Probe oder Albumin-Lösung bekannter Konzentrationen mit 60  $\mu$ l Pierce Reagenz gemischt und nach 5 Minuten Inkubation im Dunkeln die Extinktion bei 660 nm bestimmt und mit der Albumin-Eichgeraden abgeglichen wurde.

### **3.2.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

In der zweidimensionalen Gelelektrophorese wird ein Proteingemisch durch Kombination von isoelektrischer Fokussierung und Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine zunächst entsprechend ihres Gehaltes an sauren und basischen Aminosäureresten auf einem Gradientenstreifen immobilisiert. Von dem Streifen werden die Proteine auf ein Polyacrylamidgel übertragen und dann elektrophoretisch nach ihrer Größe ein zweites Mal aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden Gesamtproteinproben und Proteine nach Plasmamembranproteinanreicherung zweidimensional aufgetrennt. Membranproteinproben wurden nach der Anreicherung direkt mit Rehydrierungspuffer gemischt (siehe unten). Gesamtproteinproben wurden zunächst wie folgt aufbereitet.

Die gefrorenen Proben wurden mit Lysepuffer versetzt (9 ml/mg Probe) und Proteaseinhibitor-Stammlösung (0,4 ml/mg Probe), Pepstatin A-Stammlösung (0,1 ml/mg Probe) und Phenylmethansulfanylfluorid-Stammlösung (0,1 ml/mg Probe) wurden zugegeben. Dann wurden die Proben rasch aufgetaut, schockgefroren, wieder aufgetaut und mit einem Potter-Elvehjem-Handhomogenisator (10 Hübe bei 250 rpm) homogenisiert. Anschließend durchliefen sie fünf Mal einen Zyklus aus 20 Sekunden Vibrationsmischen, 20 Sekunden im Ultraschallbad und 20 Sekunden wiederholtem Invertieren. Die Proben wurden abermals schockgefroren, aufgetaut und 30 Sekunden vibrationsgemischt. Dann wurden sie 15 Minuten in Eiswasser inkubiert, abermals 30 Sekunden vibrationsgemischt und 20 Minuten bei 17860 g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration wie unter 3.2.2 beschrieben bestimmt und die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden die Gesamtproteinproben oder Membranproteinproben mit Rehydrationspuffer verdünnt, so dass eine Proteinmenge von 8 µg in 125 µl Volumen auf Immobiline DryStrips (pH 3-10, GE Healthcare, 17-6001-12, Chikago, Vereinigte Staaten) aufgetragen werden konnte. Die Streifen wurden in der Fokussierkammer (Protean IEF cell, Biorad, Hercules, Vereinigte Staaten) für 12 Stunden bei 50 V aktiv rehydriert. Die Programmierung für die isoelektrische Fokussierung war: linearer Spannungsanstieg auf 300 V in 30 Minuten, 300 V für 30 Minuten, langsamer Spannungsanstieg auf 1000 V für 30 Minuten, linearer Anstieg auf 5000 V in 90 Minuten, 5000 V für 8000 Vh. Dann wurden die Streifen für 45 Minuten in Equilibrierungspuffer mit 10 mg/ml Dithiothreitol und dann für 45 Minuten in Equilibrierungspuffer mit 40 mg/ml Iodacetamid rehydriert. Die Streifen wurden auf Polyacrylamid-Fertiggele (Mini Protean Stain Free Gels 12%, Biorad, 4568041, Hercules, Vereinigte Staaten) gegeben und mit Agaroselösung überschichtet. Die Gelelektrophorese wurde in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer (Mini Protean Tetra Cell, Biorad, Hercules, Vereinigte Staaten) bei 100 V für 150 bis 180 Minuten durchgeführt.

Da nur geringe Proteinmengen aufgetrennt wurden, wurden die Proteinspots mit einer sensitiven Silberfärbung visualisiert. Dafür wurden die Gele 30 Minuten in Fixierlösung fixiert, zweimal für je 20 Minuten in 50% Ethanol und dann zweimal für je 5 Minuten in Reinstwasser gewaschen. Die Gele wurden 2 Minuten in Natriumthiosulfatlösung (2 mg/ml) inkubiert und eine Minute in Reinstwasser gewaschen. Dann wurden die Gele für 20 Minuten in Silbernitratlösung (1,5 mg/ml) inkubiert und 1 Minute in Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurden die Gele in Entwicklerlösung für 1 bis 10 Minuten inkubiert bis Proteinspots sichtbar wurden und die Reaktion wurde durch Inkubation in Essigsäure (5% v/v) gestoppt. Die Gele wurden in Reinstwasser gewaschen und dann mit einem ProXima 2850 System (Isogen Live Science, Utrecht, Niederlande) digitalisiert.

### **3.2.4 Probenaufarbeitung für Massenspektrometrie**

Die Probenvorbereitung und die massenspektrometrische Analyse wurden von Dr. Stefan Mikkat in der Core Facility Proteomanalytik der Universitätsmedizin Rostock im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation durchgeführt.

Die Proben wurden mit Dithiothreitol-Lösung (10 mM) reduziert, um Disulfidbrückenbindungen zu lösen, 10 Minuten in einem Ultraschallwasserbad inkubiert und dann auf ein Zentrifugenfiltersystem (Microcon 30 kDa, Millipore, Sigma-

Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten) gegeben. Das folgende Protokoll für die Entfernung des Reduktionsmittels, Alkylierung und tryptischen Verdau der Proben in dem Filtersystem wurde nach Wiśniewski et al. [154] durchgeführt. Die Säulen wurden zunächst zwei Mal mit Harnstoff-Lösung (8 M) gewaschen, um Reduktionsmittel und andere niedermolekulare Störstoffe zu entfernen. Dann wurden die Proben zur Alkylierung 20 Minuten in Iodacetamid-Lösung (50 mM) inkubiert und zwei Mal mit Harnstoff-Lösung (8 M) gewaschen, um das Iodacetamid wieder zu entfernen. Die Filter wurden drei Mal mit Ammoniumbicarbonat-Lösung (50 mM) gewaschen, dann wurden die Proben auf dem Filter in 40 µl Ammoniumbicarbonat-Lösung mit Trypsin (Verhältnis Enzym:Protein 1:25) für 16 Stunden bei 37° C verdaut. Peptide wurden durch Zentrifugation gewonnen und ein weiterer tryptischer Verdau der auf dem Filter verbleibenden Proteine wurde zur Erhöhung der Peptidausbeute für zwei Stunden durchgeführt. Nach der Elution der Peptide wurden die Proben mit Trifluoressigsäure zu einer Endkonzentration von 0,25% angesäuert. Das Lösungsmittel wurde in einem Zentrifugalverdampfer entfernt und die Proben wurden in 20 µl Acetonitril-Ameisensäure-Lösung gelöst. Die Peptidkonzentration wurde mittels Qubit™ Protein Assay (Thermo Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten) nach Herstellerprotokoll bestimmt.

### 3.2.5 Flüssigkeitschromatografie-gekoppelte Massenspektrometrie

Die Peptidlösungen wurden am Synapt G2-S Massenspektrometer (Waters, Manchester, Vereinigtes Königreich) analysiert. Peptidproben mit einem Proteingehalt von 200 ng wurden zunächst in einer Vorsäule (nanoAcquity UPLC Symmetry C18, 5 µm, 180 µm x 20 mm, Waters, Manchester, Vereinigtes Königreich) entsalzt und dann mit einer Flussrate von 300 nl/min bei einer Säulentemperatur von 35° C auf der analytischen Säule (Acquity UPLC HSS T3, 1,8 µm, 75 µm x 250 mm, Waters, Manchester, Vereinigtes Königreich) aufgetrennt. Die mobilen Phasen bestanden aus 0,1% Ameisensäure in Wasser (Phase A) und 0,1% Ameisensäure in Acetonitril (Phase B). Die Mausproben wurden über 120 Minuten mit einem Gradienten von 3% Phase B bis 32% Phase B aufgetrennt. Die Rattenproben wurden über 90 Minuten mit einem Gradienten von 3% Phase B bis 35% Phase B aufgetrennt.

Mittels Elektrosprayionisation wurden die Peptide ionisiert und in die Gasphase überführt. Ein Quadrupol (zwei entgegengesetzt-gleiche Dipole) selektierte Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) für die weitere Analyse. Durch Ionenmobilitätsseparation wurde die Driftzeit des Ions in einer Gasphase bestimmt.

Dann wurde im Massenanalysator die Flugzeit des Ions im Vakuum gemessen. Alternierend wurde die Kollisionsenergie im Bereich des Ionenmobilitätsseparators verändert. Bei erhöhter Kollisionsenergie werden Vorläuferionen bei Kontakt mit Gasmolekülen in Fragmentationen fragmentiert, bei niedriger Kollisionsenergie bleiben die Vorläuferionen intakt. In Intervallen von 0,6 Sekunden wurde zwischen niedriger Kollisionsenergie (4 eV) und hoher Kollisionsenergie (abhängig von der Driftzeit des Ions) gewechselt. Zur Kalibration des Gerätes für die Quantifizierung wurde alle 30 Sekunden für 1 Sekunde das Referenzpeptid [Glu1]-Fibrinopeptid B mit einer Konzentration von 100 fmol/ $\mu$ l mit einer Flussrate von 500 nl/min eingespeist.

### 3.2.6 Proteinidentifizierung und -quantifizierung

Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden mit Progenesis QI for Proteomics (Version 2.0 und 4.1, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Vereinigtes Königreich) bearbeitet. Die Verschiebung von Retentionszeiten in verschiedenen Läufen in der Flüssigkeitschromatographie wurde durch 'retention time alignment' an einem repräsentativen Experiment ausgeglichen. Die Parameter für die automatische Peakerkennung waren die automatisch gewählte Sensitivität und eine maximale Ionenladung von +4.

Die Identifikation von Peptiden und Proteinen wurde durch Abgleich mit der Datenbank Uniprot erreicht (29799 Proteinsequenzen aus dem Proteom der Ratte (*Rattus norvegicus*), abgerufen im März 2017; 16970 Proteinsequenzen aus dem Proteom der Maus (*Mus musculus*), abgerufen im März 2018). Für den theoretischen Verdau dieser Proteine wurden bis zu zwei fehlende Schnittstellen, die Oxidation von Methioninresten als fakultative Modifikation und die Carbamidomethylierung von Cystein als feststehende Modifikation angenommen. Für die Identifikation von Peptiden wurden mindestens drei Fragmentationen-Identifikationen und für die Identifikation von Proteinen mindestens sechs Fragmentationen und zwei Peptide benötigt. Nur Proteine, die durch mindestens zwei einzigartige Peptide identifiziert wurden, wurden in die Analyse eingeschlossen. Die Menge der Proteine wurde nach der Hi3-Methode [155] ausgewertet, wobei die Summe der Intensität der drei häufigsten Peptide eines Proteins der Quantifizierung zugrunde liegt und zur Signalintensität des Referenzpeptids normalisiert wird. Zur Abschätzung der falsch-positiven Protein-Identifikationen wurde eine den Referenz-Proteindatenbanken ähnliche decoy database mit irrelevanten Proteinsequenzen mit den gemessenen Datensätzen abgeglichen. Die Identifikationsrate

lag bei unter 0,1%. Es wurden keine Proteine mit mehr als einem einzigartigen Peptid identifiziert.

Zur Identifikation von Myelinproteinen wurden die ermittelten Proteine mit einem von Jahn et al. [156] publizierten Myelinproteom der Maus abgeglichen. Für den Mausdatensatz wurden die Protein-Identifikationsnummern direkt abgeglichen. Für den Rattendatensatz wurden die Protein-Identifikationsnummern mit Hilfe des Retrieve/ID mapping-Werkzeuges der Uniprot-Webseite in Genbezeichnungen übersetzt und mit den von Jahn et al. [156] ebenfalls publizierten Genbezeichnungen des Myelinproteoms abgeglichen.

### **3.3 Organotypische Schnittkulturen**

In organotypischen Schnittkulturen wird Gewebe undissoziiert kultiviert. Die Zusammensetzung und Struktur gewebetypischer Zelltypen bleibt auf diese Art erhalten, während das Gewebe gleichzeitig zugänglich für Manipulationen und Analysen ist.

#### **3.3.1 Anlegen von sagittalen und frontalen Schnittkulturen mit Agaroseeinbettung**

Für sagittale und frontale organotypische Schnittkulturen wurden fünf Tage alte C57BL/6-Mäuse (Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung, Universitätsmedizin Rostock) oder Mäuse mit Expression von Grün-fluoreszierendem Protein (GFP) unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase (TH)-Promotors (TH-GFP, [157], Zuchttiere erhalten von Kazuto Kobayashi, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan) verwendet.

Das Anlegen von Gewebekulturen mit Agaroseeinbettung erfolgte wie in Joost et al. [158] publiziert. Die Tiere wurden mit einer großen Schere dekapitiert, alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten an einer sterilen Werkbank mit horizontalem Luftstrom unter sterilen Bedingungen. Der Kopf wurde mit Ethanol (70%)-getränkten Wattestäbchen gereinigt und dann mit einer spitzen Pinzette durch Einstechen in die Orbitae für die Präparation fixiert. Die Kopfhaut wurde mit einer kleinen Schere von kaudal aus sagittal aufgeschnitten und zur Seite geklappt. Dann wurde mit einer frischen kleinen Schere der Schädel vom Hinterhauptsloch ausgehend mediosagittal aufgeschnitten, die Kalotte wurde mit einer Pinzette entfernt oder zur Seite geklappt und das Gehirn wurde mit Hilfe eines feinen Spatels von der Schädelbasis gelöst und in eine Petrischale mit vorgekühltem Präparationsmedium überführt.

Für die Agaroseeinbettung wurde im Voraus 4% Agarose in destilliertem Wasser autoklaviert, in sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml) à 8 ml aliquotiert und bei 4° C gelagert. Vor Beginn der Präparation wurde pro Tier ein Agarose-Aliquot in einem Wasserbad bei 60° C geschmolzen. Die Einbettung des Gehirns erfolgte direkt auf dem abnehmbaren Kunststoff-Schneideteller des McIlwain Tissue Choppers (Ted Pella, Redding, Vereinigte Staaten). Der Schneideteller wurde möglichst großflächig mit flüssiger Agarose bedeckt ohne dass diese über den Rand lief. Ehe die Agarose begann zu erstarren wurde das Gehirn mit einem Spatel mittig in die Agarose überführt. Auf einer vorgekühlten Metallplatte erstarrte die Agarose dann innerhalb weniger Minuten. Der Randbereich des Schneidetellers wurde mit einer Rasierklinge von Agarose befreit, damit die Befestigungsklammern des Tissue Choppers den Teller fixieren konnten. Der Schneideteller wurde unter dem Messer des Tissue Choppers fixiert und das Gehirn durch Drehen frontal oder sagittal zum Messer ausgerichtet. Dann wurden mit dem Tissue Chopper 350 µm dicke Schnitte angefertigt. Um zu verhindern, dass Schnitte am Messer kleben bleiben und hochgezogen werden muss der Schneideteller so ausgerichtet sein, dass das Messer nicht über den Agaroserand hinausragt. Das geschnittene Gehirn wurde mit einer Rasierklinge grob aus der Agarose ausgeschnitten und in eine Petrischale mit vorgekühltem Präparationsmedium überführt.

Unter einer Stereolupe wurden die Schnitte mit Hilfe von zwei feinen Wägespateln voneinander und von der umgebenden Agarose getrennt. Die Schnittebenen wurden dokumentiert und für die jeweilige Kultur ausgewählte Schnitte wurden mit einem großen Wägespatel auf vorgewärmte Membran-Einsätze (Millicell, PICM03050, Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten) in 6-Well-Platten mit je 1,2 ml Schnittkulturmedium überführt. Bei sagittalen Gewebekulturen wurden bis zu zwei Schnitte pro Einsatz platziert, bei frontalen Kulturen bis zu drei. Überflüssiges Medium wurde von der Membranoberfläche abgesaugt.

Für sagittal-frontale Kokulturen wurden zunächst wie oben beschrieben sagittale Gewebeschnitte von TH-GFP-Reporterermäusen angefertigt. Nach Entfernen der Agarose vom Schnitt wurde mit einem Skalpell der Hirnstamm direkt kaudal zur Substantia nigra abgesetzt. Dafür wurde die Stereolupe mit einem Fluoreszenzadapter (Royal blue, Nightsea, Lexington, Vereinigte Staaten) ergänzt um die Fluoreszenz der GFP-exprimierenden dopaminergen Neurone der Substantia nigra sichtbar zu machen. Die Gewebeschnitte wurden dann wie beschrieben auf Membraneinsätzen platziert. Anschließend wurden frontale Schnitte aus C57BL/6-Tieren angefertigt. Nach dem

Entfernen der Agarose wurde mit einem Skalpell der Caudate-Putamen-Komplex als quadratisches Gewebestück ausgeschnitten, ebenfalls auf den Membraneinsatz überführt und direkt an den abgesetzten Hirnstamm des sagittalen Schnittes angelegt.

Die Schnittkulturen wurden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium abgesaugt und durch 1 ml frisches Schnittkulturmedium ersetzt.

### **3.3.2 Immunfluoreszenzfärbung an sagittalen und frontalen Schnittkulturen**

Zum Fixieren von sagittalen und frontalen Schnittkulturen wurden die Membraninserts durch vorsichtiges Eintauchen in ein Becherglas mit PBS gewaschen und dann fixiert indem je 1 ml Fixierlösung auf und unter die Membran gegeben wurde. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4° C inkubiert und dann abermals durch Eintauchen in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gewebekulturen sofort gefärbt oder die Membran-Einsätze wurden bis zu einer Woche in Konservierungslösung bei 4° C gelagert.

Die sagittalen und frontalen Gewebekulturen wurden mit anhaftender Membran frei flottierend gefärbt. Dazu wurden die Gewebekulturen auf der Membran mit einem Skalpell aus dem Kunststoffeinsatz ausgeschnitten und in einer 24-Well-Platte gefärbt. Pro Well wurde ein Schnitt gefärbt. Die Gewebekulturen wurden mit einer Pinzette an der überstehenden Membran gefasst, um sie ohne Beschädigung in Wells mit frischer Färbe- oder Waschlösung zu überführen. Alle Inkubationen wurden unter langsamem Schwenken auf einem Schüttler ausgeführt. Zunächst wurden die Schnitte drei Mal für 10 Minuten in je 1 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte für 4 Stunden bei Raumtemperatur in 500 µl Blockierlösung inkubiert. Die Primärantikörper wurden in Färbelösung entsprechend Tabelle 2 verdünnt und die Schnitte wurden für 4 Tage bei 4° C in 300 µl Lösung inkubiert. Dann wurden die Schnitte für 15, 30 und 90 Minuten bei Raumtemperatur in 1 ml PBS gewaschen und dann mit in Färbelösung verdünnten Sekundärantikörpern (Tabelle 3) in 300 µl bei 4° C im Dunkeln für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 15, 30 und 90 Minuten bei Raumtemperatur in 1 ml PBS gewaschen und mit 300 µl 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)-Arbeitslösung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Schnitte drei Mal für 10 Minuten in 1 ml PBS gewaschen und in destilliertem Wasser auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden auf einer

Wärmeplatte bei 37° C trocknen gelassen bis die Membranen begannen sich weißlich zu verfärben und wurden dann mit Vectashield Hardset eingedeckt.

**Tabelle 2: Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemie**

<b>Antigen</b>	<b>Wirt</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Verdünnung</b>
Calbindin	Huhn	Synaptic systems, 214006	1:200
CD3	Ratte	Abcam ab11089	1:250
GFAP	Ziege	Sigma-Aldrich, SAB2500462	1:200
IBA1	Kaninchen	Wako, 019-19741	1:250
MAP2	Huhn	Abcam 5392	1:200
MBP	Ratte	Abcam ab7349	1:500
OLIG2	Kaninchen	Abcam, ab109186	1:200
PLP	Maus	Biorad, MCA8396	1:5000
TH	Schaf	Millipore, AB1542	1:500
VGLUT1	Kaninchen	Synaptic systems, 135303	1:200

**Tabelle 3: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemie**

<b>Antigen Primärantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Konjugation</b>
IgG (Huhn) Calbindin	Esel	Jackson Immunoresearch 703-225-155	1:200	Cy2
IgG (Huhn) MAP2	Ziege	Abcam ab150169	1:200	AlexaFluor 488
IgG (Kaninchen) IBA1, VGLUT1	Esel	Jackson Immunoresearch 711-166-152	1:400	Cy3
IgG (Maus) PLP	Esel	Jackson Immunoresearch 715-545-150	1:400	AlexaFluor 488
IgG (Ratte) CD3	Ziege	Vector Laboratories BA9400	1:200	Biotin
IgG (Ratte) MBP	Esel	Jackson Immunoresearch 712-165-153	1:500	Cy3
IgG (Schaf) TH	Esel	Jackson Immunoresearch 715-545-151	1:500	Cy3
IgG (Ziege) GFAP	Esel	Abcam ab150133	1:400	AlexaFluor 488

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (C1, Nikon, Minato, Japan) angefertigt. Die Intensität der einzelnen Kanäle wurde mit Hilfe der Software EZC1 FreeViewer (Nikon, Minato, Japan, Version 3.90) angepasst

und Helligkeit und Kontrast wurden für die Darstellung in der gedruckten Arbeit mit der Software Gimp (Version 2.10.14) optimiert.

### **3.3.3 Anlegen von cerebellaren organotypischen Schnittkulturen**

Zur Untersuchung des Myelinisierungsstatus von Purkinje-Zell-Axonon in Gewebekulturen wurden cerebellare Schnittkulturen angefertigt. Das oben beschriebene Protokoll zum Anlegen von Schnittkulturen und zur Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten Gewebeschnitten wurde dafür nach Meffre et al. [159] angepasst.

Für cerebellare organotypische Schnittkulturen wurden acht bis zehn Tage alte C57BL/6-Mäuse (Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung, Universitätsmedizin Rostock) verwendet.

Das Gehirn wurde wie oben beschrieben präpariert. Um den medialen Anteil des Cerebellums nicht zu beschädigen, wurde die Kalotte nicht durch einen mediosagittalen Schnitt, sondern durch zwei lateral gelegene Schnitte geöffnet. Nach der Überführung des Gehirns in vorgekühltes Präparationsmedium wurde das Vorderhirn mit einer Pinzette fixiert und das Cerebellum mit Hilfe einer gebogenen Pinzette vom restlichen Hirn getrennt. Meningen und Blutgefäße wurden mit sehr feinen Pinzetten vom Cerebellum entfernt.

Mit einem McIlwain Tissue Chopper (Ted Pella, Redding, Vereinigte Staaten) wurden 350 µm dicke sagittale Gewebeschnitte angefertigt. Da das Gewebestück relativ klein ist, war hierfür keine Agaroseeinbettung notwendig. Das geschnittene Gewebe wurde in eine Petrischale mit gekühltem Präparationsmedium gespült und unter einer Stereolupe mit Hilfe von zwei feinen Kanülen (27 G, 3/4 Zoll) wurden die einzelnen Schnitte voneinander getrennt ohne in das Gewebe einzustechen. Für die Kultur wurden Schnitte aus der Region des Vermis mit großem Anteil weißer Substanz ausgewählt und mit einer abgeschnittenen Plastikpasteurpipette auf vorgewärmte Membran-Einsätze (Millicell, PICM03050, Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten) in 6-Well-Platten mit je 1,2 ml Schnittkulturmedium überführt. Auf jedem Membran-Einsatz wurden fünf bis sieben Gewebeschnitte platziert, danach wurde Medium auf der Membran abgesaugt. Nach Abschluss der Präparation wurde das Medium abgesaugt und durch 1 ml frisches Schnittkulturmedium ersetzt.

Die Schnittkulturen wurden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurden 0,5 ml Medium pro Well abgesaugt und durch frisches Schnittkulturmedium ersetzt.

### **3.3.4 Lysophosphatidylcholin-Behandlung von cerebellaren Schnittkulturen**

Cerebellare Schnittkulturen wurden am siebten Tag in Kultur zur Induktion einer Demyelinisierung mit LPC behandelt. Dafür wurde vorgewärmtes Schnittkulturmedium in 1:200-Verdünnung mit LPC-Stammlösung (Endkonzentration 0,5 mg/ml) beziehungsweise mit Chloroform-Methanol (1:1, Vehikel) versetzt. In den zu behandelnden Wells wurde das komplette Medium abgesaugt und mit 1 ml LPC- oder Vehikel-haltigem Medium ersetzt. Nach 16 h Inkubationszeit unter Kulturbedingungen wurden die Membran-Einsätze mit Schnittkulturen in eine frische 6-Well-Platte mit je 1 ml vorgelegtem vorgewärmtem Schnittkulturmedium überführt, anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 1 ml vorgewärmtes Schnittkulturmedium ersetzt.

### **3.3.5 Immunfluoreszenzfärbung an cerebellaren Schnittkulturen**

Zum Fixieren von Schnittkulturen wurden die Membraninserts zweimal mit PBS gewaschen indem je 1 ml PBS unter und auf die Membran pipettiert und wieder abgesaugt wurde. Dann wurde je 1 ml Fixierlösung auf und unter die Membran gegeben und 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierlösung wurde abgesaugt und anschließend drei Mal für 10 Minuten unter leichtem Schütteln wie oben beschrieben mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gewebekulturen sofort gefärbt oder die Membran-Einsätze wurden bis zu einer Woche in Konservierungslösung bei 4° C gelagert.

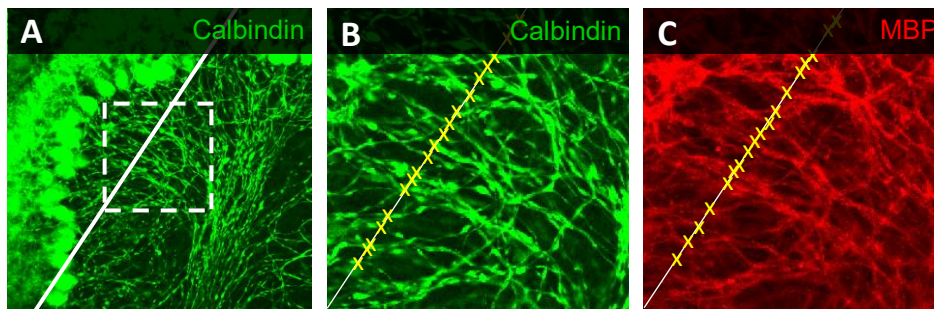
Nach der Lagerung in Konservierungslösung wurden die Membran-Einsätze kurz in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnittkulturen mit einem feinen Pinsel von der Membran gelöst und in 24-Well-Platten in 0,5 ml PBS gesammelt. Bis zu drei Schnittkulturen wurden zusammen in einem Well prozessiert. Zum Absaugen von Lösungen ohne Beschädigung der Schnittkulturen wurden Glas-Pasteurpipetten verwendet. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Die Schnitte wurden drei Mal für 10 Minuten in 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in 500 µl Blockierlösung inkubiert. Die Primärantikörper wurden in PBS-Gelatine-Triton X-Azid-Lösung (PBS-GTA) entsprechend Tabelle 2 verdünnt und die Schnitte wurden darin über Nacht bei 4° C inkubiert. Dann wurden die Schnitte drei Mal für 10 Minuten in 500 µl PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden in PBS-GTA entsprechend Tabelle 3

verdünnt und die Schnitte wurden darin über Nacht bei 4° C inkubiert. Nachdem abermals drei Mal zehn Minuten in PBS gewaschen wurde, wurden die Schnitte aus destilliertem Wasser auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen, bei Raumtemperatur trocknen gelassen und mit Immumount-Eindeckmedium eingedeckt.

### 3.3.6 Analyse des Myelinisierungsstatus an cerebellaren Schnittkulturen

Zur Auswertung des Myelinisierungsstatus in Schnittkulturen wurden von jedem Schnitt drei gut erhaltene Foliae des Kleinhirns an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (C1, Nikon, Minato, Japan, 40x/0,75 Nikon Plan Fluor Objektiv, Aufnahmesoftware EZ-C1 Version 3.30) digitalisiert. Alle Bilder wurden mit denselben Aufnahmeeinstellungen angefertigt und anschließend verblindet ausgewertet.



**Abbildung 7: Analyse des Myelinisierungsstatus an cerebellaren Schnittkulturen**

**A** Anhand der Calbindin-Markierung wurde manuell eine Linie in einem Folium definiert, die möglichst viele Axone schneidet. Das Quadrat markiert den in B und C vergrößerten Bereich. **B, C** In Calbindin- und MBP-Markierung wurden alle die Linie kreuzenden Fasern manuell markiert und ihre Anzahl ins Verhältnis zueinander gesetzt, um den Anteil myelinisierter Axone zu bestimmen.

Der Myelinisierungsstatus wurde nach der beschriebenen Methode von Meffre et al. [159] quantifiziert (Abbildung 7). Mit Hilfe der Software EZC1 FreeViewer (Nikon, Minato, Japan, Version 3.90) wurden der grüne und rote Bildkanal einzeln als tiff-Dateien exportiert und dann als Bilderstapel (Stack) in Fiji ([160], Version 1.52d) wieder zusammengefügt. Dann wurde im grünen Bild (Calbindin-Markierung) eine Linie quer durch ein Folium gelegt, so dass sie möglichst viele Calbindin-positive Axone schneidet um den Zählbereich festzulegen. In beiden Bildern wurde mit Hilfe des Cell Counter-Plugins manuell die Anzahl von Fasern ausgezählt, die die eingefügte Linie kreuzen. Anschließend wurde die Anzahl MBP-positiver Fasern zur Anzahl Calbindin-positiver Fasern ins Verhältnis gesetzt. Aus den drei Aufnahmen einer Schnittkultur wurde der Mittelwert der Verhältnisse gebildet, um den Myelinisierungsstatus des Schnittes zu ermitteln.

### 3.4 Durchflusszytometrische Analysen

Durchflusszytometrische Messungen erlauben die simultane Analyse mehrerer intra- und extrazellulärer Antigene auf dissoziierten Zellen. Die Antigene werden mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper markiert. Im Durchflusszytometer werden die markierten Zellen einzeln, aber mit sehr hohem Durchsatz analysiert. Durch die Verwendung von Fluorophoren mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissions-Spektren und entsprechenden Anregungslasern und Emissions-Detektoren lassen sich diverse Antigene auf derselben Zelle darstellen.

Zur Aufreinigung von peripheren Immunzellen aus neuronalem Gewebe wurden nach der Gewebedissoziation von Vorderhirn oder Rückenmark CD45-positive Zellen durch magnetische Zellseparation (magnetic cell separation, MACS) angereichert. CD45-positive Zellen wurden mit Antikörpern markiert, die mit magnetischen Partikeln gekoppelt waren und anschließend in einer magnetisierbaren Säule von nicht markierten Zellen getrennt.

#### 3.4.1 Perfusion und Gewebeentnahme

Die experimentellen Gruppen bestanden aus je fünf Tieren. EAE- und CupEAE-Tiere wurden in die Analyse aufgenommen sobald sie einen Score von mindestens 1 entwickelt hatten. Pro Messtag wurde Gewebe von drei bis vier Tieren parallel aufgearbeitet. Dabei wurden immer mindestens ein Kontrolltier, ein EAE-Tier und ein CupEAE-Tier pro Tag verwendet, um tägliche Schwankungen in der Aufarbeitung und Färbung gleichmäßig auf diese Gruppen zu verteilen. Die Cup-Tiere wurden an zwei weiteren Messtagen aufgearbeitet.

Das Tier wurde durch intraperitoneale Injektion eines Ketamin-Xylazin-Gemisches (Ketamin 750 mg/kg, Xylazin 50 mg/kg) narkotisiert. Bei Reflexlosigkeit wurden Haut und Peritoneum der Maus am unteren Teil des Abdomens eröffnet, das Peritoneum bis zum Diaphragma durchtrennt und anschließend das Zwerchfell entfernt. Der Brustkorb wurde seitlich abgesetzt, am Herz ein kleiner Schnitt am rechten Atrium gesetzt und eine stumpfe Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Hierüber wurde das Tier manuell mit 20 ml PBS perfundiert.

Zur Entnahme von Rückenmark und Gehirn wurden Wirbelsäule und Schädel entnommen und auf Höhe des ersten Halswirbels voneinander getrennt. Der Schädel wurde vom Hinterhauptsloch ausgehend sagittal aufgeschnitten, die Kalotte entfernt und das Gehirn mit Hilfe eines Spatels entnommen. Das Vorderhirn wurde direkt vor

dem Cerebellum durch einen frontalen Schnitt vom Hirnstamm getrennt, sagittal geteilt und in kaltes PBS (4° C) überführt. Das Rückenmark wurde durch hydraulische Extrusion aus dem Wirbelkanal gespült [161]. Hierzu wurde die Wirbelsäule auf Höhe der Lendenwirbel abgesetzt und eine PBS-gefüllte Spritze (5ml) mit aufgesetzter Pipettenspitze (200 µl) wurde von kaudal in den Wirbelkanal eingeführt. Dann wurde das Rückenmark durch Injektion von PBS herausgespült und in kaltem PBS (4° C) gelagert.

### **3.4.2 Gewebeverdau**

Vor dem enzymatischen Verdau wurde das Gewebe mit einer Schere in etwa 1mm große Stücke zerteilt. Das Gewebe wurde in Zentrifugationsröhrchen mit Dissoziationslösung (10 ml je Rückenmark, 15 ml je halbiertem Vorderhirn) für 30 min im Wasserbad (37° C) inkubiert. Dabei wurden die Gewebestücke alle fünf Minuten durch fünfmaliges kräftiges Schütteln aufgeschüttelt.

Nach dem enzymatischen Verdau wurde die Dissoziationslösung durch ein Zellsieb (70 µm) gefiltert. Die Gewebereste wurden mit einem Spritzenstempel durch das Sieb gedrückt und mit 5 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) nachgespült. Nach diesem Schritt wurden die Zellsuspensionen der beiden halbierten Vorderhirne desselben Tieres wieder gemischt. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 370 g bei 4° C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 15 ml DMEM resuspendiert.

### **3.4.3 Aufreinigung CD45-positiver Zellen**

Die Lebend-Zellzahl in 1:5 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 370 g bei 4° C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 20 ml FACS-Puffer resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension abermals für fünf Minuten bei 370 g bei 4° C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet in Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Puffer (90 µl/1\*10<sup>7</sup> Zellen) resuspendiert. Dann wurden CD45-Mikrobeads zugegeben (10 µl/1\*10<sup>7</sup> Zellen) und für 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Dabei wurde die Zellsuspension alle fünf Minuten kurz durchmischt.

Die magnetische Separation erfolgte als Positivselektion automatisiert am autoMACS® Pro Separator (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) in dem Programm „Posselds“ mit Spülvorgängen zwischen den Proben (Programm „Rinse“). Das für die

Programmierung des Gerätes notwendige Gesamtvolumen der Lösungen wurde mit Hilfe einer Kolbenhubpipette näherungsweise bestimmt.

Nach der Separation wurde die Lebend-Zellzahl der Positivfraktion in 1:2 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### **3.4.4 Extra- und intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung**

Je Probe wurden Färbepanel A (Leukozytenmarker) und Färbepanel B (T-Zellmarker) an je  $1 \cdot 10^6$  Zellen gefärbt. Falls durch geringe Zellausbeute nach der Aufreinigung die Zellen hierfür nicht ausreichten, wurde die Menge eingesetzter Zellen und das Volumen aller verwendeter Färbelösungen halbiert. Für Rückenmarkproben von Cup-Tieren wurden wegen zu geringer Zellzahlen keine Färbungen durchgeführt, die Rückenmarkproben von Kontrolltieren wurden nur für Panel A gefärbt und Panel B konnte nur an 3 Rückenmarkproben von EAE-Tieren und 4 Rückenmarkproben von CupEAE-Tieren gefärbt werden.

Alle folgenden Zentrifugationen erfolgten bei 370 g für 5 Minuten bei 20° C.

Für die Lebend-Tot-Färbung wurde die Arbeitslösung durch 1:1000 Verdünnung aus Zombie Green- oder eFluor506-Stammlösung frisch angesetzt. Die zu färbende Zellzahl wurde in Rundboden-Röhrchen aliquotiert, durch Zentrifugation pelletiert, in 1 ml PBS resuspendiert, abermals pelletiert und in 100 µl Arbeitslösung resuspendiert. Die Zellen wurden 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 2 ml FACS-Puffer zugegeben, die Zellen wurden pelletiert, in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert und abermals pelletiert.

Zum Blockieren von unspezifischen Bindungen wurden die Proben in 90 µl Blockierlösung resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Antikörper für extrazelluläre Färbungen eines Panels wurden entsprechend Tabelle 4 mit FACS-Puffer auf die zehnfache Arbeitskonzentration verdünnt. Dann wurden jeder Probe 10 µl Antikörperlösung zugegeben, gemischt und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 1 ml FACS-Puffer zugegeben, die Zellen wurden pelletiert und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert.

Für die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen vor der Markierung intrazellulärer Antigene wurden Fixierlösung und Permeabilisierungspuffer frisch angesetzt. Die Zellen wurden pelletiert, in 1 ml Fixierlösung resuspendiert und 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dann wurden 2 ml FACS-Puffer zugegeben, die Zellen pelletiert, in 2 ml

FACS-Puffer resuspendiert, abermals pelletiert, in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4° C gelagert. Am nächsten Tag wurden 2 ml Permeabilisierungspuffer zugegeben, die Zellen pelletiert, in 2 ml Permeabilisierungspuffer resuspendiert und abermals pelletiert.

**Tabelle 4: Markierungen für durchflusszytometrische Analysen**

<b>Markierung</b>	<b>Hersteller Bestellnummer</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Menge für 1*10<sup>6</sup> Zellen</b>
<b>Panel A</b>			
Zombie Green	BioLegend, 423112		
CD3 - Brilliant Violet 711	BioLegend, 101320	extrazellulär	0,25 µg
B220 - Brilliant Violet 421	BioLegend 103239	extrazellulär	0,25 µg
CD11c - PE	BioLegend 117307	extrazellulär	0,25 µg
Ly-6C - APC	BioLegend 128015	extrazellulär	0,125 µg
CD68 - Brilliant Violet 605	BioLegend 137021	intrazellulär	0,25 µg
CD45 - APC/Fire 750	BioLegend 147713	extrazellulär	0,25 µg
<b>Panel B</b>			
eFluor506	eBioScience 65-0866-14		
CD4 - Brilliant Violet 750	BioLegend 100457	extrazellulär	0,25 µg
CD8a - Alexa Flour 488	BioLegend 100726	extrazellulär	0,5 µg
FOXP3 - Brilliant Violet 421	BioLegend 126419	intrazellulär	1 µg
CD95 (Fas) - PE	BioLegend 152607	extrazellulär	0,125 µg
Granzyme B - APC/Fire 750	BioLegend 372209	intrazellulär	0,5 µg
T-bet - PE/Dazzle 594	BioLegend 644827	intrazellulär	2 µg
GATA3 - APC	BioLegend 653805	intrazellulär	0,5 µg
RORyt - PerCP-Cy 5.5	BD Biosciences 562683	intrazellulär	2 µg

Zum Blockieren von unspezifischen Bindungen wurden die Proben in 60 µl Blockierlösung resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Antikörper für intrazelluläre Färbungen eines Panels wurden entsprechend Tabelle 4 mit Permeabilisierungspuffer auf die 2,5fache Arbeitskonzentration verdünnt. Dann wurden jeder Probe 40 µl Antikörperlösung zugegeben, gemischt und 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Permeabilisierungspuffer zugegeben und die Zellen wurden pelletiert und in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen für die Messung am Durchflusszytometer in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert.

### 3.4.5 Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am BD FACSAria IIIu (BD Biosciences, San Jose, USA) in der Core Facility für Zellsortierung und -analyse der Universitätsmedizin durchgeführt. Aufgrund zum Teil hoher Debris-Anteile wurde statt einer festgelegten Zahl von Ereignissen das gesamte Probevolumen gemessen.

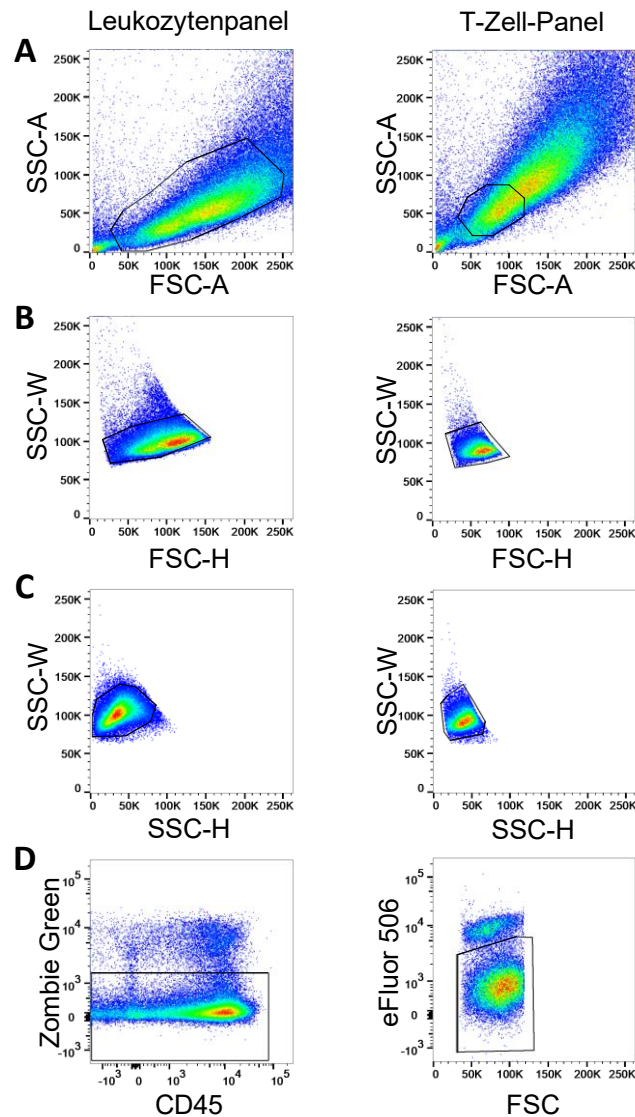
Vor Beginn des Versuches wurden mit Hilfe von Einzelfärbungen aller Antikörper an Proben aus Rückenmark und Vorderhirn von EAE-Mäusen sowie Zellen aus Milzen und Lymphknoten die optimalen Färbekonzentrationen ermittelt sowie vorläufige Kompensationsmatrizen erstellt.

### 3.4.6 Auswertung durchflusszytometrischer Daten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse wurde mit FlowJo (Version 10.6.2, Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten) angefertigt. Zunächst wurde die vorläufige Kompensationsmatrix manuell geprüft und optimiert. Dafür wurden alle Kombinationen von Fluoreszenzparametern im Dotplot dargestellt und Verschiebungen der Punktwolken durch Anpassen der Kompensationsmatrix korrigiert.

Ausgangspunkt der Analysen war die Definition von lebenden Einzelzellen (Abbildung 8). Dafür wurden im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (forward scatter, FSC; side scatter, SSC) die zu analysierenden Zellen nach ihrer Zellgröße und -granularität ausgewählt. Die Messwerte für FSC werden als Fläche unter der Signalkurve (area, FSC-A), als höchster Punkt der Signalkurve (height, FSC-H) und als Breite der Signalkurve (width, FSC-W) aufgenommen. Ebenso wird für SSC verfahren.

Zur Abgrenzung der relevanten Zellpopulation wurde zunächst anhand von FSC-A und SSC-A für die Färbungen im Leukozytenpanel A ein relativ großer Bereich gewählt, der alle Leukozytenpopulationen umfasst (Abbildung 8 A). Für die Färbungen des T-Zell-Panels B wurde der Bereich auf die Größe und Granularität von Lymphozyten beschränkt (Abbildung 8 B). Zum Ausschluss von Dubletten wurden anschließend Messereignisse mit hohen Werten für FSC-H, FSC-W, SSC-H und SSC-W ausgeschlossen. Dann wurden Zombie Green- bzw. eFluor506-positive Zellen als tot von der folgenden Analyse ausgeschlossen. Die so definierten Populationen lebender Einzelzellen waren Grundlage für alle folgenden Analysen.



#### Abbildung 8: Definition von lebenden Einzelzellen für die durchflusszytometrische Auswertung

Die Definition von lebenden Einzelzellen war Grundlage für alle weiteren Quantifizierungen der durchflusszytometrischen Messergebnisse. **A** Die Größe und Granularität von relevanten Zellen wurde im FSC-A und SSC-A (Vorwärts- und Seitwärtsstreuung) festgelegt. **B, C** Zum Dublettenausschluss wurden hohe Werte für FSC-H, FSC-W sowie SSC-H und SSC-W ausgeschlossen. **D** Lebende Zellen wurden als Zombie Green- bzw. eFluor506-negativ definiert.

Die Auswahl von Zellpopulationen für die Quantifizierung (Gating) wurde für die Proben aus Rückenmark und Vorderhirn separat vorgenommen. Innerhalb dieser Gruppen wurden die gleichen Parameter auf alle Proben angewandt. Da aber die Farbeintensität durch die Färbung der Proben an verschiedenen Messtagen leicht schwankte und die Zellpopulationen zum Teil eng beieinander lagen, war bei folgenden Proben in Panel B eine manuelle Anpassung der Zellauswahl nötig: bei Rückenmarkproben bei drei eFluor506-Färbungen (zwei EAE-Proben, eine CupEAE-Probe) und zwei CD4- Färbungen (eine EAE-Probe, eine CupEAE-Probe) und bei Vorderhirnproben bei vier Zombie Green- Färbungen (drei Kontrollproben und eine CupEAE-Probe) und zwei CD4- Färbungen (eine EAE-Probe, eine CupEAE-Probe).

Die Färbeergebnisse für CD95, CD11c, T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ T und FOXP3 führten nicht zu klar abgrenzbaren Zellpopulationen und werden deshalb in dieser Arbeit nicht dargestellt.

### **3.5 Histologische Methoden**

Unter Immunhistochemie versteht man die spezifische Darstellung einzelner Antigene mit Hilfe von Antikörpern in histologischen Schnittpräparaten. Hier wurde die indirekte Avidin-Biotin-Methode angewandt. Das Antigen wird dabei von einem Primärantikörper spezifisch gebunden. Dann wird der Primärantikörper durch einen Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Anschließend wird ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, das aufgrund der hohen Affinität zwischen Biotin und Avidin an die Antikörper-Komplexe bindet. Die Peroxidase katalysiert bei Zugabe des Substrates 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) dessen Oxidation zu einem unlöslichen farbigen Niederschlag. Alternativ wurden für Fluoreszenzmarkierungen Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Bei Verwendung von Primärantikörpern aus unterschiedlichen Wirtsspezies lassen sich mehrere Antigene im selben Schnitt darstellen, um Kollokalisierungen dieser Antigene zu analysieren.

#### **3.5.1 Perfusion und Gewebeentnahme**

Die Perfusion des Tieres begann wie unter 3.4.1 beschrieben. Nach der manuellen Perfusion mit 20 ml PBS wurde ebenfalls manuell mit 30 ml Perfusionslösung perfundiert. Anschließend wurde eine Schlauchpumpe (IPC-4, IsmaTec, Wertheim, Deutschland) angeschlossen und mit einer Flussrate von etwa 22 ml/min weitere 7 Minuten mit Perfusionslösung perfundiert. Postnatale Mäuse (postnataler Tag (P) 5) wurden manuell mit 5 ml PBS und dann 10 ml Perfusionslösung ohne anschließende Perfusion via Schlauchpumpe perfundiert.

Der Kopf wurde mit einer Schere auf Höhe des ersten Halswirbels von der Wirbelsäule getrennt, die Haut über dem Schädel wurde aufgeschnitten und die Kalotte vom Hinterhauptloch ausgehend sagittal mit einer kleinen Schere eröffnet um die Gehirnoberfläche freizulegen. Der gesamte Kopf wurde dann in Perfusionslösung über Nacht bei 4° C nachfixiert. Dann wurde das Gehirn entnommen.

Fell und Muskeln des Rückens wurden von der Wirbelsäule entfernt, die Rippen wurden wirbelnah abgeschnitten und die Wirbelsäule wurde oberhalb des Beckens abgesetzt. Die Wirbelsäule wurde möglichst sorgfältig von Weichgewebe freipräpariert, in drei Abschnitte geteilt und in Gewebekassetten überführt. Die Gewebekassetten wurden für

6-12 Stunden unter laufendem Leitungswasser gespült und dann zwei Tage bei 37° C in Entkalkifizierungslösung inkubiert. Nach einem Tag wurde die Lösung gewechselt.

### **3.5.2 Kryoeinbettung und -schnitte**

Die Gehirne von TH-GFP-Reportermausen und Wildtypieren zur TH-Markierung wurden kryokonserviert und gefroren geschnitten.

Das fixierte Gehirn wurde über Nacht bei 4° C in Kryoprotektionslösung inkubiert. Dann wurde das Gehirn in Isopentan mit einer Temperatur von -80° C eingefroren, mit TissueTek®-Einbettmedium eingebettet und am Kryostaten (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in sagittaler Ausrichtung mit einer Schnittdicke von 30 µm geschnitten. Die Schnitte wurden in einer 24-Well-Platte in je 1 ml PBS aufgenommen.

### **3.5.3 Immunfluoreszenzmarkierung von Tyrosinhydroxylase**

Die 30 µm dicken sagittalen Schnitte wurden frei flottierend in 24-Well-Platten gefärbt. Alle Inkubationen wurden unter langsamem Schwenken auf einem Schüttler ausgeführt. Zum Wechsel der Arbeitslösung wurde der Schnitt mit einem feinen Pinsel in ein Well mit frischer Lösung überführt.

Zunächst wurden die Schnitte drei Mal für 10 Minuten in je 1 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in 500 µl Blockierlösung inkubiert. Der Primärantikörper wurde in Färbelösung entsprechend Tabelle 2 verdünnt und die Schnitte wurden über Nacht bei 4° C in 300 µl Lösung inkubiert. Dann wurden die Schnitte drei Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1 ml PBS gewaschen und dann mit in Färbelösung verdünntem Sekundärantikörper (Tabelle 3) in 300 µl bei 4° C im Dunkeln über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte drei Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1 ml PBS gewaschen und mit 300 µl DAPI-Arbeitslösung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Schnitte drei Mal für 10 Minuten in 1 ml PBS gewaschen und in destilliertem Wasser auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden auf einer Wärmeplatte bei 37° C trocknen gelassen und wurden dann mit Vectashield Hardset eingedeckt.

Schnitte von TH-GFP-Reportermausen wurden nicht mit Antikörpern markiert, sondern wie oben beschrieben mit DAPI-Arbeitslösung inkubiert, auf Objektträger aufgezogen und eingedeckt.

### 3.5.4 Paraffineinbettung und -schnitte

Zur immunhistochemischen Färbung von CD3 und für histologische Färbungen wurden Rückenmark und Gehirn in Paraffin eingebettet.

Das fixierte Gewebe wurde in Gewebekassetten überführt. Die Gewebekassetten wurden für 6-12 Stunden unter laufendem Leitungswasser gespült und dann über Nacht bei 4° C in 50% Ethanol inkubiert. Anschließend erfolgte die manuelle Dehydrierung nach Tabelle 5 und das Einbetten in Paraffinblöcke. Abgesehen von der Inkubation in Paraffin erfolgte die Dehydrierung bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln.

**Tabelle 5: Dehydrierung und Paraffinierung von fixiertem Gewebe**

Schritt	Dauer
70% Ethanol	40 Minuten
70% Ethanol	40 Minuten
96% Ethanol	40 Minuten
96% Ethanol	40 Minuten
100% Ethanol	40 Minuten
100% Ethanol	40 Minuten
100% Ethanol	60 Minuten
Xylol	40 Minuten
Xylol	40 Minuten
Xylol	40 Minuten
Paraffin (65° C)	60 Minuten
Paraffin (65° C)	60 Minuten
Paraffin (65° C)	2 Tage

Nach der Einbettung wurden an einem Rotationsmikrotom (RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) 5 µm dicke frontale Schnitte der murinen Hirne auf Höhe des rostralen Hippocampus bzw. Querschnitte des Rückenmarks in der Wirbelsäule angefertigt. Die Schnitte wurden im Wasserbad bei 42-45° C gestreckt, je zwei Schnitte wurden auf einen Superfrost Plus Objektträger aufgezogen und bei 37° C in einem Wärmeschrank über Nacht getrocknet.

### 3.5.5 Immunhistochemische Markierung von CD3

Alle Färbungen, die direkt miteinander verglichen wurden, wurden gleichzeitig in einem Arbeitsgang hergestellt.

Die Objektträger wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entsprechend Tabelle 6 entparaffiniert und rehydriert.

Tabelle 6: Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten

Schritt	Dauer
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten
Xylol/Ethanol 1:1	5 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
70% Ethanol	3 Minuten
50% Ethanol	3 Minuten
Destilliertes Wasser	3 Minuten

Zum Freilegen maskierter Antigene wurden die Objektträger in Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer in einer Mikrowelle 10 Minuten gekocht und dann in einem Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt.

Für alle folgenden Inkubationen wurden je 100 µl des jeweiligen Reagenz mit einer Pipette auf die liegenden Objektträger aufgetropft und in einer feuchten Kammer inkubiert. Zwischen diesen Schritten wurden die Objektträger je drei Mal für fünf Minuten unter leichtem Schütteln in Küvetten mit PBS gewaschen.

Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation der Schnitte mit Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Es wurde ohne Waschen mit der Inkubation des in Blockierlösung verdünnten Primärantikörpers (Tabelle 2) bei 4° C über Nacht fortgeföhren.

Die Schnitte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper (Tabelle 3) inkubiert. Zum Reduzieren intrinsischer Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte 30 Minuten in 0,35% Wasserstoffperoxid in PBS in Glasküvetten im Dunkeln inkubiert. Der Avidin-Biotin-Enzymkomplex wurde mindestens 30 Minuten vor Verwendung angesetzt. Die Schnitte wurden dann damit 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Chromogenreaktion wurden die Schnitte 10 Minuten mit DAB-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser getaucht und dann 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült.

Danach wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entsprechend Tabelle 7 entwässert und mit Depex eingedeckt.

**Tabelle 7: Dehydrierung von gefärbten Paraffinschnitten**

<b>Schritt</b>	<b>Dauer</b>
Destilliertes Wasser	3 Minuten
50% Ethanol	3 Minuten
70% Ethanol	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
Xylol/Ethanol 1:1	5 Minuten
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten

### **3.5.6 Histochemische Färbungen**

Zur Darstellung der Myelinisierung des Rückenmarks wurde eine Luxol Fast Blue (LFB)-Färbung mit Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) kombiniert. Bei der LFB-Färbung handelt es sich um eine Differenzierungsfärbung, in der Myelin zunächst überfärbt wird und dann durch wiederholte Differenzierung bis zur gewünschten Farbeintensität entfärbt wird. Zur Gegenfärbung nach immunhistochemischer Färbung wurde außerdem eine Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung angewandt.

#### LFB-PAS-Färbung

Die histologischen Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entsprechend Tabelle 6 in 96% Alkohol überführt. Dann wurden die Schnitte in LFB-Färbelösung bei 56° C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte durch kurzes Eintauchen in 96% Ethanol und destilliertes Wasser gespült. Die Schnitte waren nun mit LFB überfärbt. Zum Differenzieren wurden die Schnitte für 10 Sekunden in frisch anzusetzende Lithiumcarbonat-Lösung getaucht und 10 Minuten in 70% Ethanol geschwenkt. Zum Unterbrechen der Differenzierung wurden die Schnitte in destilliertes Wasser gegeben. Dieser Ablauf wurde mehrfach wiederholt bis die Schnitte bei mikroskopischer Kontrolle die gewünschte Farbeintensität aufwiesen. Zur Feinjustierung wurde bei Annähern an die gewünschte Intensität Lithiumcarbonatlösung mit halber Konzentration verwendet. Geringe Abweichungen der Schnittdicke führten

dazu, dass alle Schnitte einzeln mikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls unterschiedlich oft und lange differenziert werden mussten, um ein einheitliches Färbeergebnis zu erreichen.

Die Schnitte wurden dann 2 Minuten in Periodsäure-Lösung inkubiert, durch Eintauchen in destilliertes Wasser gespült und dann in Schiff'schem Reagenz inkubiert. Die Reaktionszeit betrug je nach Alter der Färbelösung 45 Sekunden bis 10 Minuten und wurde im Voraus anhand von Testschnitten festgelegt. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten unter laufendem Leitungswasser gewaschen, kurz in destilliertes Wasser getaucht und dann in Mayer's Hämalaun-Lösung gegengefärbt. Hier variiert die Färbezeit je nach Alter der Lösung zwischen 5 und 20 Sekunden. Die Schnitte wurden für 3 Sekunden in HCl-Alkohol eingetaucht und dann 5 Minuten unter laufendem Leitungswasser gebläut. Danach wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entsprechend Tabelle 7 entwässert und mit Depex eingedeckt.

#### HE-Färbung

Zur Gegenfärbung von Rückenmarkschnitten nach immunhistochemischer Markierung von CD3 wurde eine HE-Färbung mit geringer Färbeintensität durchgeführt. Im Anschluss an die Chromogenreaktion wurden die Schnitte für 30 Sekunden in Mayers Hämalaunlösung gegengefärbt, etwa 3 Sekunden in HCl-Alkohol entfärbt und 15 Minuten unter laufendem Leitungswasser gebläut. Dann wurden die Schnitte 3 Sekunden in Eosin-Lösung gefärbt, kurz in destilliertem Wasser gespült und dann in 70% Ethanol unter leichtem Schütteln differenziert bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entsprechend Tabelle 7 entwässert und mit Depex eingedeckt.

#### **3.5.7 Bildaquisition und Quantifizierung**

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop DM6 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Die Aufnahmen des Rückenmarks wurden mit dem Merge-Modus der Aquisitionsoftware Leica Application Suite X (Version 3.7.0.20979) aus Einzelbildern zusammengesetzt. Zur Darstellung in der gedruckten Arbeit wurden Helligkeit und Kontrast mit der Software Gimp (Version 2.10.14) optimiert.

Zur Auswertung der LFB-PAS-Färbung des Rückenmarks wurde zunächst mit Hilfe der Software Fiji (160, Version 1.52d) manuell der Umriss des Rückenmarks markiert, um die Gesamtfläche zu bestimmen, dann wurden manuell alle demyelinisierten Bereiche

mit massiven Zellinfiltraten markiert, deren Flächen addiert und ins Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt. Von jedem Tier lagen drei Schnitte des Rückenmarks auf verschiedenen Segmentebenen vor, deren Quantifizierungsergebnis gemittelt wurde und dann als Wert des Einzeltieres in die Auswertung einging (Kontrolle: n=3 Tiere, Cup: n=4, EAE: n=7, CupEAE: n=7).

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism (Version 8.3.0, GraphPad Software, LLC, San Diego, Vereinigte Staaten) durchgeführt.

Alle Gruppen wurden mit dem ROUT-Test (Falscherkennungsrate  $Q=1\%$ ) auf Ausreißer geprüft. Alle Ausreißer wurden aus der folgenden Analyse ausgeschlossen. Alle Gruppen wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test (Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$ ) auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurden mit dem zweiseitigem t-Test mit einem Signifikanzniveau von 95% auf signifikante Unterschiede getestet. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Mann-Whitney-Test mit einem Signifikanzniveau von 95% auf signifikante Unterschiede getestet. In allen Abbildungen ist der Signifikanzwert p folgendermaßen dargestellt:  $p \leq 0,05$  als \*,  $p \leq 0,01$  als \*\* und  $p \leq 0,001$  als \*\*\*. Im Text sind Messwerte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### **3.7 Beteiligung weiterer Experimentatoren**

Die magnetische Aufreinigung CD45-positiver Zellen und die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an den Geräten der Core Facility Zellsortierung und Zellanalyse der Universitätsmedizin Rostock unter Leitung von Frau Prof. Dr. Müller-Hilke unter Betreuung von Wendy Bergmann und Michael Müller.

Die Aufarbeitung von Proben für die Massenspektrometrie mittels Zentrifugenfiltersystem, die Messung am Massenspektrometer und die Proteinidentifizierung und –quantifizierung wurden von Dr. Stefan Mikkat von der Core Facility für Proteomanalyse der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

Die Entnahme von Cerebellum der Ratte für massenspektrometrische Analysen wurde von Prof. Dr. Oliver Schmitt (Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock) durchgeführt. Die Aufreinigung von Membranproteinen aus Rattenproben sowie eines Teils der Mausproben und die zweidimensionalen Gelelektrophoresen wurden von Antje Schumann (Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock) angefertigt.

Für immunhistochemische und histologische Färbungen wurden Schnitte von Kontrolltieren, Cup-Tieren, EAE-Tieren und CupEAE-Tieren aus dem Institut für Neuroanatomie der RWTH Aachen verwendet.

## 4 Ergebnisse

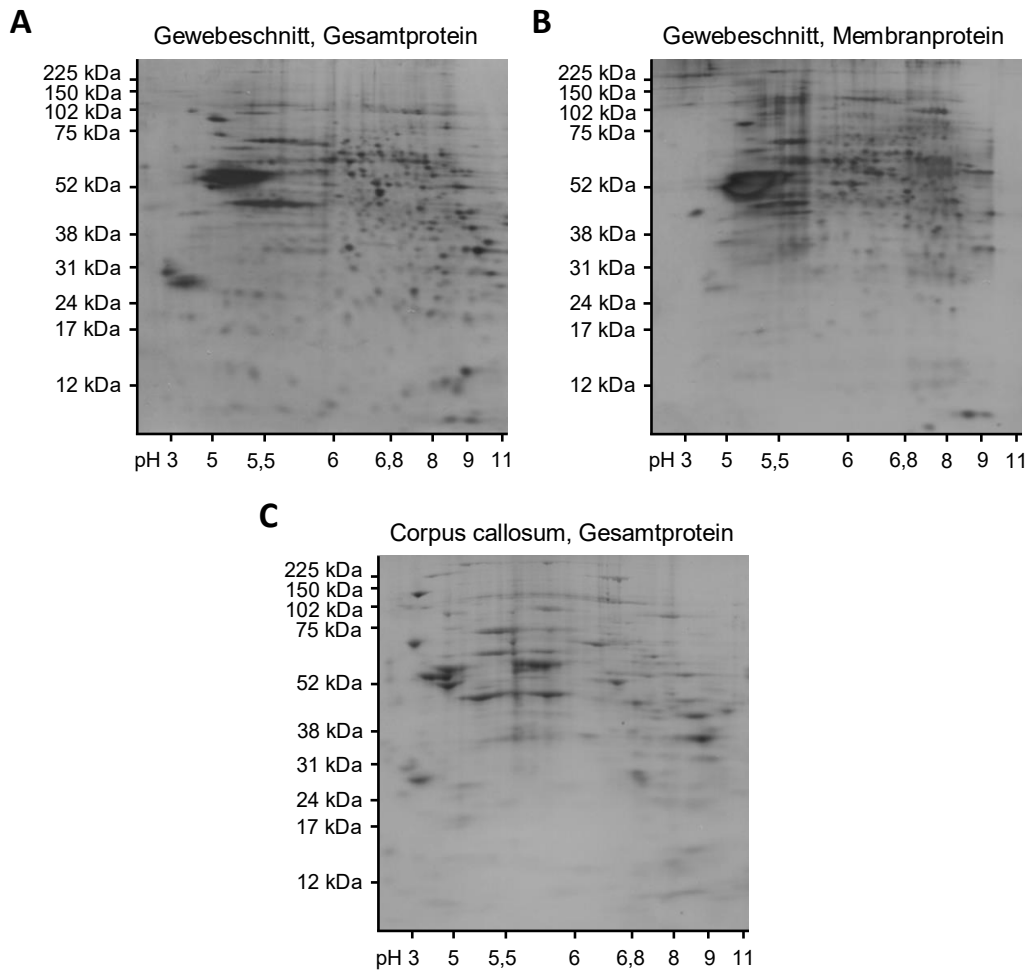
### 4.1 Nachweis von Proteinen des Myelinproteoms

**Können Myelinproteine insbesondere in kleinen Probenvolumina massenspektrometrisch quantifiziert werden, um Proteinprofile von Myelin zu untersuchen?**

Für eine massenspektrometrische Analyse müssen Myelinproteine spezifisch aufgereinigt werden. Dies wurde in dieser Arbeit durch Anreicherung von Membranproteinen in einem zweiphasigen Polymersystem erreicht. Neben Proteinen der Myelinmembranen werden dabei auch Proteine anderer biologischer Membranen, wie der Zellmembran, angereichert. Diese Methode wurde in diesem Projekt gewählt um eine große Bandbreite von Proteinen analysieren zu können. Die Spezifizierung von Myelinproteinen erfolgte während der Auswertung durch Abgleich mit einem publizierten Myelinproteom.

Um die Robustheit der Membranproteinanreicherung bei geringen Probenmengen zu testen, wurden einzelne postnatale murine Gewebeschnitte (P5) mit einem Gewicht von etwa 20 mg verwendet. Die Gesamtproteinfraktion einzelner Gewebeschnitte wurde in zweidimensionaler Gelelektrophorese durch isoelektrische Fokussierung und Massentrennung aufgetrennt. Resultierende Gele demonstrieren diverse Proteine über einen breiten Größen- sowie pI-Bereich (Abbildung 9 A). Nach der Aufreinigung von Membranproteinen aus einem einzelnen Gewebeschnitt sind nach zweidimensionaler Auftrennung ebenfalls diverse distinkte Proteine vorhanden (Abbildung 9 B). Der Vergleich zeigt aber eine Verringerung der Anzahl nachgewiesener Proteine sowie der Größe vieler Proteinspots.

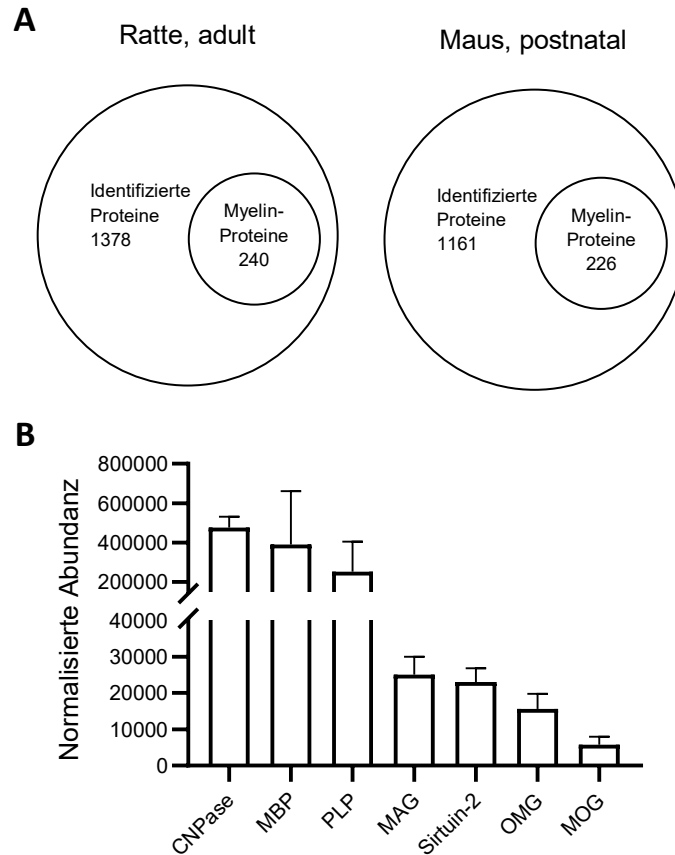
Zur Untersuchung von demyelinisierenden Prozessen im murinen Gehirn wird oft das Corpus callosum als ein massiver und isolierbarer Bereich weißer Substanz verwendet. Bei sorgfältiger Präparation ohne Kontamination mit kortikalem Gewebe lässt sich aus dem Gehirn einer adulten Maus weniger als 10 mg Corpus callosum isolieren, deshalb wurde für die zweidimensionale Auftrennung der Gesamtproteinfraktion das Gewebe von drei Tieren gepoolt. Nach zweidimensionaler Auftrennung lassen sich diverse Proteine voneinander abgrenzen (Abbildung 9 D), allerdings sind weniger Proteinspots zu erkennen als in den Proben ganzer Gewebeschnitte.



**Abbildung 9: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Corpus callosum und Gewebeschnitten**

**A** Die Gesamtproteinfraktion eines 350 µm dicken sagittalen Gewebeschnittes wurde in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. **B** Die aus einem einzelnen Gewebeschnitt aufgereinigten Membranproteine wurden in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. **C** Die Gesamtproteinfraktion des Corpus callosum von drei adulten Mäusen wurde in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt.

Zum massenspektrometrischen Nachweis von Myelinproteinen aus einer großen Probenmenge wurde die Membranproteinfraktion aus dem Cerebellum adulter Ratten angereichert und die enthaltenen Proteine mittels Flüssigkeitschromatographiegekoppelter Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert. 1378 Proteine wurden eindeutig identifiziert, davon gehören 240 zu dem von Jahn et al. [156] publizierten Myelin-Proteom (Abbildung 10 A). Unter anderem konnten die gängigen Myelin-Markerproteine CNPase, MBP, PLP, MAG, Sirtuin-2, Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein (OMG) und MOG quantifiziert werden (Abbildung 10 B).



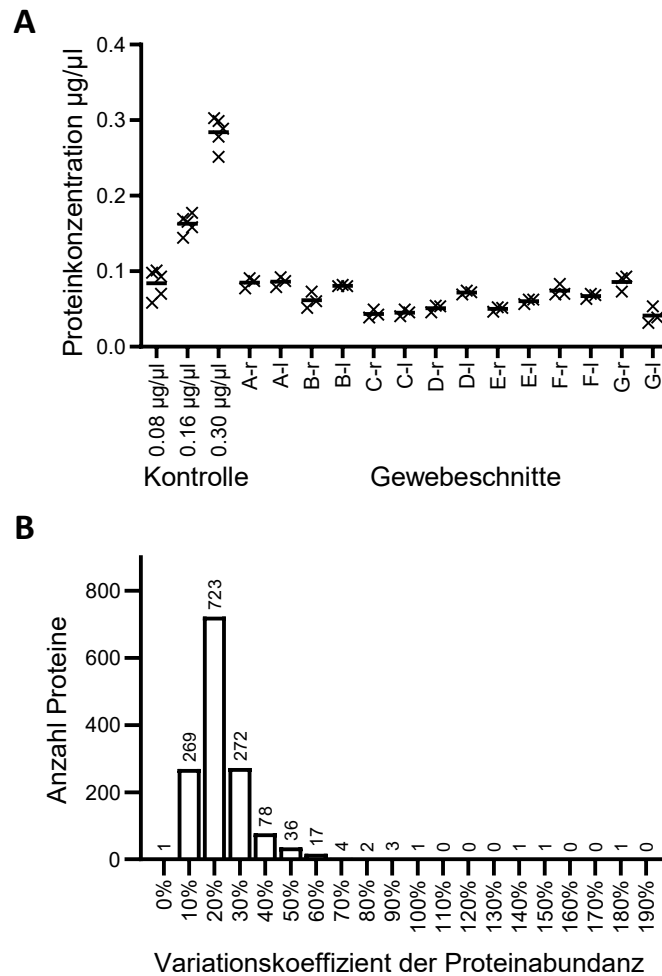
#### Abbildung 10: Massenspektrometrischer Nachweis von Myelinproteinen

Membranproteine wurden mit der Aufreinigung nach Schindler aus dem Cerebellum adulter Ratten und aus Gewebeschnitten postnataler Mäuse angereichert und massenspektrometrisch identifiziert. **A** Die identifizierten Proteine wurden mit dem Myelin-Proteom nach Jahn et al. abgeglichen. **B** Gängige Myelin-Markerproteine wurden im Cerebellum adulter Ratten nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=2).

Die gleiche Analyse wurde dann an den oben genannten einzelnen Gewebeschnitten postnataler Mäuse durchgeführt. Nach Membranproteinanreicherung konnten 1161 Proteine identifiziert werden, von denen 226 dem Myelin-Proteom nach Jahn et al. angehören. Diese Myelin-assoziierten Proteine waren überwiegend ubiquitär exprimierte Proteine des Stoffwechsels, des Zytoskeletts und anderer grundlegender Zellfunktionen. Von den oben genannten Myelin-Markerproteinen wurde nur Sirtuin-2 nachgewiesen.

Um die Robustheit der Anreicherungsmethode zu bewerten, wurden die Gewebeschnitte aus der gleichen Region der linken und rechten Hemisphäre von sieben Tieren aufgearbeitet. Nach der Aufreinigung von Membranproteinen wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Sie lag zwischen  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  und  $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Abbildung 11 A). Nach der massenspektrometrischen Bestimmung der normalisierten Proteinabundanz wurde der Variationskoeffizient als dimensionsloses Maß der Streuung um den Mittelwert für jedes Protein bestimmt. Der

Variationskoeffizient betrug  $23,1 \pm 12,4\%$ . Das 75%-Perzentil lag bei 26,2% (Abbildung 11 B).



**Abbildung 11: Robustheit der Membranproteinaufreinigung bei geringer Probenmenge**

**A** Die Proteinkonzentration nach Aufreinigung von Membranproteinen aus einzelnen sagittalen Gewebeschnitten wurde in technischen Triplikaten bestimmt. Als Kontrolle wurde ein Albuminstandard verwendet. Von jedem Tier (A-G) wurde je ein Gewebeschnitt aus der rechten und linken Hemisphäre mit dem gleichen Abstand zur Fissura longitudinalis cerebri verwendet. **B** Für alle identifizierten Proteine wurde die normalisierte Proteinabundanz in den Proben aus einzelnen Gewebeschnitten bestimmt. Die Variationskoeffizienten der normalisierten Proteinabundanz wurden für jedes Protein bestimmt und als Häufigkeitsverteilung dargestellt.

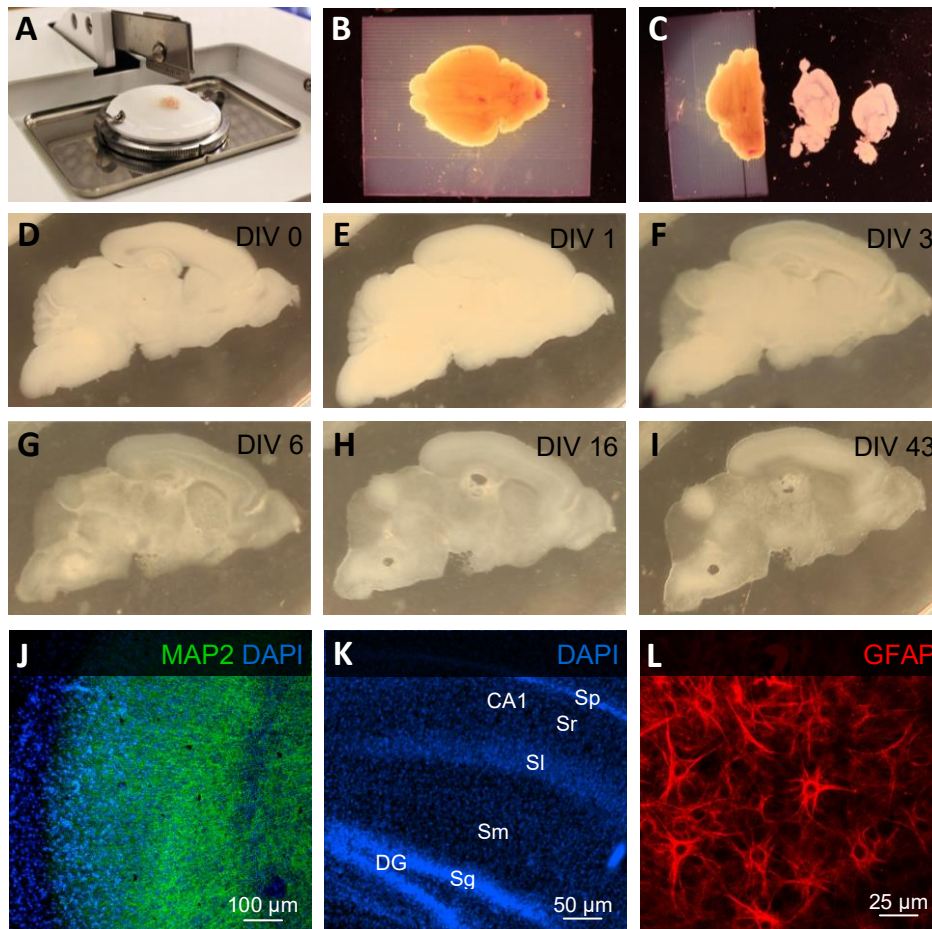
## 4.2 Gewebekulturen als Modell für Neurone und Oligodendrozyten

### Sind Gewebekulturen ein geeignetes Modellsystem zur Analyse von Myelinproteinen während der De- und Remyelinisierung?

Organotypische Schnittkulturen sind eine Methode zur Kultur von Gewebe in seiner physiologischen räumlichen Anordnung. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zum Anlegen von Schnittkulturen des murinen Gehirns etabliert. Insbesondere großflächige Schnittkulturen konnten bisher nur mit Hilfe eines Vibratoms angefertigt werden. Nach Agaroseeinbettung konnten solche Schnitte aber auch zeitsparend mit einem Tissue Chopper angefertigt werden (Abbildung 12 A). Die Stabilisierung durch Agarose ermöglichte das sagittale Schneiden von kompletten postnatalen murinen Gehirnen ohne dass die Schnitte an der Klinge festklebten und auseinandergerissen wurden (Abbildung 12 B). Die Schnitte ließen sich unter mikroskopischer Kontrolle ohne Beschädigung des Gewebes voneinander trennen und die Agaroseüberstände ohne Anhaften am Gehirn entfernen (Abbildung 12 C). Während der Kultur auf semipermeablen Membranen veränderte sich das makroskopische Erscheinungsbild der Gewebekulturen von hellem frischem Gewebe mit abgrenzbaren anatomischen Strukturen an Kulturtag 0 (day in vitro, DIV, Abbildung 12 D) zu trübem, aufgequollen wirkendem Gewebe an DIV 1 (Abbildung 12 E). Im weiteren Verlauf der Kultur wurde das Gewebe zunehmend transparenter und anatomische Strukturen zeichneten sich wieder ab (Abbildung 12 F-I). Bei fortschreitender Kulturdauer entwickelten sich gelegentlich Bereiche im Schnitt, die zunächst eintrübten und in denen dann das Gewebe unterging. Diese Bereiche lagen stets mittig im Schnitt, vorwiegend im Thalamus, Hirnstamm oder der hippokampalen Formation (in geringer Ausprägung in Abbildung 12 G-I).

Nach einer Kulturdauer von 43 Tagen wurden Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2)-positive Neurone und gliales fibrilläres saures Protein (GFAP)-positive Astrozyten immunhistochemisch markiert. Im Kortex war eine große Zahl MAP2-positiver, parallel ausgerichteter neuronaler Fasern vorhanden (Abbildung 12 J). Die Anordnung von Zellkernen in anatomischen Strukturen des Gehirns blieb weitestgehend erhalten, beispielsweise in Cornu ammonis und Gyrus dentatus der hippokampalen Formation (Abbildung 12 K). GFAP-positive Astrozyten mit typischer sternförmiger Morphologie ließen sich in verschiedenen Bereichen der Schnitte

nachweisen (Abbildung 12 L), insbesondere die Oberfläche der Schnitte war von GFAP-positiven Zellen bedeckt.



**Abbildung 12: Agaroseeinbettung zum Anfertigen von Gewebekulturen**

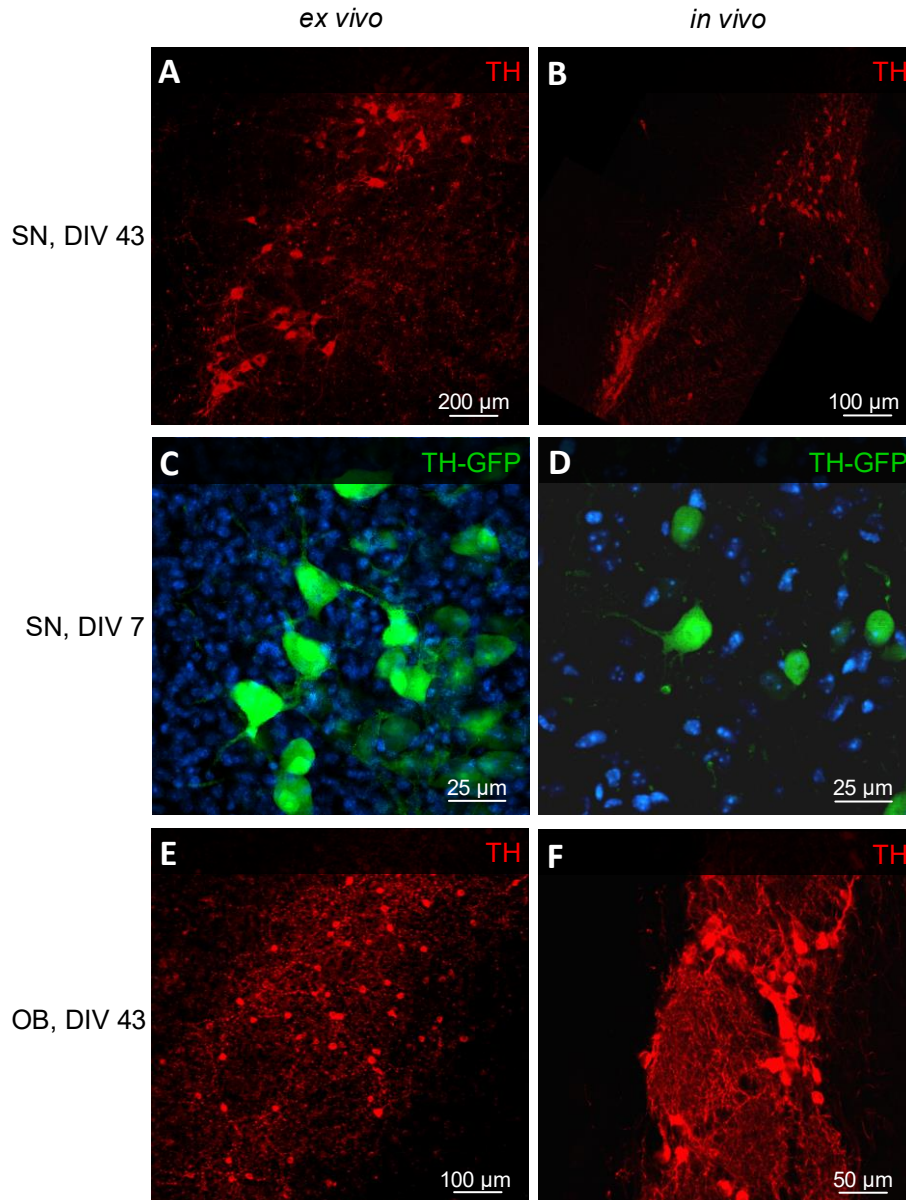
**A** Zum Anfertigen von Gewebeschnitten wurde ein murines Gehirn (P5) vor dem Schneiden in Agarose eingebettet. **B** Der Agaroseblock wurde in sagittaler Ausrichtung mit einem Tissue Chopper in 300  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten. **C** Die Gewebeschnitte wurden voneinander getrennt und in Kultur genommen. **D-I** Während der Kultur veränderte sich die makroskopische Erscheinung der Gewebeschnitte von weißlich trüb zu gräulich transparent. **J** Neuronale Strukturen im Kortex eines sagittalen organotypischen Gewebeschnittes nach 43 Tagen in Kultur wurden durch Immunfluoreszenzmarkierung von MAP2 dargestellt. **K** Die Struktur der hippocampalen Formation in sagittalen organotypischen Gewebekulturen war nach einer Kulturdauer von 43 Tagen erhalten. DG: Gyrus dentatus, CA1: Cornu ammonis Region 1, Sg: Stratum granulosum, Sm: Stratum moleculare, Sl: Stratum lacunosum, Sr: Stratum radiatum, Sp: Stratum pyramidale **L** Die Morphologie von Astrozyten in organotypischen Gewebekulturen wurde durch Immunfluoreszenzmarkierung von GFAP dargestellt.

#### 4.2.1 Sagittale organotypische Gewebekulturen

In sagittalen Gewebeschnitten sind Anteile von Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Pons und Medulla oblongata vorhanden. Sie bieten damit einen großen Überblick über das gesamte Gehirn in einem einzigen Modellsystem.

In sagittalen Gewebekulturen wurden nach 43 Tagen in Kultur die dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta (SN) durch immunhistochemische Markierung des Markerenzym TH nachgewiesen (Abbildung 13 A). Die TH-positiven

Zellen im Bereich des Mittelhirns bildeten zwei nahe beieinanderliegende Zellpopulationen. Diese Anordnung entsprach der von TH-positiven Zellen im Mittelhirn adulter Mäuse (Abbildung 13 B).



**Abbildung 13: Tyrosinhydroxylase-positive Neurone in sagittalen Gewebekulturen und *in vivo***  
**A, B** Immunfluoreszenzmarkierung von TH-positiven Zellen in organotypischen Gewebekulturen im Bereich der SN nach 43-tägiger Kultur und in der SN einer 94 Tage alten Maus **C, D** GFP-positive Neurone in Gewebekulturen und in der SN von 5 Tage alten TH-GFP-Reportermäusen **E, F** TH-positiv Zellen im Bulbus olfactorius (OB) nach 43 Tagen Kulturdauer und im OB einer 94 Tage alten Maus.

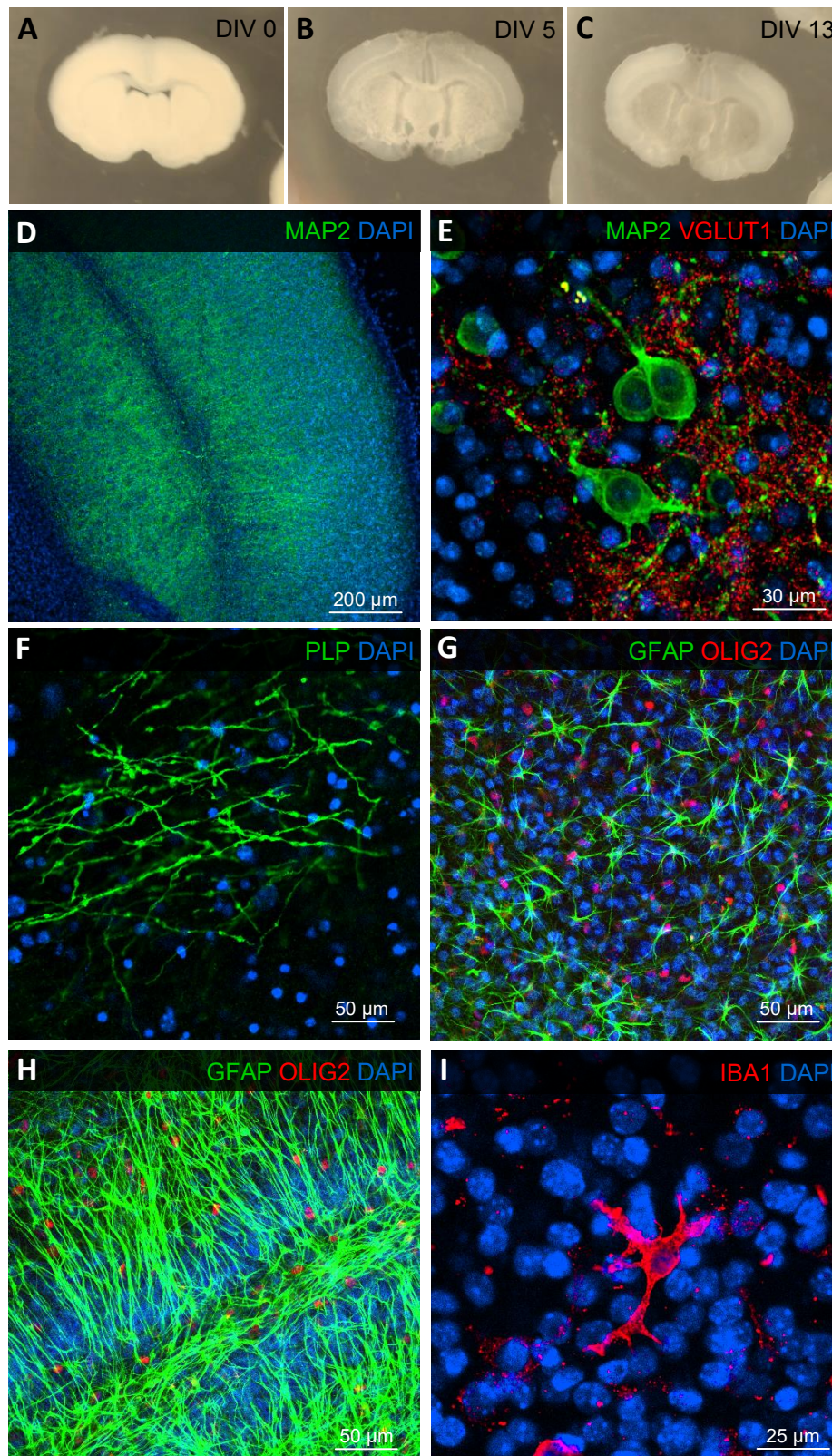
Es wurden außerdem Gewebekulturen von Mäusen angelegt, die GFP unter dem TH-Promotor exprimieren, um TH-positive Neurone während und nach der Kultur ohne immunhistochemische Markierung untersuchen zu können. GFP-positive Zellen im Bereich der SN besaßen nach einwöchiger Kultur eine neuronale Morphologie mit großen Perikarya und mehreren Fortsätzen (Abbildung 13 C). In Gefrierschnitten von

postnatalen Mäusen (P5) hatten GFP-positive Zellen der SN dieselbe Morphologie (Abbildung 13 D). Eine große Population TH-positiver Zellen existierte in organotypischen Gewebekulturen nach 43 DIV im Bulbus olfactorius (OB, Abbildung 13 E). Die Zellen lagen relativ homogen in der Randzone des OB vor und bildeten ein dichtes Netz TH-positiver Fortsätze. *In vivo* hingegen lagen TH-positive Zellen im OB entlang der Ränder von Glomeruli olfactorii (Abbildung 13 F).

#### 4.2.2 Frontale organotypische Gewebekulturen

Frontale Gewebekulturen eignen sich besonders für Analysen von Kortex, Corpus callosum und abhängig von der Schnittebene Caudate-Putamen-Komplex (CPu) oder Thalamus. Pro Tier lassen sich mehr Schnitte mit Corpus callosum anfertigen als in sagittaler Schneiderichtung und durch die geringere Größe ist die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen stabiler und es kommt seltener zu Gewebeuntergängen.

Frontale Gewebekulturen wurden ebenso wie sagittale Kulturen mit Hilfe von Agaroseeinbettung angelegt und für 13 Tage kultiviert. Der makroskopische Eindruck veränderte sich ebenso wie bei sagittalen Kulturen von milchig-trübem Aussehen in den ersten Kulturtagen zu gräulicher Transparenz des Gewebes mit sich deutlich abzeichnenden anatomischen Strukturen (Abbildung 14 A-C). Neuronale Fasern wurden durch MAP2-Markierung unter anderem im Kortex nachgewiesen (Abbildung 14 D). Zur Darstellung von Synapsen wurde vesikulärer Glutamat-Transporter 1 (VGLUT1), ein Protein in der Membran präsynaptischer Vesikel, in Kombination mit dem neuronalen Protein MAP2 immunhistochemisch markiert. In neuronreichen Bereichen, insbesondere angeordnet entlang MAP2-positiver Fasern, war eine große Dichte VGLUT1-positiver Vesikel vorhanden (Abbildung 14 E). Zur Beurteilung des Myelinisierungszustandes wurde das in der Myelinisierung früh exprimierte Myelin-Markerprotein PLP immunhistochemisch markiert. Im Kortex waren fokal begrenzte Areale mit PLP-positiven, überwiegend parallel ausgerichteten Fasern vorhanden (Abbildung 14 F). Auch in Bereichen weißer Substanz wie dem Corpus callosum oder den Fimbrien des Hippocampus ließen sich überwiegend schwach markierte PLP-positive Fasern nachweisen. Für einen weiteren Nachweis von Oligodendrozyten wurde das Protein Oligodendrozytentranskriptionsfaktor 2 (OLIG2), das von Oligodendrozytenprogenitorzellen und von reifen Oligodendrozyten exprimiert wird, immunhistochemisch markiert. Im Kortex (Abbildung 14 G) und im Bereich des Hippocampus (Abbildung 14 H) waren OLIG2-positive Zellen gleichmäßig im Gewebe verteilt.



**Abbildung 14: Frontale organotypische Gewebekulturen**

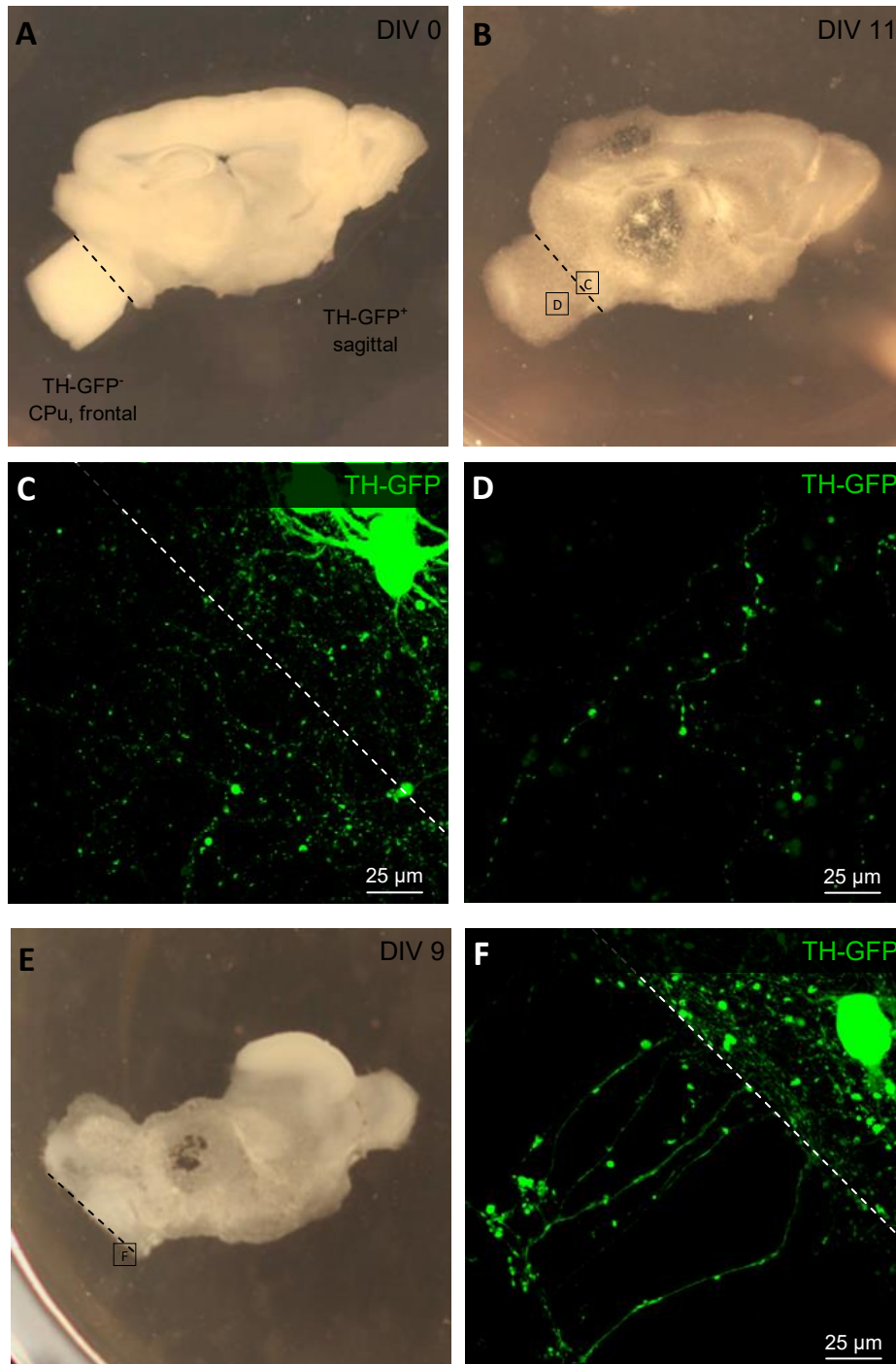
**A-C** Makroskopisches Erscheinungsbild frontaler organotypischer Gewebekulturen während zweiwöchiger Kultur **D** Neuronale Fasern im Kortex frontaler Gewebekulturen wurden nach 13 Tagen Kulturdauer durch Immunfluoreszenzmarkierung von MAP2 dargestellt. **E** Synapsenähnliche Strukturen entlang von MAP2-positiven Neuronen wurden durch Fluoreszenzmarkierung von VGLUT1 in Gewebekulturen dargestellt. **F** PLP-positives Myelin im Kortex von organotypischen Gewebekulturen **G** Im Bereich des Kortex von frontalen Gewebekulturen lagen OLIG2-positive Zellen und GFAP-positive Astrozyten vor. **H** Im Hippocampus zeigten GFAP-positive Zellen eine parallele Ausrichtung. **I** Immunfluoreszenzmarkierung von IBA1-positiven Mikroglia in organotypischen Gewebekulturen.

Zur Beurteilung der Astrozyten-Morphologie wurde GFAP immunhistochemisch markiert. Im Kortex lagen GFAP-positive Zellen in sternförmiger Morphologie vor (Abbildung 14 G), im Hippocampus hingegen bildeten sie den Gyrus dentatus senkrecht durchlaufende parallel ausgerichtete Fortsätze (Abbildung 14 H). Zur Darstellung von Mikroglia wurde eine immunhistochemische Markierung von ionisiertem Kalzium-bindendem Adaptermolekül 1 (ionised calcium-binding adapter molecule 1, IBA1) an Gewebekulturen durchgeführt. IBA1-positive Zellen mit amöboider Zellform waren vor allem auf der Schnittoberfläche vorhanden, während im Inneren des Schnittes IBA1-positive Zellen mit verzweigten Fortsätzen überwogen (Abbildung 14 I).

### **4.2.3 Sagittal-frontale organotypische Kokulturen**

Um das Auswachsen von neuronalen Fortsätzen während der Kultur in Gewebeschnitten zu untersuchen, wurde ein Ko-Kultursystem aus sagittal und frontal geschnittenem Gewebe verwendet. Sagittale Schnitte wurden aus TH-GFP-Reporter-mäusen angefertigt und der Hirnstamm wurde direkt kaudal zur SN abgesetzt. Aus frontalen Schnitten von Wildtyp-Mäusen wurde ein quadratisches Stück Gewebe aus dem CPu herausgeschnitten und direkt angrenzend an die Schnittkante an den sagittalen Schnitt angelegt und 11 Tage lang kultiviert. Anschließend wurde das Vorhandensein von GFP-positiven Fasern im Wildtypgewebe untersucht.

Makroskopisch ließ sich nach der Kultur kein Übergang mehr zwischen den kokultivierten Geweben erkennen (Abbildung 15 A und B). Die mikroskopische Auswertung ergab, dass im CPu-Gewebe in direkter Nähe zum Übergang eine hohe Dichte an GFP-positiven Fasern ohne erkennbare gerichtete Anordnung vorhanden waren (Abbildung 15 C). Vereinzelt waren auch noch in wenigen Millimetern Entfernung zur Schnittkante GFP-positive Fasern im CPu-Gewebe nachweisbar (Abbildung 15 D). Auch bei der Kultur eines sagittalen Gewebeschnittes nach Absetzen des Hirnstammes ohne das Anlegen eines alternativen Gewebeschnittes kam es zum Auswachsen von GFP-positiven Fasern direkt auf der semipermeablen Membran (Abbildung 15 E und F).



**Abbildung 15: Sagittal-frontale Kokultur von Gewebeschnitten**

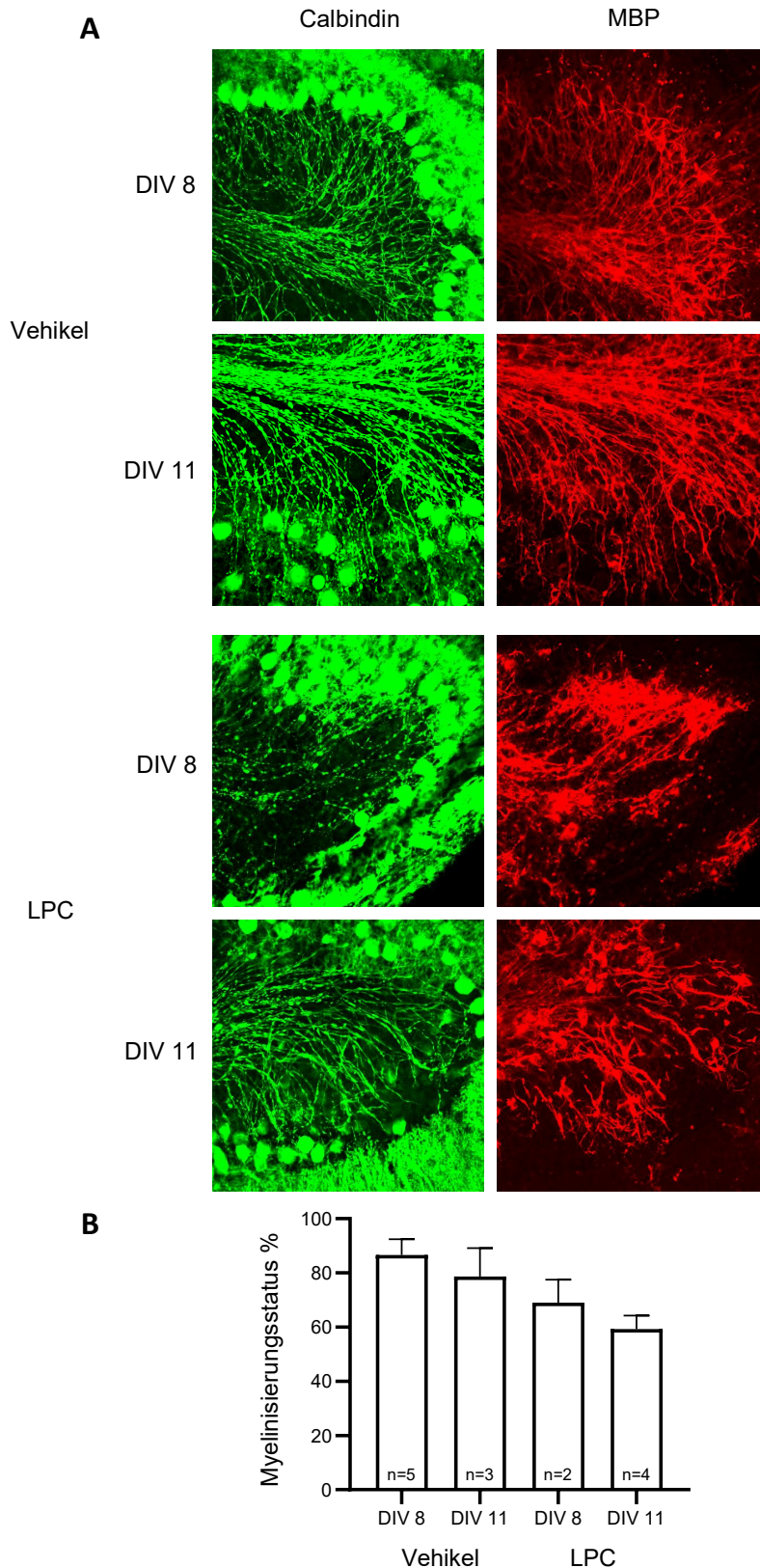
**A** Zur Untersuchung des Wachstums von TH-positiven neuronalen Fortsätzen wurden Kokulturen aus einem sagittalen Gewebeschnitt einer TH-GFP-Reportermaus und von CPu-Gewebe einer Wildtypmaus angelegt. Der Hirnstamm wurde posterior der SN entfernt (gestrichelte Linie) und ein zugeschnittenes Gewebestück aus dem CPu eines frontalen Schnittes wurde angrenzend positioniert. **B** Nach einer Kulturdauer von 11 Tagen wurden die Kulturen untersucht. Die Position von C und D sind in der Abbildung markiert. **C** TH-positiv Fasern hatten die Grenze zwischen beiden Geweben (gestrichelte Linie) überquert. **D** Einzelne Fasern waren in Entfernung zur SN vorhanden. **E** In sagittalen Kulturen wurde der Hirnstamm direkt posterior zur SN entfernt (gestrichelte Linie). Die Position von F ist in der Abbildung markiert. **F** TH-positiv Fortsätze wuchsen auf der semipermeablen Membran aus dem Gewebeschnitt heraus (gestrichelte Linie).

#### 4.2.4 Demyelinisierung in cerebellaren Gewebekulturen

Für die Untersuchung des Myelinisierungszustandes wurden die oben beschriebenen Protokolle für das Anlegen von Gewebekulturen angepasst. Eine geeignete Analyseregion ist das Cerebellum mit seinen parallel zueinander angeordneten myelinisierten Purkinje-Zell-Axonen. Wie in unter 4.1 auf Ebene des Proteoms gezeigt, ist die Myelinisierung bei jungen postnatalen Mäusen an P5 noch wenig ausgeprägt. In organotypischen Schnittkulturen von Mäusen an P5 bildet sich zwar nach einiger Zeit in Kultur Myelin (Abbildung 14 F), die Verteilung über den Schnitt ist aber heterogen und damit für Analysen nicht optimal. Deshalb wurden für die folgenden organotypischen Schnittkulturen postnatale Mäuse mit P8 bis P10 verwendet. Die cerebellaren organotypischen Schnittkulturen wurden an DIV 7 mit LPC behandelt, um die Demyelinisierung von Purkinje-Zell-Axonen zu induzieren. An DIV 8 und DIV 11 wurden die Kulturen fixiert und das Purkinje-Zell-Markerprotein Calbindin und das Myelinprotein MBP wurden immunhistochemisch markiert.

Durch die Markierung von Calbindin wurden Purkinje-Zellen des Stratum purkinjense als große, kräftig gefärbte Zellkörper mit stark verzweigtem Dendritenbaum im Stratum molekulare und einzeln liegenden, annähernd parallel ausgerichteten Axonen im Stratum granulosum sowie der weißen Substanz des Cerebellums dargestellt. Die Morphologie der Purkinje-Zellen unterschied sich nicht zwischen LPC-behandelten und unbehandelten Schnittkulturen. MBP-positive Fasern verliefen in unbehandelten Schnittkulturen kolokalisiert mit Purkinje-Zell-Axonen im Stratum granulosum und in der weißen Substanz des Cerebellums. In LPC-behandelten Schnittkulturen zeigten MBP-positive Fasern neben dieser Morphologie Unterbrechungen der MBP-Markierung sowie Verdickungen der MBP-positiven Fasern. Außerdem waren Zellkörper mit Kernaussparung ohne erkennbare Fortsätze MBP-positiv markiert (Abbildung 16 A).

Die Myelinisierung als Verhältnis aller Purkinje-Zell-Axone zu myelinisierten Fasern wurden an DIV 8 und DIV 11 quantifiziert. An DIV 8 lag das Myelinisierungsverhältnis von unbehandelten Gewebekulturen bei  $86,6\% \pm 5,9\%$ . LPC-behandelte Kulturen hatten ein Myelinisierungsverhältnis von  $69,0\% \pm 8,5\%$ . An DIV 11 war das Myelinisierungsverhältnis von unbehandelten Gewebekulturen  $78,7\% \pm 10,5\%$  und von LPC-behandelten Kulturen  $59,3\% \pm 5,0\%$  (Abbildung 16 B).



**Abbildung 16: LPC-Behandlung reduziert die Myelinisierung in organotypischen Schnittkulturen**  
 Organotypische cerebellare Schnittkulturen wurden an DIV 7 mit LPC behandelt. **A** An DIV 8 und DIV 11 wurden Purkinje-Zell-Axone durch immunhistochemische Markierung von Calbindin und Myelin durch immunhistochemische Markierung von MBP (Myelin Basic Protein) dargestellt. **B** Der Myelinierungsstatus wurde als Verhältnis von Purkinje-Zell-Axonon zu myelinisierten Fasern bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

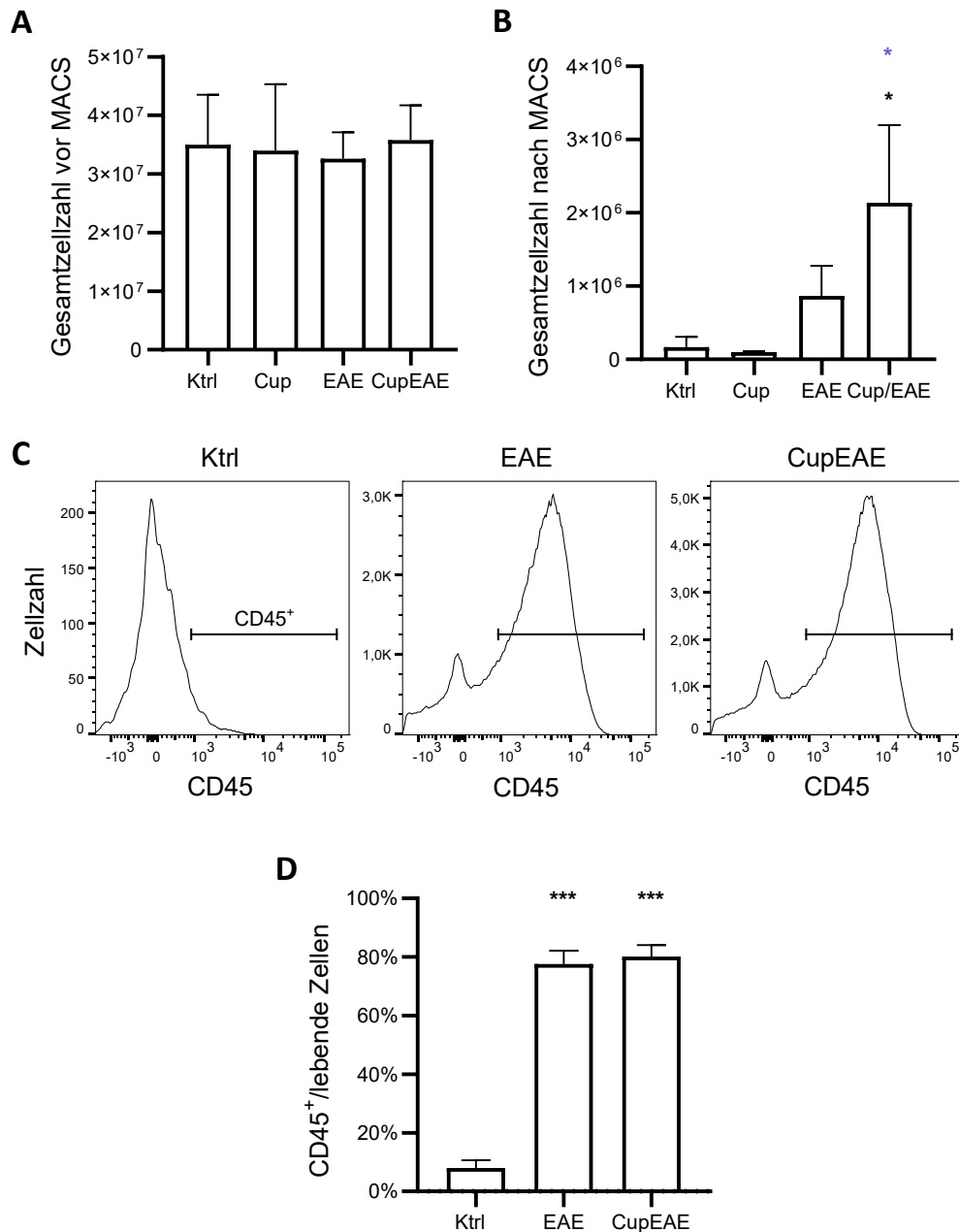
### 4.3 Immuzellinfiltrate in demyelinisierenden Mausmodellen

#### Verändert sich die Immuzellrekrutierung in das ZNS bei experimenteller Myelindegeneration?

Im Cup-, EAE- und CupEAE-Mausmodell wird durch unterschiedliche Mechanismen eine Myelindegeneration induziert, die auf unterschiedliche Weise von Immuzellrekrutierung begleitet wird. Diese Immuzellen werden im Folgenden genauer charakterisiert. Um Leukozyten im Rückenmark und Vorderhirn von Kontroll-, Cup-, EAE- und CupEAE-Tieren zu untersuchen, wurde das Gewebe dissoziiert, aus der Zellsuspension wurden per magnetischer Zellseparation CD45-positive Zellen angereichert, die Zellen wurden gegen verschiedene Leukozyten-Markerproteine gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Im CupEAE-Modell ist dies die erste durchflusszytometrische Analyse der rekrutierten CD45-positiven Immuzellen.

#### 4.3.1 Leukozyten

Die Gesamtzellzahl in Rückenmark-Zellsuspensionen vor der Anreicherung von CD45-positiven Zellen war in allen Gruppen vergleichbar (Abbildung 17 A, Ktrl:  $3,5 \cdot 10^7 \pm 0,9 \cdot 10^7$ , Cup:  $3,4 \cdot 10^7 \pm 1,1 \cdot 10^7$ , EAE:  $3,3 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$ , CupEAE:  $3,6 \cdot 10^7 \pm 0,6 \cdot 10^7$ ). Nach der CD45-abhängigen Anreicherung war die Gesamtzellzahl in EAE- und CupEAE-Proben gegenüber den anderen Gruppen erhöht (Abbildung 17 B, Ktrl:  $1,7 \cdot 10^5 \pm 1,4 \cdot 10^5$ , Cup:  $1,0 \cdot 10^5 \pm 0,1 \cdot 10^5$ , EAE:  $8,7 \cdot 10^5 \pm 4,1 \cdot 10^5$ , CupEAE:  $2,1 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$ ). Aufgrund der sehr niedrigen Zellzahl konnten mit Rückenmark-Proben aus Cup-Tieren keine weiterführenden Färbungen durchgeführt werden. Die durchflusszytometrische Analyse der CD45-Markierung ergab, dass in EAE- und CupEAE-Proben aus dem Rückenmark im Vergleich zu Kontrollproben deutlich größere CD45-positive Zellpopulationen vorhanden waren (Abbildung 17 C). Der Anteil CD45-positiver Zellen an allen lebenden Einzelzellen war im Rückenmark von EAE- und CupEAE-Tieren signifikant größer als in Kontrolltieren (Abbildung 17 D, Ktrl:  $8,0\% \pm 2,7\%$ , EAE:  $77,6\% \pm 4,5\%$ , CupEAE:  $80,1\% \pm 3,9\%$ ).

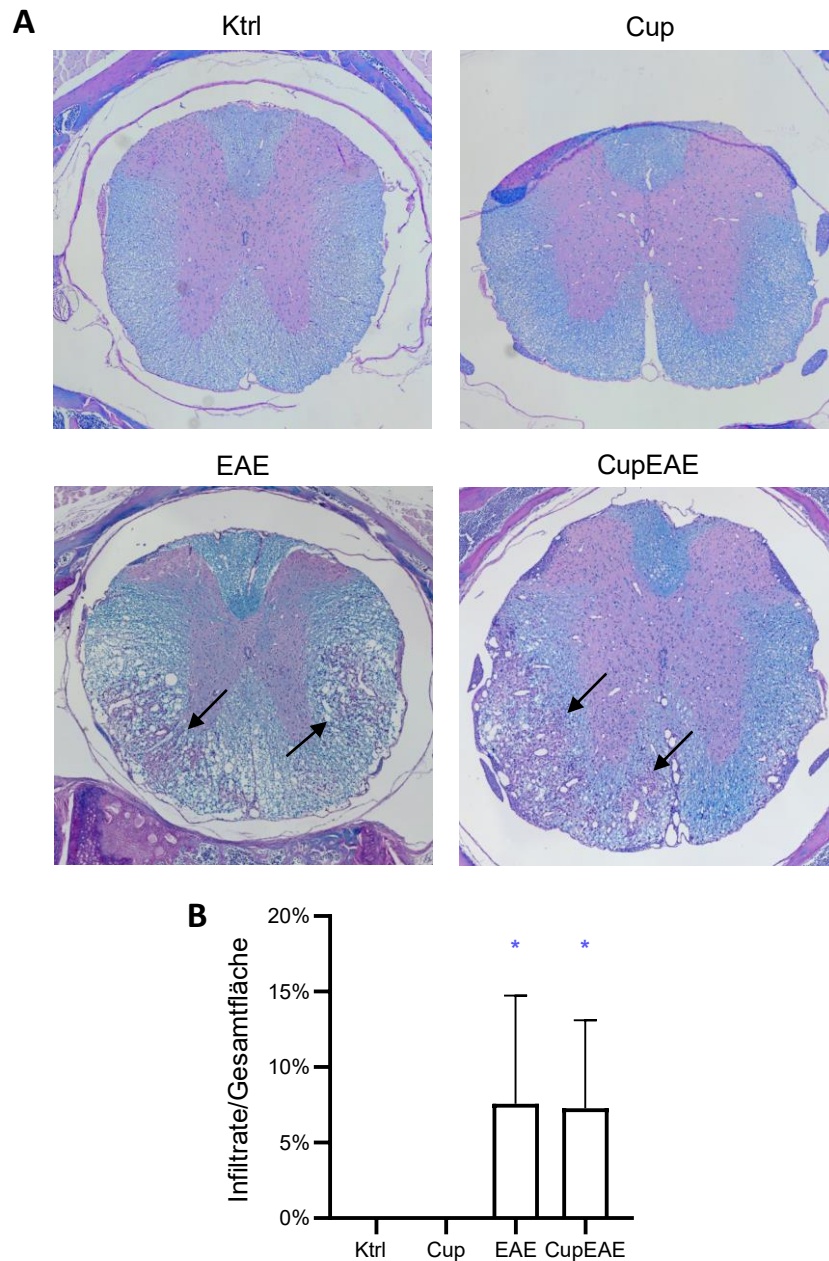


**Abbildung 17: CD45-positive Zellen im Rückenmark von EAE- und CupEAE-Tieren**

Nach unterschiedlicher demyelinisierender Behandlung wurde das Rückenmark von Mäusen dissoziiert, durch CD45-basierte magnetische Zellseparation (MACS) aufbereitet und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD45 analysiert. **A, B** Die Gesamtzellzahl nach Dissoziation des Rückenmarks wurde vor und nach MACS mittels Hämocytophotometer ermittelt. **C** Die repräsentativen Histogramme zeigen die CD45-Färbung von lebenden Einzelzellen. **D** Der Anteil CD45-positiver Zellen an allen lebenden Zellen ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. In allen Abbildungen sind statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe als schwarze Sterne und gegenüber der Cup-Gruppe als blaue Sterne dargestellt.

Die LFB-Färbung von Paraffinschnitten des Rückenmarks ergab bei Kontroll- und Cup-Tieren eine gleichmäßige blaue Färbung des Myelins der weißen Substanz des Rückenmarks. Bei EAE- und CupEAE-Tieren hingegen zeigten sich entfärbte Bereiche, die durch starke perivaskuläre, subpiale und parenchymale Zellinfiltrate charakterisiert waren (Abbildung 18 A). Die Quantifizierung des Anteils der demyelinisierten,

infiltrierten Fläche an der Gesamtfläche des Rückenmarks ergab bei EAE-Tieren  $7,6\% \pm 7,2\%$  und bei CupEAE-Tieren  $7,3\% \pm 5,8\%$ . Bei Kontroll- und Cup-Tieren waren keine Infiltrate vorhanden.

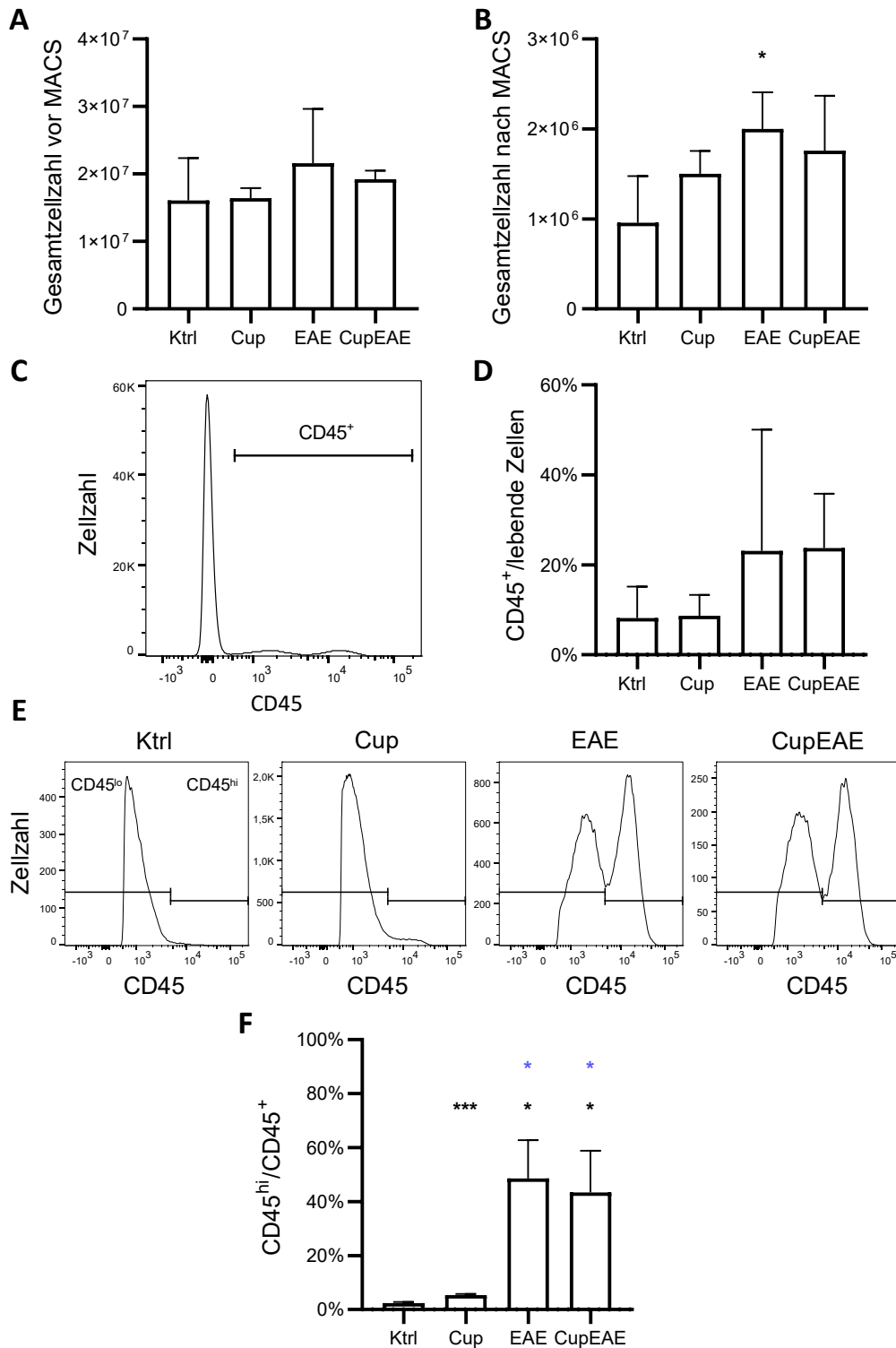


**Abbildung 18: Infiltrierende Zellen und Demyelinisierung im Rückenmark**

**A** Repräsentative Bilder einer LFB-PAS-Färbung des Rückenmarks von Kontroll-, Cup-, EAE- und CupEAE-Tieren **B** Demyelinisierte Flächen mit entzündlichen Infiltraten sind als Anteil an der Gesamtfläche des Rückenmarkschnittes als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Statistische Signifikanz gegenüber der Cup-Gruppe ist mit blauen Sternen dargestellt.

In Proben des Vorderhirns war die Gesamtzellzahl vor magnetischer Zellseparation in allen Gruppen ähnlich (Abbildung 19 A, Ktrl:  $1,6 \cdot 10^7 \pm 0,6 \cdot 10^7$ , Cup:  $1,6 \cdot 10^7 \pm 1,5 \cdot 10^7$ , EAE:  $2,2 \cdot 10^7 \pm 0,8 \cdot 10^7$ , CupEAE:  $1,9 \cdot 10^7 \pm 1,3 \cdot 10^7$ ). Nach der Anreicherung von CD45-positiven Zellen war die Gesamtzellzahl in Cup-, EAE- und CupEAE-Proben im

Vergleich zur Kontrolle tendenziell erhöht, erreichte aber nur für EAE-Proben statistische Signifikanz (Abbildung 19 B, Ktrl:  $9,6 \cdot 10^5 \pm 5,2 \cdot 10^5$ , Cup:  $1,5 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6$ , EAE:  $2,0 \cdot 10^6 \pm 0,4 \cdot 10^6$ , CupEAE:  $1,8 \cdot 10^6 \pm 0,6 \cdot 10^6$ ). Die durchflusszytometrische Analyse der CD45-Markierung in Vorderhirn-Proben ergab in allen Gruppen zwei voneinander abtrennbare Populationen CD45-positiver Zellen (Abbildung 19 C). Der Anteil CD45-positiver Zellen an allen lebenden Einzelzellen war in EAE- und CupEAE-Proben im Vergleich zu Kontroll- und Cup-Proben tendenziell leicht erhöht, nur der Unterschied zwischen Cup und CupEAE war hier statistisch signifikant (Abbildung 19 D, Ktrl:  $8,1\% \pm 7,0\%$ , Cup:  $8,7\% \pm 4,7\%$ , EAE:  $23,1\% \pm 27,0\%$ , CupEAE:  $23,7\% \pm 12,1\%$ ). Die CD45-positiven Zellen ließen sich in Proben des Vorderhirns im Gegensatz zu Rückenmarkproben (vgl. Abbildung 17C) in eine Population mit starkem CD45-Signal (CD45<sup>hi</sup>) und niedrigerem CD45-Signal (CD45<sup>lo</sup>) unterteilen. Die CD45<sup>hi</sup>-Population war in EAE- und CupEAE-Proben deutlich größer als in Cup-Proben und in Kontrollproben kaum vorhanden (Abbildung 19 E). Der Anteil der CD45<sup>hi</sup>-Population an allen CD45-positiven Zellen war dementsprechend in Cup-Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren und in EAE- und CupEAE-Tieren wiederum signifikant größer als in Cup-Tieren (Abbildung 19 F, Ktrl:  $2,4\% \pm 0,4\%$ , Cup:  $5,4\% \pm 0,4\%$ , EAE:  $48,5\% \pm 14,3\%$ , CupEAE:  $43,3\% \pm 15,5\%$ ).



**Abbildung 19: CD45-positive Zellen im Vorderhirn von Cup-, EAE- und CupEAE-Tieren**

**A, B** Die Gesamtzellzahl nach Dissoziation des Vorderhirns wurde vor und nach CD45-abhängiger magnetischer Zellseparation mittels Hämozytometer ermittelt. **C** Die CD45-Färbung von lebenden Einzelzellen ergab zwei Populationen CD45-positiver Zellen, gezeigt am Beispiel eines CupEAE-Tieres. **D** Der Anteil CD45-positiver Zellen an allen lebenden Zellen ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. **E** Darstellung der CD45-Expressionsstärke aller CD45-positiven Zellen in repräsentativen Histogrammen **F** Der Anteil von CD45<sup>hi</sup>-Zellen an allen CD45-positiven Zellen ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. In allen Abbildungen sind statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe als schwarze Sterne und gegenüber der Cup-Gruppe als blaue Sterne dargestellt.

### 4.3.2 T-Lymphozyten

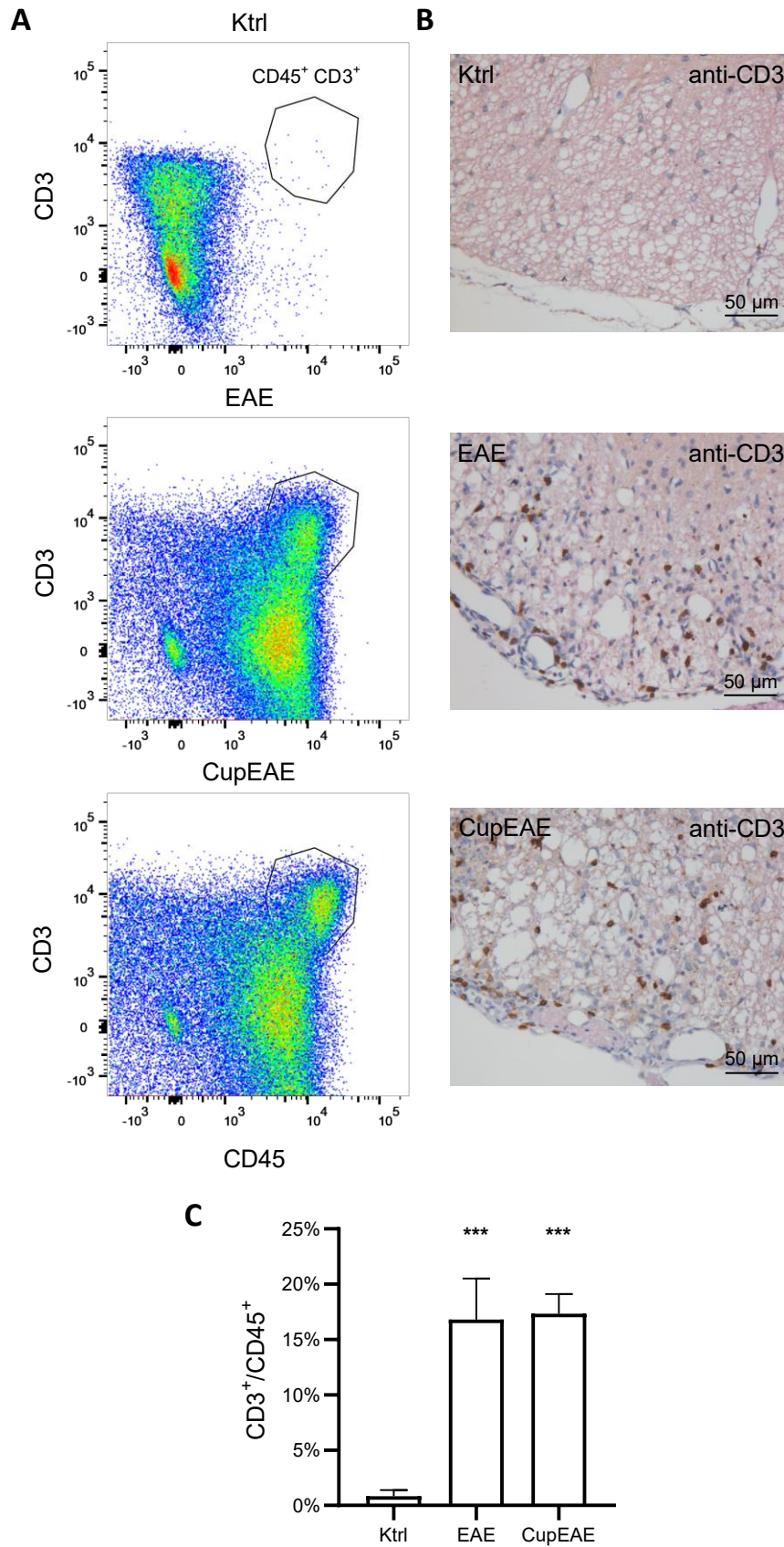
Das Vorhandensein von T-Lymphozyten in Rückenmark und Vorderhirn wurde durch Färbung der CD45-angereicherten Zellsuspensionen mit dem Pan-T-Zell-Marker CD3 untersucht.

Im Rückenmark von EAE- und CupEAE-Tieren fand sich eine Population CD3- und CD45-positiver Zellen, die in Kontrolltieren nicht vorhanden war (Abbildung 20 A). Der Anteil CD3-positiver Zellen an allen CD45-positiven Zellen des Rückenmarks war dementsprechend in EAE- und CupEAE-Proben signifikant größer als in Kontrollproben (Abbildung 20 B, Ktrl:  $0,8\% \pm 0,6\%$ , EAE:  $16,8\% \pm 3,7\%$ , CupEAE:  $17,3\% \pm 1,8\%$ ).

In Vorderhirn-Proben fand sich eine CD3-CD45-positive Zellpopulation in Cup-, EAE- und CupEAE-Tieren (Abbildung 21 A). Der Anteil CD3-positiver Zellen an allen CD45-positiven Zellen war im Vorderhirn von Cuprizone-Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren und in EAE- und CupEAE-Tieren signifikant größer als bei Cup-Tieren (Abbildung 21 B, Ktrl:  $0,9\% \pm 0,2\%$ , Cup:  $2,6\% \pm 0,3\%$  EAE:  $23,4\% \pm 9,0\%$ , CupEAE:  $23,7\% \pm 9,2\%$ ).

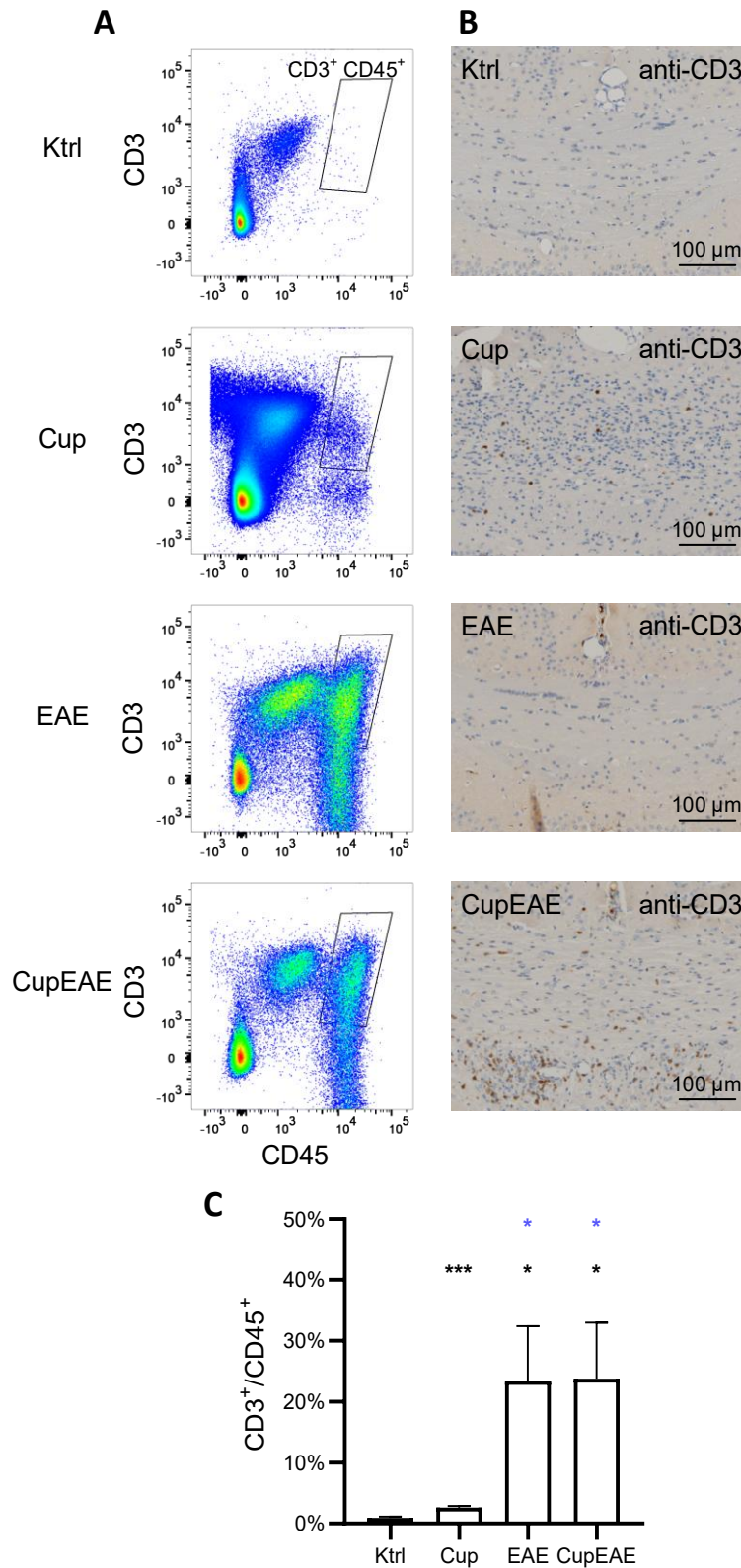
Um das Mengenverhältnis von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen zu ermitteln, wurden Färbungen von CD8 (Marker für zytotoxische T-Zellen) und CD4 (Marker für T-Helferzellen) an CD45-angereicherten Zellsuspensionen aus Rückenmark und Vorderhirn durchgeführt.

In allen experimentellen Gruppen ließen sich CD4- und CD8-positive Zellen quantifizieren (Abbildung 22 A). Das Verhältnis von CD4-positiven zu CD8-positiven Zellen wurde wegen zu geringer Zellzahlen in der Kontrollgruppe nicht bestimmt. Im Vorderhirn von Cup-Tieren lag das CD4/CD8-Verhältnis bei  $0,4 \pm 0,2$ , es waren also mehr CD8-positive Zellen als CD4-positive Zellen vorhanden. Im Rückenmark und Vorderhirn von EAE- und CupEAE-Tieren hingegen war das CD4/CD8-Verhältnis größer als 1, es waren also mehr CD4- als CD8-positive Zellen vorhanden (Abbildung 22 B, Vorderhirn: EAE:  $3,4 \pm 0,4$ , CupEAE:  $5,2 \pm 3,0$ ; Rückenmark: EAE:  $6,8 \pm 2,9$ , CupEAE:  $9,9 \pm 5,8$ ).



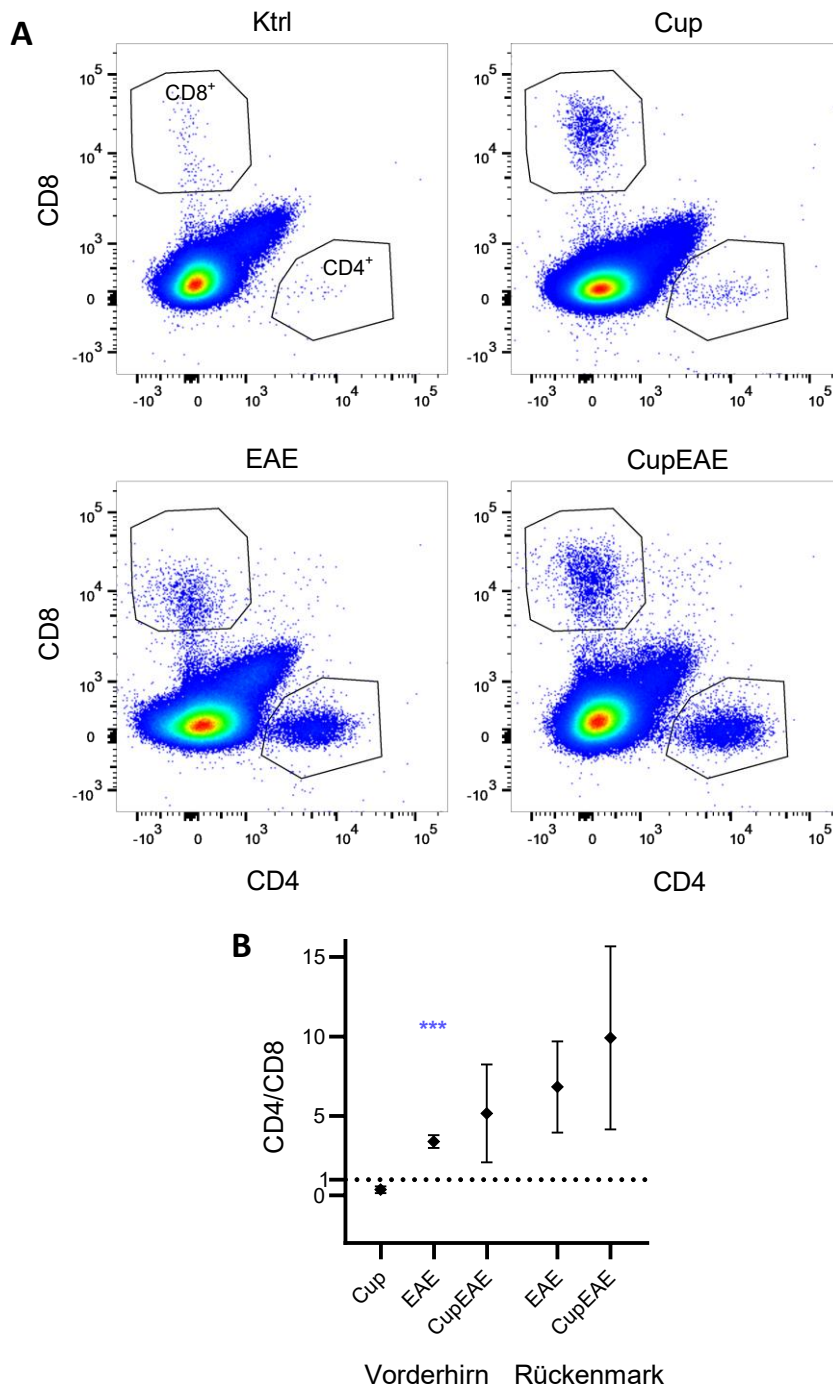
**Abbildung 20: CD3-positive Zellen im Rückenmark**

**A** Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von CD45- und CD3-positiven Zellen aus dem Rückenmark **B** CD3 wurde in Rückenmarksschnitten immunhistochemisch markiert. **C** Der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil CD3-positiver Zellen an allen CD45-positiven Zellen im Rückenmark ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe sind als schwarze Sterne markiert.



### Abbildung 21: CD3-positive Zellen im Vorderhirn

**A** Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von CD45- und CD3-positiven Zellen aus dem Vorderhirn **B** CD3 wurde in Vorderhirnschnitten immunhistochemisch markiert. Das mediale Corpus callosum ist abgebildet. **C** Der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil CD3-positiver Zellen an allen CD45-positiven Zellen aus dem Vorderhirn ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe sind als schwarze Sterne und gegenüber der Cup-Gruppe als blaue Sterne markiert.

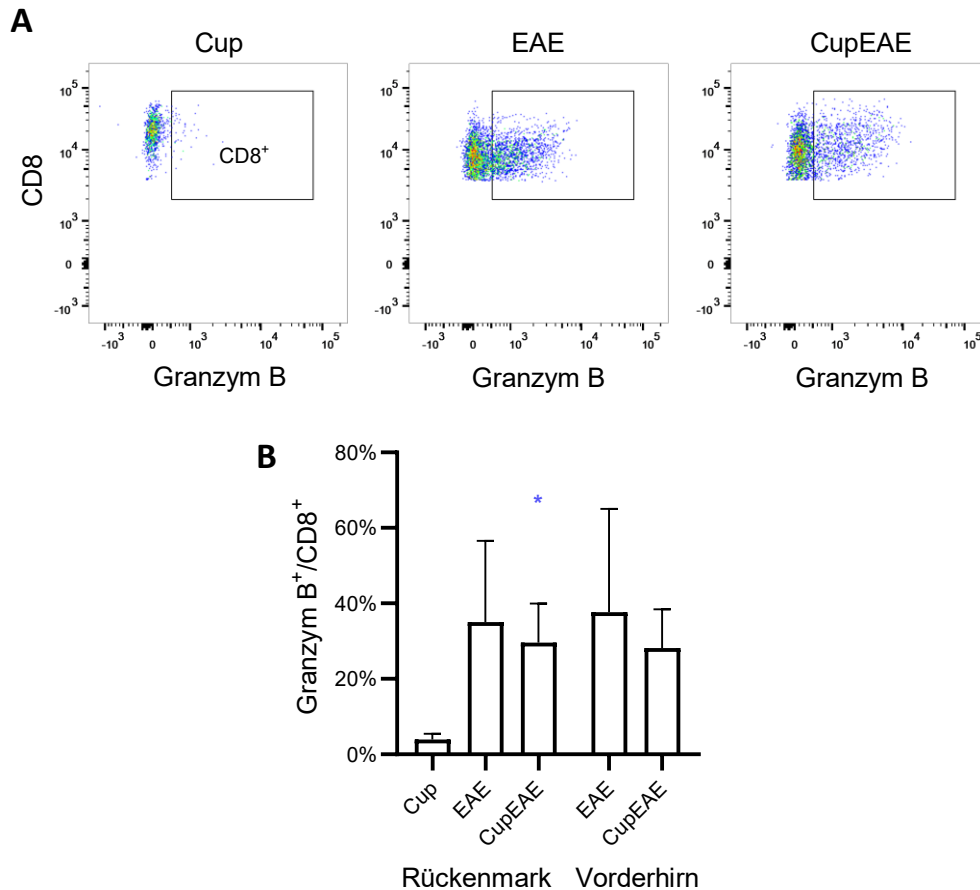


**Abbildung 22: CD4/CD8-Verhältnis in Rückenmark und Vorderhirn**

**A** Die durchflusszytometrische Analyse von CD4 und CD8 in allen CD45-positiven Zellen ist für alle verwendeten Modelle repräsentativ dargestellt. **B** Das CD4/CD8-Verhältnis ist als Mittelwert mit Standardabweichung für Zellen aus Vorderhirn und Rückenmark dargestellt. Nur bei Cup-, EAE- und CupEAE-Tieren waren die Zellzahlen ausreichend zur Bestimmung des CD4/CD8-Verhältnisses. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Cup-Gruppe aus dem gleichen Ausgangsgewebe sind als blaue Sterne markiert.

Zur Beurteilung des Aktivierungszustandes von zytotoxischen T-Zellen wurden CD8 und der Aktivierungsmarker Granzym B durchflusszytometrisch analysiert. Kontrollproben konnten aufgrund von zu geringen Zahlen CD8-positiver Zellen nicht beurteilt werden. In EAE- und CupEAE-Proben ließen sich Granzym B-positive CD8- positive Zellen in Vorderhirn und Rückenmark nachweisen, in Cup-Proben nur in

geringem Umfang (Abbildung 23 A). Der Anteil Granzym B-positiver Zellen an allen CD8-positiven Zellen lag mit rund 30% bei EAE- und CupEAE-Tieren signifikant höher als bei Cup-Tieren (Abbildung 23 B, Vorderhirn: Cup: 4,0%  $\pm$  1,5%, EAE: 35,1%  $\pm$  21,5%, CupEAE: 29,6%  $\pm$  10,4%; Rückenmark: EAE: 37,7%  $\pm$  27,4%, CupEAE: 28,2%  $\pm$  10,3%).



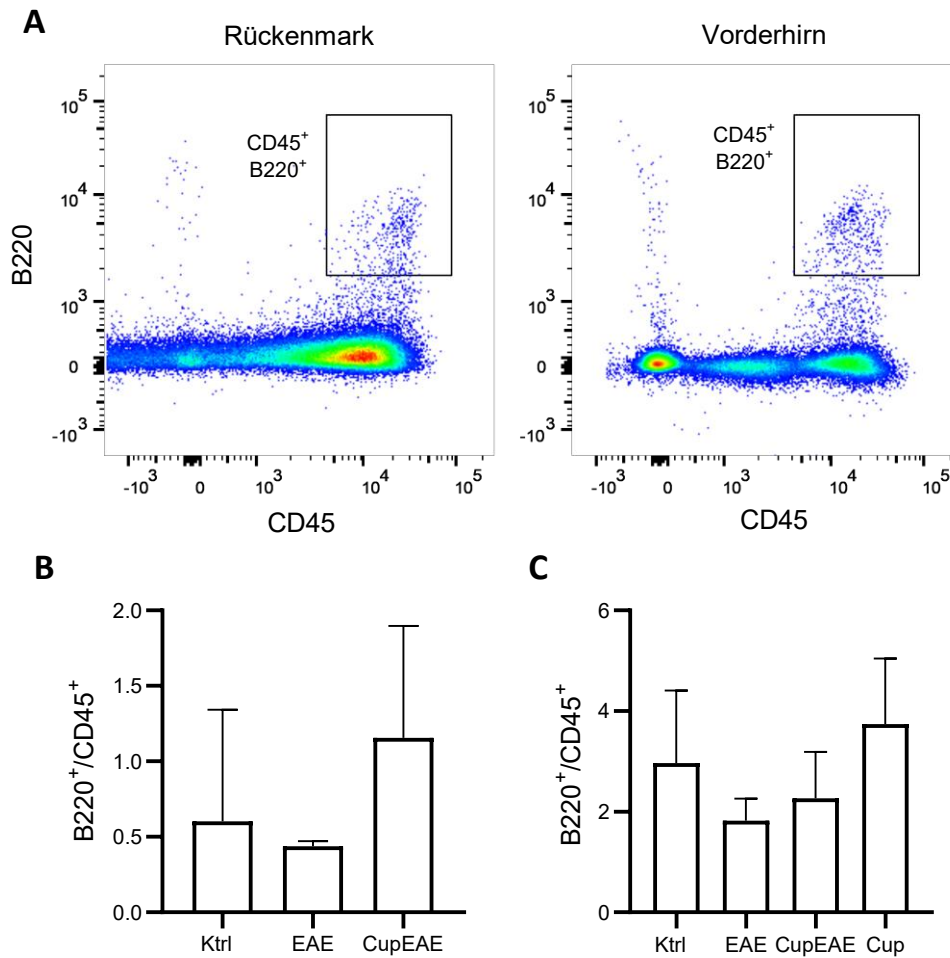
#### Abbildung 23: Granzym B-Expression auf CD8-positiven Lymphozyten

**A** Die durchflusszytometrische Analyse von Granzym B und CD8 in allen CD45-positiven Zellen ist für die verwendeten Modelle repräsentativ dargestellt. **B** Der Anteil Granzym B-positiver Zellen an CD8-positiven Zellen ist als Mittelwert mit Standardabweichung für Zellen aus Vorderhirn und Rückenmark dargestellt. Nur bei Cup-, EAE- und CupEAE-Tieren waren die Zellzahlen ausreichend zur Berechnung dieses Anteils. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Cup-Gruppe aus dem gleichen Ausgangsgewebe sind als blaue Sterne markiert.

### 4.3.3 B-Lymphozyten

Zur Analyse von B-Lymphozyten wurde in den CD45-angereicherten Zellsuspensionen aus Rückenmark und Vorderhirn der etablierte B-Zellmarker B220 markiert. In den Proben beider Gewebe waren B220-CD45-doppelpositive Zellen in geringer Zahl vorhanden (Abbildung 24 A). Im Rückenmark lag der Anteil B220-positiver Zellen an allen CD45-positiven Zellen in allen Gruppen bei 0,5 bis 1% (Abbildung 24 B, Ktrl: 0,6%  $\pm$  0,7%, EAE: 0,4%  $\pm$  0,04%, CupEAE: 1,2%  $\pm$  0,7%). Im Vorderhirn war der Anteil B220-positiver Zellen mit etwa 2 bis 4% etwas höher (Abbildung 24 C, Ktrl:

2,9%  $\pm$  1,4%, Cup: 3,7%  $\pm$  1,3%, EAE: 1,8%  $\pm$  0,4%, CupEAE: 2,3%  $\pm$  0,9%). In beiden Geweben unterschied sich der B220-Anteil nicht zwischen den experimentellen Gruppen.



**Abbildung 24: B220-positive Zellen in Rückenmark und Vorderhirn**

**A** Die durchflusszytometrische Analyse von CD45- und B220-positiven Zellen aus dem Rückenmark und dem Vorderhirn ist am Beispiel von CupEAE-Tieren dargestellt. **B, C** Der Anteil B220-positiver Zellen an allen CD45-positiven Zellen aus dem Rückenmark (**B**) und dem Vorderhirn (**C**) ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

#### 4.3.4 Phagozytierende Zellen

Zur Charakterisierung von phagozytierenden Zellpopulationen wurden die Marker CD68 und Ly6C in Zellsuspensionen aus Vorderhirn und Rückenmark durchflusszytometrisch ausgewertet.

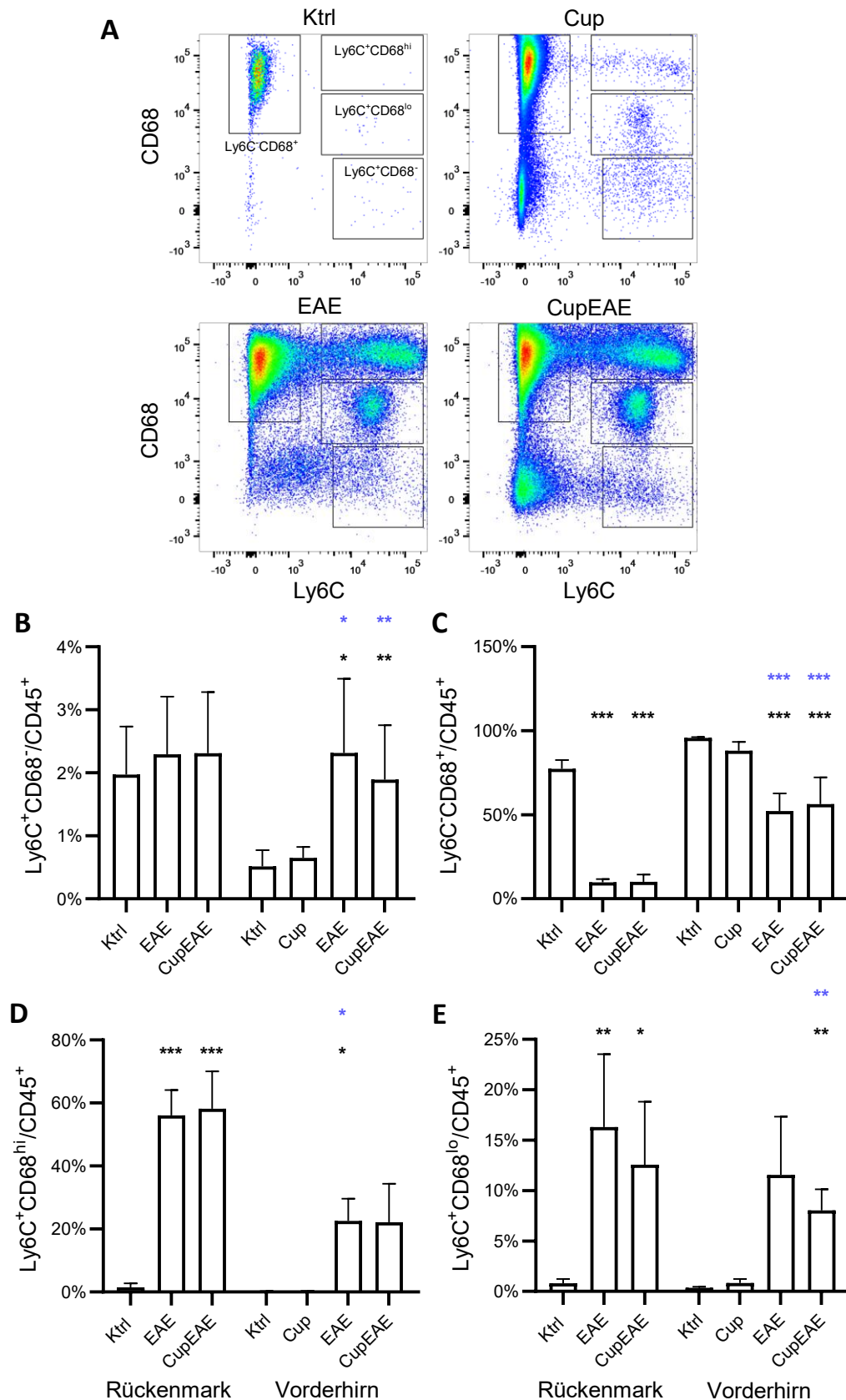
Die Signalverteilung von CD68 und Ly6C in allen CD45-positiven Zellen resultierte in fünf voneinander trennbaren Zellpopulationen (Abbildung 25 A). Insbesondere in EAE- und CupEAE-Proben ließen sich eine doppelnegative Fraktion, je eine für einen der beiden Marker positive Fraktion und zwei doppelpositive Fraktionen unterscheiden.

Die doppelpositiven Fraktionen unterschieden sich anhand der Intensität der CD68-Färbung in CD68<sup>hi</sup>- und CD68<sup>lo</sup>-exprimierende Zellen.

Die Ly6C-positive und CD68-negative Zellpopulation stellte den geringsten Anteil an CD45-positiven Zellen dar. Im Rückenmark von Kontroll-, EAE- und CupEAE-Tieren lag ihr Anteil bei etwa zwei Prozent, im Vorderhirn war ihr Anteil bei Kontroll- und Cuprizone-Tieren signifikant geringer als bei EAE- und CupEAE-Tieren (Abbildung 25 B, Rückenmark: Ktrl: 2,0% ± 0,8%, EAE: 2,3% ± 0,9%, CupEAE: 2,3% ± 1,0%, Vorderhirn: Ktrl: 0,5% ± 0,3%, Cup: 0,7% ± 0,2%, EAE: 2,3% ± 1,2%, CupEAE: 1,9% ± 0,9%).

Die Ly6C-negative und CD68-positive Zellpopulation hatte in Kontrolltieren im Rückenmark einen signifikant größeren Anteil an allen CD45-positiven Zellen als in EAE- und CupEAE-Tieren. Im Vorderhirn war dieser Anteil in Kontroll- und Cup-Tieren signifikant größer als in EAE- und CupEAE-Tieren (Abbildung 25 C, Rückenmark: Ktrl: 77,3% ± 5,3%, EAE: 9,9% ± 1,8%, CupEAE: 10,1% ± 4,3%, Vorderhirn: Ktrl: 95,8% ± 0,4%, Cup: 88,1% ± 5,3%, EAE: 52,5% ± 10,6%, CupEAE: 56,3% ± 16,0%).

Die beiden doppelpositiven Zellpopulationen zeigten mengenmäßig eine ähnliche Verteilung in den experimentellen Gruppen. Ihr Anteil an allen CD45-positiven Zellen war in EAE- und CupEAE-Tieren signifikant größer als in Kontroll- und Cup-Tieren. Dabei ist der Anteil Ly6C-positiver und CD68<sup>hi</sup>-Zellen höher (Abbildung 25 D, Rückenmark: Ktrl: 1,5% ± 1,3%, EAE: 56,1% ± 8,0%, CupEAE: 58,2% ± 11,9%, Vorderhirn: Ktrl: 0,2% ± 0,1%, Cup: 0,3% ± 0,03%, EAE: 22,6% ± 7,1%, CupEAE: 22,2% ± 12,2%) als der von Ly6C-positiven CD68<sup>lo</sup>-Zellen (Abbildung 25 E, Rückenmark: Ktrl: 0,8% ± 0,4%, EAE: 16,3% ± 7,2%, CupEAE: 12,6% ± 6,3%, Vorderhirn: Ktrl: 0,4% ± 0,1%, Cup: 0,8% ± 0,4%, EAE: 11,6% ± 5,8%, CupEAE: 8,1% ± 2,1%).



**Abbildung 25: Phagozytierende Zellen in Rückenmark und Vorderhirn**

**A** Die durchflusszytometrische Analyse von Ly6C und CD68 in allen CD45-positiven Zellen ist für die verwendeten Modelle repräsentativ dargestellt. **B-E** Der Anteil der vier abgrenzbaren Populationen Ly6C<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> (**B**) Ly6C<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (**C**), Ly6C<sup>+</sup>CD68<sup>hi</sup> (**D**) und Ly6C<sup>+</sup>CD68<sup>lo</sup> (**E**) an allen CD45-positiven Zellen ist als Mittelwert mit Standardabweichung für Rückenmark und Vorderhirn dargestellt. In allen Abbildungen sind statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe als schwarze Sterne und gegenüber der Cup-Gruppe als blaue Sterne dargestellt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Proteomanalyse als Werkzeug in der Analyse von Myelinproteinen

Der erste Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Myelinproteine massenspektrometrisch insbesondere in kleinen Probenvolumina analysiert werden können. Im Cerebellum adulter Ratten konnten diverse klassische Myelin-Markerproteine nachgewiesen und quantifiziert werden (Abbildung 10). Im ZNS der postnatalen Maus (P5) hingegen wurden die meisten dieser Markerproteine nicht nachgewiesen. Die Myelinisierung beginnt bei der Maus wie bei den meisten Säugetieren postnatal zunächst mit der Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und dann der progressiven Myelinisierung von kaudal nach rostral. Abhängig von der Hirnregion ist die Myelinisierung mit P20 bis P60 abgeschlossen [162, 163]. Die Bildung von Myelin und die Expression von Myelinmarkerproteinen befindet sich also an P5 noch in der Anfangsphase bzw. hat noch gar nicht begonnen. Die Expression von MBP im Corpus callosum der Maus beispielsweise ist in sehr geringem Maße an P4 immunhistochemisch detektierbar, zunehmende clusterförmige Expressionsmuster sind ab P7 zunehmend nachweisbar, aber erst ab P15 wird MBP annähernd flächendeckend im Corpus callosum exprimiert [164].

Was aus der massenspektrometrischen Analyse der murinen Proben aber hervorgeht ist, dass die Methode auch zur Untersuchung geringer Gewebemengen (etwa 20 mg) geeignet ist und dabei eine hohe Reproduzierbarkeit der Quantifizierung von Proteinen erreicht. Die Gesamtproteinkonzentration nach Anreicherung von Membranproteinen war in allen Proben trotz der vielschrittigen Aufarbeitung vergleichbar und die massenspektrometrisch gemessenen Proteinabundanzen schwanken in akzeptablem Maß um den Mittelwert (Abbildung 11). Dementsprechend lässt sich die Methode auch auf kleine präparierte Hirnregionen anwenden, zum Beispiel zur Erhebung eines detaillierten Myelinisierungsstatus des isolierten Corpus callosum oder cerebellarer organotypischer Gewebekulturen.

Die hier verwendete Methode der Massenspektrometrie ist dazu geeignet, Membranproteine zu identifizieren und zu quantifizieren. Sie kann zur Quantifizierung konkreter Proteine oder für explorative Ansätze zur Identifizierung von unbekanntem Proteinen in einer Probe eingesetzt werden. Durch die gleichzeitige Messung vieler

Proteine lassen sich komplexe Proteinexpressionsprofile erstellen, die die Aussagestärke von Einzelproteinmessungen übertreffen können.

Die Methode ist allerdings aufwändig und aufgrund der großen Sensitivität anfällig für Kontaminationen. Die räumliche Zuordnung von Proteinen zu Zellkompartimenten oder Gewebebestandteilen lässt sich nur durch Anwendung spezifischer Proteinaufreinigungsmethoden erreichen und sollte durch bildgebende Methoden wie Immunhistochemie oder elektronenmikroskopische Verfahren validiert werden.

In dieser Arbeit wurde als Aufarbeitungsmethode eine Membranproteinanreicherung gewählt (Abbildung 9), da neben der Frage nach Myelinproteinen in diesem Projekt noch andere Fragestellungen zu einem breiter definierten Proteinbereich bearbeitet wurden. Die spezifische Aufarbeitung von Myelinproteinen ist aber gut etabliert und im Vergleich zur Membranproteinanreicherung sogar weniger aufwändig. Bei Folgeexperimenten mit spezifischen Fragestellungen zu Myelinproteinen soll deshalb diese auf die Fragestellung zugeschnittene Myelinaufreinigung mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse wie in dieser Arbeit verwendet werden.

Die Entwicklung der massenspektrometrischen Myelinanalyse hat methodisch in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Inzwischen wurden über 1200 Proteine in Myelinfraktionen von humanem und murinem Gewebe identifiziert [165, 166]. Die Entwicklung zielt insbesondere auf den Nachweis von gering exprimierten Proteinen ab, um neue Zielstrukturen für pharmakologische Interventionen oder Biomarker für Myelinläsionen identifizieren zu können [167, 168]. Die Anwendung dieser Methoden bei konkreten experimentellen oder klinischen Fragestellungen ist allerdings bisher kaum publiziert. Mehr Studien gibt es zur massenspektrometrischen Analyse von Gesamtproteinfraktionen in Myelinopathie-Modellen oder -Patienten, bei denen viele Myelinproteine allerdings nicht erfasst werden können. So konnten durch massenspektrometrische Analyse von humanem MS-Gewebe Kandidatenproteine identifiziert werden, deren Manipulation im EAE-Modell zur Abschwächung des Krankheitsverlaufes führten [169].

Es lässt sich zusammenfassen, dass die angewandte Massenspektrometrie-basierte Methode zur Myelinanalyse, auch von kleinen Probenmengen, geeignet ist. Die Ergebnisse müssen aber durch weitere Methoden wie ultrastrukturelle Bildgebung oder immunhistochemische Färbungen validiert beziehungsweise ergänzt werden, um den Zustand des Myelins adäquat abzubilden. Um auf dieses Ergebnis aufzubauen, können

nun die Myelinproteinprofile von Gewebeproben in unterschiedlichen Demyelinisierungszuständen erhoben werden. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, in welcher zeitlichen Abfolge verschiedene Myelinproteine und damit die verschiedenen Kompartimente des Myelins von Demyelinisierungsprozessen betroffen sind.

## **5.2 Myelinisierung und Demyelinisierung in organotypischen Gewebekulturen**

Die zweite Fragestellung dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Eignung von Schnittkulturen als Modellsystem für Demyelinisierung. Es wurde gezeigt, dass in Schnittkulturen Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia über einen längeren Zeitraum in ihrer physiologischen Morphologie erhalten bleiben (Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15). Die Struktur von Hirnregionen blieb im Bereich von Hippocampus, Kortex oder SN im Wesentlichen erhalten, während im OB die Organisation in Glomeruli über eine längere Kulturdauer verloren ging (Abbildung 12, Abbildung 13). In cerebellaren Schnittkulturen ließ sich mit LPC die Demyelinisierung von Purkinje-Zell-Axonen induzieren und durch immunhistochemische Färbung von neuronalen Fasern und Myelinscheide quantifizieren (Abbildung 16).

Organotypische Schnittkulturen sind ein Kultursystem, das den physiologischen Zusammenhang verschiedener Zelltypen besser abbildet als dissoziierte Zellkulturen. Sie sind zugänglich für chemische oder mechanische Manipulationen, wie in dieser Arbeit für die Behandlung mit LPC. Anders als *in vivo* können auch nicht Blut-Hirn-Schrankengängige Substanzen appliziert werden. Aus tierethischer Sicht ist das Anlegen von Gewebekulturen vertretbarer als die Induktion von Demyelinisierung am lebenden Tier, zumal aus einem Tier mehrere Schnittkulturen gewonnen werden können.

Obwohl die Situation in organotypischen Kulturen den Verhältnissen *in vivo* nahe ist, gibt es entscheidende Unterschiede. Das Schneiden des Gewebes ist ein massiver Gewebeschaden, der Axone außerhalb der Schnittebene durchtrennt und die Bildung einer Glienarbe induziert. Übergeordnete anatomische Strukturen wie Blutgefäße, Hirnhäute oder Liquorräume sind nicht mehr in den Kulturen vorhanden. Die Nährstoffversorgung geschieht nicht mehr über die Durchblutung, sondern durch Diffusion aus dem Kulturmedium, das in seiner Zusammensetzung nicht den physiologischen Medien (Blut, Interstitialflüssigkeit, Liquor) entsprechen kann. Durch das Fehlen einer Blutzirkulation hat auch das periphere Immunsystem keinen Einfluss

mehr auf das Gewebe. Das Aufquellen und Eintrüben der Schnittkultur in den ersten Tagen in Kultur ist eine makroskopisch erkennbare Reaktion auf diese stark veränderten Bedingungen. Außerdem werden Gewebekulturen aus dem Gewebe junger postnataler Mäuse hergestellt (häufig P5), da sich adultes Gewebe in der Regel nicht kultivieren lässt. In diesem Alter ist das Gewebe in vielerlei Hinsicht noch nicht reif und mit adultem Gewebe vergleichbar. Die Myelinisierung beginnt beispielsweise bei der Maus abhängig von der Hirnregion erst etwa mit P7. Für die in dieser Arbeit genutzten cerebellaren Gewebekulturen wurden deshalb Mäuse an P8-P10 verwendet. Auch bei diesen Tieren ist die Myelinisierung noch nicht abgeschlossen, sie läuft aber während der Kultivierung weiter und führt zu einer gleichmäßigen Myelinisierung der Purkinje-Zell-Axone nach etwa einer Woche in Kultur. Es ist unbekannt, wie genau dieses *ex vivo* gebildete Myelin dem physiologischen Myelin oder dem Myelin einer adulten Maus entspricht.

In der Literatur sind diverse Varianten neuronaler organotypischer Schnittkulturen beschrieben. Am gängigsten sind Kulturen von isolierten Gehirnregionen, vor allem des Hippocampus, denn kleinere Gewebeschnitte zeigen in Kultur bessere Viabilität als größere Schnitte und sind durch die Verwendung eines Tissue Choppers schneller und in größerer Zahl herzustellen als großflächige Schnitte, für die ein Vibratom benötigt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, mit der große sagittale oder frontale Gewebekulturen durch Agaroseeinbettung mit einem Tissue Chopper angefertigt werden können [158]. Das auf diese Art kultivierte Gewebe zeigt auch nach Wochen eine hohe Viabilität und eine weitgehend physiologische Morphologie neuronaler und glialer Zellen. Auch die Kokultivierung von sagittalen und frontalen Schnitten mit Auswachsen von neuronalen Fortsätzen aus einer sagittalen Gewebekultur in eine angelegte frontal geschnittene Schnittkultur wurde im Rahmen dieses Projektes zum ersten Mal publiziert. Dieses Modell auswachsender Axone bietet sich an, um die initiale Myelinisierung neu gebildeter Axone zu untersuchen.

Die durch LPC hervorgerufene Demyelinisierung von Purkinje-Zell-Axonen ist robust und gut reproduzierbar. Der Mechanismus der Demyelinisierung ist allerdings artifiziell und macht das Modell für die Untersuchung der Demyelinisierung an sich ungeeignet. Es eignet sich aber gut um einen demyelinisierten Zustand in ansonsten intaktem Gewebe zu generieren, um die Remyelinisierungskapazität des Gewebes zu untersuchen.

Die Verwendung von cerebellaren Schnittkulturen mit LPC-Behandlung zur Induktion von Demyelinisierung ist eine gängige Methode und wurde zur Untersuchung der

Remyelinisierungskapazität unter pharmakologischer Behandlung [170] oder bei unterschiedlichem genetischem Hintergrund [171] verwendet. In dieser Arbeit wurde die demyelinisierende Wirkung von LPC an cerebellaren Schnittkulturen erfolgreich reproduziert. Remyelinisierung konnte in den angewandten Kulturzeiträumen (bis zu drei Tage nach LPC-Behandlung) nicht beobachtet werden. Das deckt sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die in den ersten Tagen nach LPC-Behandlung eine zeitverzögerte Demyelinisierung und nach etwa 14 Tagen eine weitgehende Remyelinisierung beschrieben haben [52]. Das remyelinisierte Myelin weist allerdings strukturelle Defizite auf, die an Strukturveränderungen von Myelin in remyelinisierten MS-Läsionen erinnern [52]. Remyelinisierte Läsionen ('shadow plaques') wurden in allen Stadien der MS nachgewiesen, der Anteil remyelinisierter Läsionen an allen Läsionen eines Patienten ist aber hoch variabel [172]. Die Modulation der intrinsischen Remyelinisierung ist von hohem Interesse in der Entwicklung neuer Therapieansätze [173], dementsprechend sind LPC-behandelte cerebellare Schnittkulturen ein attraktives Modellsystem für entsprechende präklinische Studien.

Die Auswertung des Myelinstatus in Schnittkulturen erfolgt in der Regel über immunhistochemischen Nachweis von Myelinproteinen und ihre Kolo-kalisation mit axonalen Markerproteinen. Vereinzelt wurden außerdem die Menge von Myelinproteinen im Western Blot quantifiziert [174], ultrastrukturelle Analysen der Myelinscheiden durchgeführt [54] oder die CNPase-Aktivität in Gewebelysaten bestimmt [51]. Massenspektrometrische Analysen von organotypischen Schnittkulturen sind mir hingegen nicht bekannt, weder im Zusammenhang mit Myelinproteinen, noch mit anderen Proteingruppen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Massenspektrometrie-basierte Analyse von Membranproteinen auch in kleinen Gewebeprobe-n möglich. Es ist also sinnvoll, die massenspektrometrische Analyse des Myelinproteoms an kultivierten Gewebekulturen zu standardisieren, um so eine detaillierte Analysemöglichkeit des Myelinstatus in Schnittkulturen zu schaffen. Das Modellsystem der LPC-induzierten Demyelinisierung kann zwar keine Erkenntnisse zu pathologischen Demyelinisierungsvorgängen liefern, es bietet aber die Möglichkeit, den Myelinisierungsstatus während der Remyelinisierung zu analysieren. Dieser Myelinisierungsstatus verspricht zum einen Aufschluss über den zeitlichen Ablauf der Proteinexpression während der Myelinisierung, zum anderen erlaubt er möglicherweise genauere Aussagen über den Wirkmechanismus von

Substanzen oder Genen, die die Remyelinisierung im LPC-Schnittkulturmodell modulieren können.

Es lässt sich zusammenfassen, dass cerebellare Schnittkulturen nach LPC-Behandlung ein geeignetes Modellsystem für die Analyse der Remyelinisierung sind. Die Etablierung von massenspektrometrisch erstellten Myelinproteinprofilen in diesen Schnittkulturen verspricht tiefere Erkenntnisse zum Ablauf der Remyelinisierung.

### **5.3 Immuzellinfiltrate in demyelinisierenden Mausmodellen**

Der dritte Abschnitt dieser Arbeit behandelt die Frage, ob und wie sich Immuzellinfiltrate im ZNS während zytodegenerativer Demyelinisierung, autoimmuner Neuroinflammation und der Kombination beider Zustände unterscheiden. Dazu wurde im Cuprizone-, EAE- und CupEAE-Modell die Immuzellrekrutierung durchflusszytometrisch und immunhistochemisch untersucht.

In allen Modellen ließen sich CD45-positive Zellen aus dem ZNS nachweisen (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19). Im Vorderhirn ließen sich zwei CD45-positive Zellpopulationen unterscheiden (Abbildung 19). Zellen mit niedriger CD45-Expression sind Mikroglia [175], diese sind in allen Modellen und Kontrolltieren vorhanden. Zellen mit hoher CD45-Expression sind Leukozyten. Sie sind im EAE- und CupEAE-Modell, in geringerer Zahl aber auch im Cuprizone-Modell vorhanden. Im Rückenmark ließ sich nur eine CD45-positive Zellpopulation nachweisen. Wahrscheinlich beruht dies darauf, dass zum einen Mikroglia im Rückenmark in geringerer Dichte vorliegen als im Vorderhirn [176] und zum anderen Mikroglia im Rückenmark eine höhere CD45-Expression aufweisen als im Vorderhirn [177]. Deshalb bilden Leukozyten und Mikroglia aus dem Rückenmark in der CD45-Färbung eine gemeinsame Zellpopulation. Auch im Rückenmark waren im Vergleich zu Kontrolltieren im EAE- und CupEAE-Modell viele CD45-positive Zellen vorhanden. Im Cuprizone-Modell hingegen waren Leukozyten im Rückenmark nicht nachweisbar.

Etwa 15-20% der Leukozyten im EAE- und CupEAE-Modell waren T-Lymphozyten (Abbildung 20, Abbildung 21). Im Cuprizone-Modell waren ebenfalls T-Lymphozyten vorhanden, ihr Anteil an allen CD45-positiven Zellen war aber deutlich kleiner. Im EAE- und CupEAE-Modell waren die T-Lymphozyten überwiegend CD4-positive T-Helferzellen, während im Cuprizone-Modell CD8-positive zytotoxische T-Zellen überwogen (Abbildung 22). Zytotoxische T-Zellen waren im EAE- und CupEAE-Modell zu 30% GranzymB-positiv, was auf einen aktivierten Zustand schließen lässt

(Abbildung 23). Im Cuprizone-Modell waren nur etwa 4% der zytotoxischen Zellen aktiviert. B-Lymphozyten waren in allen Modellen kaum vorhanden (Abbildung 24).

Phagozytierende Zellen wurden durch Markierung von CD68 und Ly6C charakterisiert, wodurch sich fünf Zellpopulationen voneinander abtrennen ließen (Abbildung 25). Doppelnegative Zellen sind in erster Linie die schon beschriebenen Lymphozyten. CD68<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> Zellen sind Mikroglia. Sie bildeten bei Kontrolltieren und Cuprizone-Tieren den Großteil der CD45-positiven Zellen, im EAE- und CupEAE-Modell waren sie etwa 50% aller CD45-positiven Zellen. Eine große Menge von Mikroglia ist in allen Proben zu erwarten, da sie bei der CD45-abhängigen Probenaufreinigung ebenso wie Leukozyten angereichert werden und außerdem in allen untersuchten Modellsystemen eine Mikrogliose in betroffenen Hirnregionen besteht [56, 72, 102].

CD68Ly6C<sup>+</sup> Zellen sind Dendritische Zellen [178]. Sie waren in allen Modellen und Kontrolltieren als geringer Anteil aller CD45-positiven Zellen vorhanden, im Vorderhirn war ihre Zahl gegenüber Kontroll- und Cuprizone-Tieren leicht erhöht. Die beiden doppelpositiven Zellpopulationen unterschieden sich in der Stärke ihrer CD68-Expression. Anhand der verwendeten Markierung lässt sich nicht eindeutig bestimmen, welche Zellen diese Populationen bilden. CD68 gilt in erster Linie als Marker für Monozyten bzw. Makrophagen, es wurde aber auch auf Granulozyten nachgewiesen [178]. Die Stärke der CD68-Expression ist außerdem vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig [179], die beiden Populationen können also auch aktive und inaktive phagozytierende Zellen darstellen. Im EAE- und CupEAE-Modell sind die CD68<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> Zellpopulationen deutlich größer als im Cuprizone-Modell oder in Kontrolltieren.

Diese Ergebnisse wurden durch durchflusszytometrische Messungen gewonnen. Durchflusszytometrie ermöglicht durch die gleichzeitige Quantifizierung diverser Marker auf denselben Zellen eine detaillierte Beschreibung der untersuchten Zellpopulationen. Die Quantifizierung ist allerdings nicht absolut, sie gibt immer den Anteil der gemessenen Zellpopulation an einer definierten Ausgangspopulation an. Erhöht sich die Anzahl einer bestimmten Zellpopulation innerhalb der Ausgangspopulation, so sinkt der Anteil aller anderen Zellen, obwohl sich ihre absolute Anzahl im Gewebe nicht verändert. Die Durchflusszytometrie liefert keine Information über die genaue Lokalisation der analysierten Immunzellen. Sie können zum Beispiel parenchymal, perivaskulär oder subarachnoidal liegen. Eine Kontamination mit

peripherem Blut ist durch die Perfusion mit PBS und die äußerst geringen Zellzahlen in Kontrolltieren hingegen weitgehend auszuschließen.

In dieser Arbeit wurden die markierten Antigene so ausgewählt, dass eine breite Palette von Immunzellen quantifiziert werden konnte. Dadurch ließen sich allerdings Monozyten und Granulozyten nicht adäquat unterscheiden. Zur eindeutigen Identifizierung dieser Zellpopulationen sind weitere spezifische Markierungen für phagozytierende Zellen notwendig (z.B. Ly6G für neutrophile Granulozyten, F4/80 für Makrophagen). Die meisten bekannten Oberflächenproteine werden allerdings von beiden Zelltypen exprimiert, zumindest in bestimmten Abschnitten ihrer Entwicklung. Deshalb kann nur eine Kombination mehrerer Markierungen zu einer sicheren Identifikation führen. Da in dieser Arbeit relativ wenige Immunzellen aus einer sehr großen Menge Gewebe isoliert wurden, war die Anreicherung dieser Zellen notwendig. Eine zusätzliche Schwierigkeit war der hohe Myelin- und damit Lipidgehalt des Gewebes. Myelindebris und hohe Lipidkonzentrationen stören die nachfolgenden Färbe- und Analyseschritte, deshalb muss im Aufreinigungsprozess der Myelingealt der Proben gesenkt werden. Dafür wurde eine automatisierte MACS-Methode zur Positivselektion von CD45-positiven Zellen verwendet. Die CD45-Abhängigkeit ermöglicht auf der einen Seite eine hohe Spezifität der Aufreinigung, andererseits kann unterschiedliche CD45-Expression in den unterschiedlichen Zellpopulationen auch die Zusammensetzung der resultierenden Zellsuspension verfälschen. Bei Positivselektion werden die selektierten Zellen vom umgebenden Medium getrennt und in frischem Puffer eluiert, dementsprechend sinkt der Myelingealt der Probe stark. Eine gut etablierte Alternative zur Aufreinigung von Immunzellen ist die Percoll-basierte Dichtegradientenzentrifugation. Da hierbei allerdings durch die manuelle Durchführung die Reproduzierbarkeit sinkt, insbesondere bei den hier untersuchten geringen Zellzahlen, wurde für diese Arbeit die automatisierbare MACS-Methode gewählt.

Die in dieser Arbeit gemessene Immunzellrekrutierung deckt sich im Wesentlichen mit den in der Literatur beschriebenen Verhältnissen. Auf Abweichungen soll im Folgenden eingegangen werden. Im EAE-Modell ist die Immunzellrekrutierung ins Rückenmark detailliert von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Eine Rekrutierung von Immunzellen ins Vorderhirn wurde aber nur vereinzelt berichtet [92, 102]. In dieser Arbeit ist eine überraschend große Menge CD45-positiver Zellen aus dem Vorderhirn aufgereinigt worden, die im Wesentlichen die gleiche Zusammensetzung aufweist wie die aus dem Rückenmark aufgereinigten Zellen. Es bleibt also zu klären, wo die

Immunzellinfiltrate des Vorderhirns sich genau befinden und wie groß ihre absolute Anzahl ist. Abhängig von diesen zum Beispiel durch immunhistochemische Markierungen zu beantwortenden Fragen sollte auch die gängige Praxis, sich im EAE-Modell auf die Analyse des Rückenmarks und des Kleinhirns zu konzentrieren, hinterfragt werden.

Im CupEAE-Modell ist die Immunzellrekrutierung in der Literatur weit weniger detailliert beschrieben als im EAE-Modell. Die vorhandenen Studien werden durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Das CD4/CD8-Verhältnis rekrutierter T-Lymphozyten im CupEAE-Modell wurde bisher noch nicht publiziert. Es lag, ebenso wie im EAE-Modell, bei einer deutlichen Überzahl von T-Helferzellen. Der bestehende Myelinschaden scheint die Zusammensetzung der rekrutierten Immunzellen unter autoimmunen Bedingungen also zumindest nicht auf Ebene der grundlegenden Zelltypen zu beeinflussen. Gerade die in diesen Modellen vorherrschenden T-Helferzellen lassen sich aber noch weiter in verschiedene Subtypen unterteilen (Typ 1, 2, 17, regulatorische T-Helferzellen), deren Verteilung im EAE- und CupEAE-Modell genauer charakterisiert werden muss, um bewerten zu können, wie ähnlich sich die rekrutierten Zellpopulationen sind.

Bemerkenswert ist, dass im CupEAE-Modell aus dem Vorderhirn nicht mehr CD45-positive Zellen aufgereinigt wurden als im EAE-Modell, obwohl eine deutlich erhöhte Zahl von Immunzellen im Vorderhirn beschrieben ist [102]. Möglicherweise werden im CupEAE-Modell nicht absolut mehr Zellen ins Vorderhirn rekrutiert, sondern die Verteilung von Zellen zugunsten von Regionen mit existierenden Myelinschäden verändert sich. Diese Hypothese muss mit Methoden, die die räumliche Verteilung von rekrutierten Immunzellen analysieren können, bewertet werden. Wenn sie sich bestätigt, bietet sich dieses Modell dafür an, die Mechanismen für die Migration von Lymphozyten im ZNS-Parenchym weiter zu untersuchen.

Im Cuprizone-Modell werden in der Literatur zwar Makrophagen und Granulozyten beschrieben, Lymphozytenrekrutierung wurde aber in mehreren Arbeiten ausgeschlossen [79–81]. In zwei weiteren Studien wurden hingegen unter Cuprizone-Behandlung T-Lymphozyten nachgewiesen [77, 78]. Bei einer dieser Arbeiten handelt es sich allerdings um unter Ganzkörperbestrahlung des Tieres generierte Knochenmarkschimären [77]. Die Bestrahlung des Kopfes kann die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen, zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führen und eine Rekrutierung peripherer Monozyten in das Parenchym mit

anschließender Differenzierung in einen Mikroglia-artigen Phänotyp auslösen [180, 181]. Dementsprechend ist unklar, inwieweit Bestrahlung die Lymphozytenrekrutierung unter Cuprizone-Behandlung beeinflussen kann.

In dieser Arbeit wurden T-Lymphozyten durchflusszytometrisch im Vorderhirn und immunhistochemisch im Corpus callosum nachgewiesen. Die Menge war zwar deutlich geringer als im EAE- oder CupEAE-Modell, aber in allen untersuchten Tieren waren T-Lymphozyten im ZNS vorhanden. Wenn sich dieses Ergebnis reproduzieren lässt, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass ein Oligodendrozytenschaden eine spezifische Immunantwort im ZNS auslösen kann und liefert somit ein Argument für die Inside-out-Theorie in der Diskussion um die Pathogenese der MS. Traka et al. konnten bereits zeigen, dass ein massiver induzierter Oligodendrozytenschaden zu starker Lymphozytenrekrutierung ins ZNS und MS-artigen Symptomen führen kann [151]. Die Beobachtungen am reinen Cuprizone-Modell deuten darauf hin, dass auch ein progressiver asymptomatischer Myelinschaden zu leichter Lymphozytenrekrutierung führt.

Das CD4/CD8-Verhältnis zeigte im Gegensatz zum EAE- und CupEAE-Modell im Cuprizone-Modell ein Überwiegen von zytotoxischen T-Zellen gegenüber T-Helferzellen. Diese Beobachtung stützt die These, dass unterschiedliche Demyelinisierungsabläufe auch wesentlich unterschiedliche Reaktionen des Immunsystems auslösen können. Ein Überwiegen von zytotoxischen T-Zellen ist auch Merkmal der Immunzellrekrutierung in humanen MS-Läsionen sowohl in RRMS als auch SPMS. Das Cuprizone-Modell bildet also nicht nur die progressive Demyelinisierung der SPMS ab, sondern zeigt mit einem Überwiegen von zytotoxischen T-Zellen gegenüber T-Helferzellen auch eine qualitativ ähnliche Immunzellrekrutierung wie SPMS. Es ist demnach von großem Interesse, den Mechanismus der spezifischen Immunreaktion im Cuprizone-Modell aufzuklären, indem etwa APZ und Migrationsrouten ins ZNS identifiziert werden. Möglicherweise lassen sich solche Erkenntnisse aus diesem Modell auf die humane MS übertragen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass im toxischen Demyelinisierungsmodell Cuprizone im Vergleich zu den autoimmunen Modellen EAE und CupEAE das Ausmaß der Infiltration von Immunzellen wesentlich geringer ist und das Verhältnis von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen gegensätzlich ist. Dies spricht dafür, dass unterschiedliche Demyelinisierungsmechanismen *in vivo* unterschiedliche Reaktionen des Immunsystems zur Folge haben können.

Um die Frage nach unterschiedlichen Auswirkungen bei verschiedenen Demyelinisierungsursachen weiter zu vertiefen, sollen in weiteren Studien die Myelinproteinprofile in betroffenen Hirnregionen der hier verwendeten Modelle massenspektrometrisch bestimmt werden. Dadurch kann beantwortet werden, ob unterschiedliche Demyelinisierungsmechanismen (autoimmune Reaktion gegen MOG in der abaxonalen Myelinmembran oder ein toxischer mitochondrialer Oligodendrozytenschaden) zu unterschiedlicher Abundanz von Myelinproteinen im Verlauf der Demyelinisierung führen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Funkschilling U, Supplie LM., Mahad D, Boretius S, Saab AS., Edgar J, Brinkmann BG., Kassmann CM., Tzvetanova ID., Mobius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW., Moraes CT., Frahm J, Goebbels S, Nave K-A **Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity.** *Nature* 485(7399):517–521. doi:10.1038/nature11007
2. Suminaite D, Lyons DA., Livesey MR. (2019) **Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function.** *Glia* 67(11):2050–2062. doi:10.1002/glia.23665
3. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M (2019) **Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology.** *Physiol Rev* 99(3):1381–1431. doi:10.1152/physrev.00031.2018
4. Boison D, Bussow H, D'Urso D, Müller H-W, Stoffel W (1995) **Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths.** *J. Neurosci.* 15(8):5502–5513. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-08-05502.1995
5. Bakhti M, Snaidero N, Schneider D, Aggarwal S, Möbius W, Janshoff A, Eckhardt M, Nave K-A, Simons M (2013) **Loss of electrostatic cell-surface repulsion mediates myelin membrane adhesion and compaction in the central nervous system.** *PNAS* 110(8):3143–3148. doi:10.1073/pnas.1220104110
6. Aggarwal S, Snaidero N, Pähler G, Frey S, Sánchez P, Zweckstetter M, Janshoff A, Schneider A, Weil M-T, Schaap IA. T., Görlich D, Simons M (2013) **Myelin Membrane Assembly Is Driven by a Phase Transition of Myelin Basic Proteins Into a Cohesive Protein Meshwork.** *PLOS Biology* 11(6):e1001577. doi:10.1371/journal.pbio.1001577
7. Raasakka A, Ruskamo S, Kowal J, Barker R, Baumann A, Martel A, Tuusa J, Myllykoski M, Bürck J, Ulrich AS., Stahlberg H, Kursula P (2017) **Membrane Association Landscape of Myelin Basic Protein Portrays Formation of the Myelin Major Dense Line.** *Sci Rep* 7(1):1–18. doi:10.1038/s41598-017-05364-3
8. Velumian AA., SamoiloVA M, Fehlings MG. (2011) **Visualization of cytoplasmic diffusion within living myelin sheaths of CNS white matter axons using microinjection of the fluorescent dye Lucifer Yellow.** *Neuroimage* 56(1):27–34. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.11.022
9. Snaidero N, Velte C, Myllykoski M, Raasakka A, Ignatev A, Werner HB., Erwig MS., Möbius W, Kursula P, Nave K-A, Simons M (2017) **Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin.** *Cell Rep* 18(2):314–323. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.053
10. Brunner C, Lassmann H, Wachneldt TV, Matthieu J-M, Linington C (1989) **Differential Ultrastructural Localization of Myelin Basic Protein, Myelin/Oligodendroglial Glycoprotein, and 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase in the CNS of Adult Rats.** *J Neurochem* 52(1):296–304. doi:10.1111/j.1471-4159.1989.tb10930.x

11. Delarasse C, Daubas P, Mars LT., Vizler C, Litzzenburger T, Iglesias A, Bauer J, Della Gaspera B, Schubart A, Decker L, Dimitri D, Roussel G, Dierich A, Amor S, Dautigny A, Liblau R, Pham-Dinh D (2003) **Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice.** *J Clin Invest* 112(4):544–553. doi:10.1172/JCI200315861
12. Sternberger NH., Quarles RH., Itoyama Y, Webster HD. (1979) **Myelin-associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rat.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3):1510–1514
13. Peters A (1966) **The Node of Ranvier in the Central Nervous System.** *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences* 51(3):229–236. doi:10.1113/expphysiol.1966.sp001852
14. Quarles RH. (2007) **Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond.** *J Neurochem* 100(6):1431–1448. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x
15. Dashiell SM., Tanner SL., Pant HC., Quarles RH. (2002) **Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases.** *J Neurochem* 81(6):1263–1272. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00927.x
16. Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, Barbin G, Gunn-Moore F, Denisenko-Nehrbass N, Guennoc A-M, Girault J-A, Brophy PJ., Lubetzki C (2002) **Neurofascin Is a Glial Receptor for the Paranodin/Caspr-Contactin Axonal Complex at the Axoglia Junction.** *Current Biology* 12(3):217–220. doi:10.1016/S0960-9822(01)00680-7
17. Duncan ID., Radcliff AB. (2016) **Inherited and acquired disorders of myelin: The underlying myelin pathology.** *Exp Neurol* 283(Pt B):452–475. doi:10.1016/j.expneurol.2016.04.002
18. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA. (2018) **Multiple sclerosis.** *Nature Reviews Disease Primers* 4(1):43. doi:10.1038/s41572-018-0041-4
19. Kipp M, van der Valk P, Amor S (2012) **Pathology of multiple sclerosis.** *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(5):506–517. doi:10.2174/187152712801661248
20. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H (2017) **An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions.** *Acta Neuropathol* 133(1):13–24. doi:10.1007/s00401-016-1653-y
21. Strijbis E.M.M., Kooi E-J, van der Valk P, Geurts J.J.G. (2017) **Cortical Remyelination Is Heterogeneous in Multiple Sclerosis.** *J Neuropathol Exp Neurol* 76(5):390–401. doi:10.1093/jnen/nlx023
22. Prineas JW., Barnard RO., Kwon EE., Sharer LR., Cho E-S (1993) **Multiple sclerosis: Remyelination of nascent lesions: Remyelination of nascent lesions.** *Ann Neurol* 33(2):137–151. doi:10.1002/ana.410330203
23. Albert M, Antel J, Brück W, Stadelmann C (2007) **Extensive Cortical Remyelination in Patients with Chronic Multiple Sclerosis.** *Brain Pathology* 17(2):129–138. doi:10.1111/j.1750-3639.2006.00043.x

24. Ascherio A, Munger KL. (2016) **Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention—An Update.** *Semin Neurol* 36(02):103–114. doi:10.1055/s-0036-1579693
25. Na S-Y, Cao Y, Toben C, Nitschke L, Stadelmann C, Gold R, Schimpl A, Hünig T (2008) **Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system.** *Brain* 131(Pt 9):2353–2365. doi:10.1093/brain/awn148
26. Nitsch R, Pohl EE., Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F (2004) **Direct Impact of T Cells on Neurons Revealed by Two-Photon Microscopy in Living Brain Tissue.** *J. Neurosci.* 24(10):2458–2464. doi:10.1523/JNEUROSCI.4703-03.2004
27. Genain CP., Cannella B, Hauser SL., Raine CS. (1999) **Identification of Autoantibodies Associated With Myelin Damage in Multiple Sclerosis.** *Nat Med* 5(2). doi:10.1038/5532
28. Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D (2008) **Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions.** *Brain* 131(7):1722–1735. doi:10.1093/brain/awn105
29. Fischer MT., Wimmer I, Höftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Mahad D, Binder CJ., Krumbholz M, Bauer J, Bradl M, Lassmann H (2013) **Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions.** *Brain* 136(6):1799–1815. doi:10.1093/brain/awt110
30. Lassmann H (2018) **Multiple Sclerosis Pathology.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(3):a028936. doi:10.1101/cshperspect.a028936
31. Young NP., Weinshenker BG., Parisi JE., Scheithauer B, Giannini C, Roemer SF., Thomsen KM., Mandrekar JN., Erickson BJ., Lucchinetti CF. (2010) **Perivenous demyelination: association with clinically defined acute disseminated encephalomyelitis and comparison with pathologically confirmed multiple sclerosis.** *Brain* 133(Pt 2):333–348. doi:10.1093/brain/awp321
32. Kuhlmann T, Lassmann H, Brück W (2008) **Diagnosis of inflammatory demyelination in biopsy specimens: a practical approach.** *Acta Neuropathol* 115(3):275–287. doi:10.1007/s00401-007-0320-8
33. Di Pauli F, Mader S, Rostasy K, Schanda K, Bajer-Kornek B, Ehling R, Deisenhammer F, Reindl M, Berger T (2011) **Temporal dynamics of anti-MOG antibodies in CNS demyelinating diseases.** *Clin Immunol* 138(3):247–254. doi:10.1016/j.clim.2010.11.013
34. Gencic S, Abuelo D, Ambler M, Hudson LD. (1989) **Pelizaeus-Merzbacher disease: an X-linked neurologic disorder of myelin metabolism with a novel mutation in the gene encoding proteolipid protein.** *Am J Hum Genet* 45(3):435–442
35. Garbern JY. (2007) **Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis.** *Cell Mol Life Sci* 64(1):50–65. doi:10.1007/s00018-006-6182-8
36. Southwood CM., Garbern J, Jiang W, Gow A (2002) **The Unfolded Protein Response Modulates Disease Severity in Pelizaeus-Merzbacher Disease.** *Neuron* 36(4):585–596

37. Perri ER., Thomas CJ., Parakh S, Spencer DM., Atkin JD. (2015) **The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration.** *Front Cell Dev Biol* 3:80. doi:10.3389/fcell.2015.00080
38. Anderson TJ., Klugmann M, Thompson, C. E., Schneider A, Readhead C, Nave K-A, Griffiths IR. (1999) **Distinct Phenotypes Associated with Increasing Dosage of the PLP Gene: Implications for CMT1A Due to PMP22 Gene Duplication.** *Ann N Y Acad Sci* 883(1):234–246. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08585.x
39. Kagawa T, Ikenaka K, Inoue Y, Kuriyama S, Tsujii T, Nakao J, Nakajima K, Aruga J, Okano H, Mikoshiba K (1994) **Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene.** *Neuron* 13(2):427–442. doi:10.1016/0896-6273(94)90358-1
40. Boison D, Stoffel W (1994) **Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(24):11709–11713
41. Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH., Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. (1998) **Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin.** *Science* 280(5369):1610–1613. doi:10.1126/science.280.5369.1610
42. Osorio-Querejeta I, Saenz-Cuesta M, Munoz-Culla M, Otaegui D (2017) **Models for Studying Myelination, Demyelination and Remyelination.** *Neuromolecular Med* 19(2-3):181–192. doi:10.1007/s12017-017-8442-1
43. D'Arrigo P, Servi S (2010) **Synthesis of lysophospholipids.** *Molecules* 15(3):1354–1377. doi:10.3390/molecules15031354
44. Hall SM. (1972) **The Effect of Injections of Lysophosphatidyl Choline into White Matter of the Adult Mouse Spinal Cord.** *J Cell Sci* 10(2):535–546
45. Plemel JR., Michaels NJ., Weishaupt N, Caprariello AV., Keough MB., Rogers JA., Yukseloglu A, Lim J, Patel VV., Rawji KS., Jensen SK., Teo W, Heyne B, Whitehead SN., Stys PK., Yong VWee (2018) **Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: A primary lipid disrupting myelinopathy.** *Glia* 66(2):327–347. doi:10.1002/glia.23245
46. Schultz V, van der Meer F, Wrzos C, Scheidt U, Bahn E, Stadelmann C, Brück W, Junker A (2017) **Acutely damaged axons are remyelinated in multiple sclerosis and experimental models of demyelination.** *Glia* 65(8):1350–1360. doi:10.1002/glia.23167
47. Woodruff RH., Franklin RJ. M. (1999) **Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study.** *Glia* 25(3):216–228. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(19990201)25:3<216::AID-GLIA2>3.0.CO;2-L
48. Stoppini L, Buchs PA., Muller D (1991) **A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.** *Journal of Neuroscience Methods* 37(2):173–182
49. Doussau F, Dupont J-L, Neel D, Schneider A, Poulain B, Bossu JLouis (2017) **Organotypic cultures of cerebellar slices as a model to investigate**

- demyelinating disorders.** *Expert Opin Drug Discov* 12(10):1011–1022. doi:10.1080/17460441.2017.1356285
50. Notterpek LM., Bullock PN., Malek-Hedayat S, Fisher R, Rome LH. (1993) **Myelination in cerebellar slice cultures: development of a system amenable to biochemical analysis.** *J Neurosci Res* 36(6):621–634. doi:10.1002/jnr.490360603
51. Birgbauer E, Rao TS., Webb M (2004) **Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system.** *J Neurosci Res* 78(2):157–166. doi:10.1002/jnr.20248
52. Zhang H, Jarjour AA., Boyd A, Williams A (2011) **Central nervous system remyelination in culture--a tool for multiple sclerosis research.** *Exp Neurol* 230(1):138–148. doi:10.1016/j.expneurol.2011.04.009
53. Liu L, Spangler LC., Prager B, Benson B, Hu B, Shi S, Love A, Zhang C, Yu M, Cotleur AC., Ransohoff RM. (2015) **Spatiotemporal ablation of CXCR2 on oligodendrocyte lineage cells: Role in myelin repair.** *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2(6):e174. doi:10.1212/NXI.0000000000000174
54. Llufríu-Dabén G, Carrete A, Chierito E, Mailleux J, Camand E, Simon A, Vanmierlo T, Rose C, Allinquant B, Hendriks JJ. A., Massaad C, Meffre D, Jafarian-Tehrani M (2018) **Targeting demyelination via  $\alpha$ -secretases promoting sAPP $\alpha$  release to enhance remyelination in central nervous system.** *Neurobiol Dis* 109(Pt A):11–24. doi:10.1016/j.nbd.2017.09.008
55. O'Sullivan C, Schubart A, Mir AK., Dev KK. (2016) **The dual S1PR1/S1PR5 drug BAF312 (Siponimod) attenuates demyelination in organotypic slice cultures.** *J Neuroinflammation* 13:31. doi:10.1186/s12974-016-0494-x
56. Hiremath MM., Saito Y, Knapp GW., Ting JP., Suzuki K, Matsushima GK. (1998) **Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice.** *J Neuroimmunol* 92(1-2):38–49. doi:10.1016/s0165-5728(98)00168-4
57. Johnson ES., Ludwin SK. (1981) **The demonstration of recurrent demyelination and remyelination of axons in the central nervous system.** *Acta Neuropathol* 53(2):93–98. doi:10.1007/bf00689988
58. Schmidt T, Awad H, Slowik A, Beyer C, Kipp M, Clarner T (2013) **Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: topographical aspects of the midline of the corpus callosum.** *J Mol Neurosci* 49(1):80–88. doi:10.1007/s12031-012-9896-0
59. Chrzanowski U, Schmitz C, Horn-Bochtler A, Nack A, Kipp M (2019) **Evaluation strategy to determine reliable demyelination in the cuprizone model.** *Metab Brain Dis.* doi:10.1007/s11011-018-0375-3
60. Groebe A, Clarner T, Baumgartner W, Dang J, Beyer C, Kipp M (2009) **Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrogliosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum.** *Cerebellum* 8(3):163–174. doi:10.1007/s12311-009-0099-3
61. Koutsoudaki PN., Skripuletz T, Gudi V, Moharregh-Khiabani D, Hildebrandt H, Trebst C, Stangel M (2009) **Demyelination of the hippocampus is prominent in**

- the cuprizone model.** *Neurosci Lett* 451(1):83–88. doi:10.1016/j.neulet.2008.11.058
62. Pott F, Gingele S, Clarner T, Dang J, Baumgartner W, Beyer C, Kipp M (2009) **Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia.** *Brain Res* 1305:137–149. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.084
63. Wagenknecht N, Becker B, Scheld M, Beyer C, Clarner T, Hochstrasser T, Kipp M (2016) **Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models.** *J Mol Neurosci* 60(1):102–114. doi:10.1007/s12031-016-0790-z
64. Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M (2008) **Cortical Demyelination Is Prominent in the Murine Cuprizone Model and Is Strain-Dependent.** *Am J Pathol* 172(4):1053–1061. doi:10.2353/ajpath.2008.070850
65. Herder V, Hansmann F, Stangel M, Skripuletz T, Baumgärtner W, Beineke A (2011) **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.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 37(6):676–684. doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01168.x
66. Hesse A, Wagner M, Held J, Brück W, Salinas-Riester G, Hao Z, Waisman A, Kuhlmann T (2010) **In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent.** *Neurobiol Dis* 37(2):362–369. doi:10.1016/j.nbd.2009.10.016
67. Kumar N (2006) **Copper Deficiency Myelopathy (Human Swayback).** *Mayo Clinic Proceedings* 81(10):1371–1384. doi:10.4065/81.10.1371
68. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, van der Linden A, Ponsaerts P (2014) **Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis.** *Neurosci Biobehav Rev* 47:485–505. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.10.004
69. Bénardais K, Kotsiari A, Skuljec J, Koutsoudaki PN., Gudi V, Singh V, Vulinović F, Skripuletz T, Stangel M (2013) **Cuprizone bis(cyclohexylidenehydrazide) is selectively toxic for mature oligodendrocytes.** *Neurotox Res* 24(2):244–250. doi:10.1007/s12640-013-9380-9
70. Zhan J, Mann T, Joost S, Behrangi N, Frank M, Kipp M (2020) **The Cuprizone Model: Dos and Do Nots.** *Cells* 9(4):843. doi:10.3390/cells9040843
71. Skripuletz T, Hackstette D, Bauer K, Gudi V, Pul R, Voss E, Berger K, Kipp M, Baumgärtner W, Stangel M (2013) **Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination.** *Brain* 136(Pt 1):147–167. doi:10.1093/brain/aws262
72. Höflich KM., Beyer C, Clarner T, Schmitz C, Nyamoya S, Kipp M, Hochstrasser T (2016) **Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach.** *Brain Res* 1650:125–133. doi:10.1016/j.brainres.2016.08.048
73. Islam MS., Tatsumi K, Okuda H, Shiosaka S, Wanaka A (2009) **Olig2-expressing progenitor cells preferentially differentiate into oligodendrocytes in**

- cuprizone-induced demyelinated lesions.** *Neurochemistry International* 54(3):192–198. doi:10.1016/j.neuint.2008.10.011
74. Voß EV., Škuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, Stangel M (2012) **Characterisation of microglia during de- and remyelination: Can they create a repair promoting environment?** *Neurobiol Dis* 45(1):519–528. doi:10.1016/j.nbd.2011.09.008
75. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M (2014) **Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned.** *Front Cell Neurosci* 8:73. doi:10.3389/fncel.2014.00073
76. Liu L, Belkadi A, Darnall L, Hu T, Drescher C, Cotleur, Cotleur AC., He T, Choi K, Lane TE., Miller RH., Ransohoff RM. (2010) **CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: relevance to multiple sclerosis.** *Nat Neurosci* 13(3):319–326. doi:10.1038/nn.2491
77. McMahon EJ., Suzuki K, Matsushima GK. (2002) **Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood–brain barrier.** *Journal of Neuroimmunology* 130(1):32–45. doi:10.1016/S0165-5728(02)00205-9
78. Remington LT., Babcock AA., Zehntner SP., Owens T (2007) **Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination.** *Am J Pathol* 170(5):1713–1724. doi:10.2353/ajpath.2007.060783
79. Cerina M, Narayanan V, Göbel K, Bittner S, Ruck T, Meuth P, Herrmann AM., Stangel M, Gudi V, Skripuletz T, Daldrup T, Wiendl H, Seidenbecher T, Ehling P, Kleinschnitz C, Pape H-C, Budde T, Meuth SG. (2017) **The quality of cortical network function recovery depends on localization and degree of axonal demyelination.** *Brain Behav Immun* 59:103–117. doi:10.1016/j.bbi.2016.08.014
80. Tejedor LS., Wostradowski T, Gingele S, Skripuletz T, Gudi V, Stangel M (2017) **The Effect of Stereotactic Injections on Demyelination and Remyelination: a Study in the Cuprizone Model.** *J Mol Neurosci* 61(4):479–488. doi:10.1007/s12031-017-0888-y
81. Wergeland S, Torkildsen Ø, Myhr K-M, Mørk Sjarl, Bø L (2012) **The cuprizone model: regional heterogeneity of pathology.** *APMIS* 120(8):648–657. doi:10.1111/j.1600-0463.2012.02882.x
82. O'Dell BL. (1993) **Interleukin-2 production is altered by copper deficiency.** *Nutr Rev* 51(10):307–309. doi:10.1111/j.1753-4887.1993.tb03062.x
83. Solti I, Kvell K, Talaber G, Veto S, Acs P, Gallyas F, Illes Z, Fekete K, Zalan P, Szanto A, Bogнар Z (2015) **Thymic Atrophy and Apoptosis of CD4+CD8+ Thymocytes in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis.** *PLoS One* 10(6):e0129217. doi:10.1371/journal.pone.0129217
84. Sen MK., Almuslehi MS. M., Gyengesi E, Myers SJ., Shortland PJ., Mahns DA., Coorssen JR. (2019) **Suppression of the Peripheral Immune System Limits the Central Immune Response Following Cuprizone-Feeding: Relevance to Modelling Multiple Sclerosis.** *Cells* 8(11). doi:10.3390/cells8111314
85. Bakker DA., Ludwin SK. (1987) **Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination: Implications for the pathogenesis of**

- immune-mediated demyelinating diseases.** *Journal of the Neurological Sciences* 78(2):125–137. doi:10.1016/0022-510X(87)90055-4
86. Kondo A, Nakano T, Suzuki K (1987) **Blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in twitcher and cuprizone-intoxicated mice.** *Brain Res* 425(1):186–190. doi:10.1016/0006-8993(87)90499-9
87. Berghoff SA., Gerndt N, Winchenbach J, Stumpf SK., Hosang L, Odoardi F, Ruhwedel T, Böhler C, Barrette B, Stassart R, Liebetanz D, Dibaj P, Möbius W, Edgar JM., Saher G (2017) **Dietary cholesterol promotes repair of demyelinated lesions in the adult brain.** *Nat Commun* 8(1):1–15. doi:10.1038/ncomms14241
88. Berghoff SA., Düking T, Spieth L, Winchenbach J, Stumpf SK., Gerndt N, Kusch K, Ruhwedel T, Möbius W, Saher G (2017) **Blood-brain barrier hyperpermeability precedes demyelination in the cuprizone model.** *Acta Neuropathol Commun* 5. doi:10.1186/s40478-017-0497-6
89. Shelestak J, Singhal N, Frankle L, Tomor R, Sternbach S, McDonough J, Freeman E, Clements R (2020) **Increased blood-brain barrier hyperpermeability coincides with mast cell activation early under cuprizone administration.** *PLoS One* 15(6):e0234001. doi:10.1371/journal.pone.0234001
90. Glatigny S, Bettelli E (2018) **Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS).** *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(11):a028977. doi:10.1101/cshperspect.a028977
91. Mendel I, Kerlero de Rosbo, Nicole, Ben-Nun A (1995) **A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor V $\beta$  expression of encephalitogenic T cells.** *Eur J Immunol* 25(7):1951–1959. doi:10.1002/eji.1830250723
92. Clarkson BD., Walker A, Harris M, Rayasam A, Sandor M, Fabry Z (2014) **Mapping the accumulation of co-infiltrating CNS dendritic cells and encephalitogenic T cells during EAE.** *J Neuroimmunol* 277(1-2):39–49. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.09.016
93. Brown DA., Sawchenko PE. (2007) **Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Comp Neurol* 502(2):236–260. doi:10.1002/cne.21307
94. Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM., Bruck W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M (2011) **A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis.** *Nat Med* 17(4):495–499. doi:10.1038/nm.2324
95. Lassmann H, Bradl M (2017) **Multiple sclerosis: experimental models and reality.** *Acta Neuropathol* 133(2):223–244. doi:10.1007/s00401-016-1631-4
96. Bando Y (2015) **Myelin morphology and axon pathology in demyelination during experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Neural Regen Res* 10(10):1584–1585. doi:10.4103/1673-5374.165287
97. Duarte J, Carrié N, Oliveira VG., Almeida C, Agua-Doce A, Rodrigues L, Simas JPedro, Mars LT., Graca L (2012) **T cell apoptosis and induction of Foxp3+**

- regulatory T cells underlie the therapeutic efficacy of CD4 blockade in experimental autoimmune encephalomyelitis.** *The Journal of Immunology* 189(4):1680–1688. doi:10.4049/jimmunol.1201269
98. Caravagna C, Jaouën A, Desplat-Jégo S, Fenrich KK., Bergot E, Luche H, Grenot P, Rougon G, Malissen M, Debarbieux F (2018) **Diversity of innate immune cell subsets across spatial and temporal scales in an EAE mouse model.** *Sci Rep* 8(1):1–16. doi:10.1038/s41598-018-22872-y
99. Mundt S, Mrdjen D, Utz SG., Greter M, Schreiner B, Becher B (2019) **Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation.** *Sci Immunol* 4(31). doi:10.1126/sciimmunol.aau8380
100. Leuenberger T, Paterka M, Reuter E, Herz J, Niesner RA., Radbruch H, Bopp T, Zipp F, Siffrin V (2013) **The Role of CD8+ T Cells and Their Local Interaction with CD4+ T Cells in Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein35–55–Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.** *The Journal of Immunology* 191(10):4960–4968. doi:10.4049/jimmunol.1300822
101. Rumble JM., Huber AK., Krishnamoorthy G, Srinivasan A, Giles DA., Zhang X, Wang L, Segal BM. (2015) **Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS.** *J Exp Med* 212(1):23–35. doi:10.1084/jem.20141015
102. Rüther BJ., Scheld M, Drey Mueller D, Clarner T, Kress E, Brandenburg L-O, Swartenbroekx T, Hoornaert C, Ponsaerts P, Fallier-Becker P, Beyer C, Rohr SO., Schmitz C, Chrzanowski U, Hochstrasser T, Nyamoya S, Kipp M (2017) **Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression.** *Glia* 65(12):1900–1913. doi:10.1002/glia.23202
103. Pierson ER., Stromnes IM., Goverman JM. (2014) **B Cells Promote Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Facilitating Reactivation of T Cells in the Central Nervous System.** *The Journal of Immunology* 192(3):929–939. doi:10.4049/jimmunol.1302171
104. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J-D, Fujimoto M, Tedder TF. (2008) **Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression.** *J Clin Invest* 118(10):3420–3430. doi:10.1172/JCI36030
105. Bennett J, Basivireddy J, Kollar A, Biron KE., Reickmann P, Jefferies WA., McQuaid S (2010) **Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE.** *Journal of Neuroimmunology* 229(1-2):180–191. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.011
106. Fabis MJ., Scott GS., Kean RB., Koprowski H, Hooper DC. (2007) **Loss of blood-brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models.** *PNAS* 104(13):5656–5661. doi:10.1073/pnas.0701252104
107. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S (2017) **Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective.** *Brain Pathol* 27(2):123–137. doi:10.1111/bpa.12454

108. Scheld M, Rüther BJ., Große-Veldmann R, Ohl K, Tenbrock K, Dreytm  ller D, Fallier-Becker P, Zendedel A, Beyer C, Clarner T, Kipp M (2016) **Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain.** *J Neurosci* 36(4):1410–1415. doi:10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016
109. Chrzanowski U, Bhattarai S, Scheld M, Clarner T, Fallier-Becker P, Beyer C, Rohr SOlaf, Schmitz C, Hochstrasser T, Schweiger F, Amor S, Horn-Bochtler A, Denecke B, Nyamoya S, Kipp M (2019) **Oligodendrocyte degeneration and concomitant microglia activation directs peripheral immune cells into the forebrain.** *Neurochemistry International* 126:139–153. doi:10.1016/j.neuint.2019.03.005
110. Yatim KM., Lakkis FG. (2015) **A Brief Journey through the Immune System.** *CJASN* 10(7):1274–1281. doi:10.2215/CJN.10031014
111. Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z (2004) **Initiation of Immune Responses in Brain Is Promoted by Local Dendritic Cells.** *The Journal of Immunology* 173(4):2353–2361. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2353
112. Vos AF. de, van Meurs M, Brok HP., Boven LA., Hintzen RQ., van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, Hart BA. 't, Laman JD. (2002) **Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs.** *J Immunol* 169(10):5415–5423. doi:10.4049/jimmunol.169.10.5415
113. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ., Eccles JD., Rouhani SJ., Peske JDavid, Derecki NC., Castle D, Mandell JW., Lee KS., Harris TH., Kipnis J (2015) **Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels.** *Nature* 523(7560):337–341. doi:10.1038/nature14432
114. Prineas JW. (1979) **Multiple sclerosis: presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord.** *Science* 203(4385):1123–1125. doi:10.1126/science.424741
115. Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, Armstrong D (2004) **Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species.** *Cerebrospinal Fluid Res* 1:2. doi:10.1186/1743-8454-1-2
116. Jessen NA., Munk AS. F., Lundgaard I, Nedergaard M (2015) **The Glymphatic System: A Beginner's Guide.** *Neurochem Res* 40(12):2583–2599. doi:10.1007/s11064-015-1581-6
117. Engelhardt B, Carare RO., Bechmann I, Flügel A, Laman JD., Weller RO. (2016) **Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system.** *Acta Neuropathol* 132(3):317–338. doi:10.1007/s00401-016-1606-5
118. Pestic M, Bartholom  us I, Kyratsous NI., Heissmeyer V, Wekerle H, Kawakami N (2013) **2-photon imaging of phagocyte-mediated T cell activation in the CNS.** *J Clin Invest* 123(3):1192–1201. doi:10.1172/JCI67233
119. Mues M, Bartholom  us I, Thestrup T, Griesbeck O, Wekerle H, Kawakami N, Krishnamoorthy G (2013) **Real-time in vivo analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator.** *Nat Med* 19(6):778–783. doi:10.1038/nm.3180

120. Strominger I, Elyahu Y, Berner O, Reckhow J, Mittal K, Nemirovsky A, Monsonogo A (2018) **The Choroid Plexus Functions as a Niche for T-Cell Stimulation Within the Central Nervous System.** *Front Immunol* 9:1066. doi:10.3389/fimmu.2018.01066
121. Greter M, Heppner FL., Lemos MP., Odermatt BM., Goebels N, Laufer T, Noelle RJ., Becher B (2005) **Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis.** *Nat Med* 11(3):328–334. doi:10.1038/nm1197
122. Cash E, Zhang Y, Rott O (1993) **Microglia Present Myelin Antigens to T Cells after Phagocytosis of Oligodendrocytes.** *Cellular Immunology* 147(1):129–138. doi:10.1006/cimm.1993.1053
123. Heppner FL., Greter M, Marino D, Falsig J, Gennadij Raivich G, Nadine Hövelmeyer N, Waisman A, Rülcke T, Marco Prinz M, Priller J, Becher B, Aguzzi A (2005) **Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis.** *Nat Med* 11(2):146–152. doi:10.1038/nm1177
124. Mrdjen D, Pavlovic A, Hartmann FJ., Schreiner B, Utz SG., Leung BP., Lelios I, Heppner FL., Kipnis J, Merkler D, Greter M, Becher B (2018) **High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease.** *Immunity* 48(3):599. doi:10.1016/j.immuni.2018.02.014
125. Polfliet MMJ, van de Veerdonk F, Döpp EA., van Kesteren-Hendriks EM.L, van Rooijen N, Dijkstra CD., van den Berg TK. (2002) **The role of perivascular and meningeal macrophages in experimental allergic encephalomyelitis.** *Journal of Neuroimmunology* 122(1):1–8. doi:10.1016/S0165-5728(01)00445-3
126. Stüve O, Youssef S, Slavin AJ., King CL., Patarroyo JC., Hirschberg DL., Brickey WJ., Soos JM., Piskurich JF., Chapman HA., Zamvil SS. (2002) **The Role of the MHC Class II Transactivator in Class II Expression and Antigen Presentation by Astrocytes and in Susceptibility to Central Nervous System Autoimmune Disease.** *The Journal of Immunology* 169(12):6720–6732. doi:10.4049/jimmunol.169.12.6720
127. Wheway J, Obeid S, Couraud P-O, Combes V, Grau GE. R. (2013) **The Brain Microvascular Endothelium Supports T Cell Proliferation and Has Potential for Alloantigen Presentation.** *PLOS ONE* 8(1):e52586. doi:10.1371/journal.pone.0052586
128. Lopes Pinheiro MA., Kamermans A, Garcia-Vallejo JJ., van het Hof B, Wiertz L, O' T, Toole, Boeve D, Verstege M, van der Pol SM. A., van Kooyk Y, Vries HE. de, Unger WWj (2016) **Internalization and presentation of myelin antigens by the brain endothelium guides antigen-specific T cell migration.** *eLife Sciences Publications, Ltd*
129. Schetters ST. T., Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ., van Kooyk Y (2017) **Neuroinflammation: Microglia and T Cells Get Ready to Tango.** *Front Immunol* 8:1905. doi:10.3389/fimmu.2017.01905

130. Engelhardt B, Ransohoff RM. (2012) **Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood–brain barriers.** Trends in Immunology 33(12):579–589. doi:10.1016/j.it.2012.07.004
131. Hickey WF., Hsu BL., Kimura H (1991) **T-lymphocyte entry into the central nervous system.** J Neurosci Res 28(2):254–260. doi:10.1002/jnr.490280213
132. Vajkoczy P, Laschinger M, Engelhardt B (2001)  **$\alpha$ 4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein–independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels.** J Clin Invest 108(4):557–565. doi:10.1172/JCI12440
133. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW., Klinkert WE. F., Flügel-Koch C, Issekutz TB., Wekerle H, Flügel A (2009) **Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions.** Nature 462(7269):94–98. doi:10.1038/nature08478
134. Lodygin D, Odoardi F, Schlager C, Korner H, Kitz A, Nosov M, van den Brandt J, Reichardt HM., Haberl M, Flügel A (2013) **A combination of fluorescent NFAT and H2B sensors uncovers dynamics of T cell activation in real time during CNS autoimmunity.** Nat Med 19(6):784–790. doi:10.1038/nm.3182
135. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM. (2006) **Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis.** undefined
136. Toft-Hansen H, Buist R, Sun X-J, Schellenberg A, Peeling J, Owens T (2006) **Metalloproteinases Control Brain Inflammation Induced by Pertussis Toxin in Mice Overexpressing the Chemokine CCL2 in the Central Nervous System.** The Journal of Immunology 177(10):7242–7249. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7242
137. Schläger C, Körner H, Krueger M, Vidoli S, Haberl M, Mielke D, Brylla E, Issekutz T, Cabañas C, Nelson PJ., Ziemssen T, Rohde V, Bechmann I, Lodygin D, Odoardi F, Flügel A (2016) **Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid.** Nature 530(7590):349–353. doi:10.1038/nature16939
138. Tumani H, Huss A, Bachhuber F (2017) **The cerebrospinal fluid and barriers - anatomic and physiologic considerations.** Handb Clin Neurol 146:21–32. doi:10.1016/B978-0-12-804279-3.00002-2
139. Llovera G, Benakis C, Enzmann G, Cai R, Arzberger T, Ghasemigharagoz A, Mao X, Malik R, Lazarevic I, Liebscher S, Ertürk A, Meissner L, Vivien D, Haffner C, Plesnila N, Montaner J, Engelhardt B, Liesz A (2017) **The choroid plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke.** Acta Neuropathol 134(6):851–868. doi:10.1007/s00401-017-1758-y
140. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F (2009) **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 10(5):514–523. doi:10.1038/ni.1716

141. Marteyn A, van Evercooren A, Baron (2016) **Is involvement of inflammation underestimated in Pelizaeus–Merzbacher disease?** *J Neurosci Res* 94(12):1572–1578. doi:10.1002/jnr.23931
142. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR., Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, Bien CG., Bauer J, Lassmann H (2018) **The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells.** *Brain* 141(7):2066–2082. doi:10.1093/brain/awy151
143. Frischer JM., Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF., Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen P, Soelberg, Lassmann H (2009) **The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains.** *Brain* 132(Pt 5):1175–1189. doi:10.1093/brain/awp070
144. Friese MA., Fugger L (2009) **Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis.** *Ann Neurol* 66(2):132–141. doi:10.1002/ana.21744
145. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Capello E, Mancardi GL, Aloisi F (2006) **Dendritic Cells in Multiple Sclerosis Lesions: Maturation Stage, Myelin Uptake, and Interaction With Proliferating T Cells.** *J Neuropathol Exp Neurol* 65(2):124–141. doi:10.1093/jnen/65.2.124
146. Pashenkov M, Huang Y-M, Kostulas V, Haglund M, Söderström M, Link H (2001) **Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid.** *Brain* 124(3):480–492. doi:10.1093/brain/124.3.480
147. Kostic M, Dzopalic T, Zivanovic S, Zivkovic N, Cvetanovic A, Stojanovic I, Vojinovic S, Marjanovic G, Savic V, Colic M (2014) **IL-17 and Glutamate Excitotoxicity in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis.** *Scandinavian Journal of Immunology* 79(3):181–186. doi:10.1111/sji.12147
148. Aubé B, Lévesque SA., Paré A, Chamma É, Kébir H, Gorina R, Lécuyer M-A, Alvarez JI., Koninck Y, De, Engelhardt B, Prat A, Côté D, Lacroix S (2014) **Neutrophils Mediate Blood–Spinal Cord Barrier Disruption in Demyelinating Neuroinflammatory Diseases.** *The Journal of Immunology* 193(5):2438–2454. doi:10.4049/jimmunol.1400401
149. Stys PK., Zamponi GW., van Minnen J, Geurts JJ. G. (2012) **Will the real multiple sclerosis please stand up?** *Nat Rev Neurosci* 13(7):507–514. doi:10.1038/nrn3275
150. Caprariello AV., Stys PK. (2019) **Turned Inside Out: Will Myelin-Protective Therapies Become the Next-Generation Anti-Inflammatories?** *DNA Cell Biol* 38(3):219–222. doi:10.1089/dna.2018.4496
151. Traka M, Podojil JR., McCarthy DP., Miller SD., Popko B (2016) **Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination.** *Nat Neurosci* 19(1):65–74. doi:10.1038/nn.4193
152. Caprariello AV., Rogers JA., Morgan ML., Hoghooghi V, Plemel JR., Koebel A, Tsutsui S, Dunn JF., Kotra LP., Ousman SS., Wee Yong V, Stys PK. (2018) **Biochemically altered myelin triggers autoimmune demyelination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(21):5528–5533. doi:10.1073/pnas.1721115115
153. Schindler J, Lewandrowski U, Sickmann A, Friauf E (2008) **Aqueous polymer two-phase systems for the proteomic analysis of plasma membranes from minute brain samples.** *J Proteome Res* 7(1):432–442. doi:10.1021/pr0704736

154. Wiśniewski JR., Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009) **Universal sample preparation method for proteome analysis.** *Nat Methods* 6(5):359–362. doi:10.1038/nmeth.1322
155. Silva JC., Gorenstein MV., Li G-Z, Vissers JP. C., Geromanos SJ. (2006) **Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition.** *Mol Cell Proteomics* 5(1):144–156. doi:10.1074/mcp.M500230-MCP200
156. Jahn O, Tenzer S, Werner HB. (2009) **Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath.** *Mol Neurobiol* 40(1):55–72. doi:10.1007/s12035-009-8071-2
157. Sawamoto K, Nakao N, Kobayashi K, Matsushita N, Takahashi H, Kakishita K, Yamamoto A, Yoshizaki T, Terashima T, Murakami F, Itakura T, Okano H (2001) **Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6423–6428. doi:10.1073/pnas.111152398
158. Joost S, Kobayashi K, Wree A, Haas S Jean-Pierre (2017) **Optimisation of murine organotypic slice culture preparation for a novel sagittal-frontal co-culture system.** *Journal of Neuroscience Methods.* doi:10.1016/j.jneumeth.2017.05.003
159. Meffre D, Massaad C, Grenier J (2015) **Lithium chloride stimulates PLP and MBP expression in oligodendrocytes via Wnt/ $\beta$ -catenin and Akt/CREB pathways.** *Neuroscience* 284:962–971. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.064
160. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJames, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.** *Nat Methods* 9(7):676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
161. Kennedy HS., Jones C, Caplazi P (2013) **Comparison of standard laminectomy with an optimized ejection method for the removal of spinal cords from rats and mice.** *J Histotechnol* 36(3):86–91. doi:10.1179/014788813X13756994210382
162. Baumann N, Pham-Dinh D (2001) **Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system.** *Physiol Rev* 81(2):871–927. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.871
163. Snaidero N, Simons M (2014) **Myelination at a glance.** *J Cell Sci* 127(Pt 14):2999–3004. doi:10.1242/jcs.151043
164. Son AI., Fu X, Suto F, Liu JS., Hashimoto-Torii K, Torii M (2017) **Proteome dynamics during postnatal mouse corpus callosum development.** *Scientific Reports* 7:45359. doi:10.1038/srep45359
165. Ishii A, Dutta R, Wark GM., Hwang S-I, Han DK., Trapp BD., Pfeiffer SE., Bansal R (2009) **Human myelin proteome and comparative analysis with mouse myelin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34):14605–14610. doi:10.1073/pnas.0905936106
166. Monasterio-Schrader P de, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP., Patzig J, Werner HB. (2012) **Systematic approaches to central nervous system myelin.** *Cell Mol Life Sci* 69(17):2879–2894. doi:10.1007/s00018-012-0958-9

167. Panfoli I, Bruschi M, Santucci L, Calzia D, Ravera S, Petretto A, Candiano G (2014) **Myelin proteomics: the past, the unexpected and the future.** *Expert Rev Proteomics* 11(3):345–354. doi:10.1586/14789450.2014.900444
168. Maccarrone G, Nischwitz S, Deiningner S-O, Hornung J, König FBarbara, Stadelmann C, Turck CW., Weber F (2017) **MALDI imaging mass spectrometry analysis-A new approach for protein mapping in multiple sclerosis brain lesions.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1047:131–140. doi:10.1016/j.jchromb.2016.07.001
169. Han MH., Hwang S-I, Roy DB., Lundgren DH., Price JV., Ousman SS., Fernald GHaskin, Gerlitz B, Robinson WH., Baranzini SE., Grinnell BW., Raine CS., Sobel RA., Han DK., Steinman L (2008) **Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets.** *Nature* 451(7182):1076–1081. doi:10.1038/nature06559
170. Miron VE., Ludwin SK., Darlington PJ., Jarjour AA., Soliven B, Kennedy TE., Antel JP. (2010) **Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices.** *Am J Pathol* 176(6):2682–2694. doi:10.2353/ajpath.2010.091234
171. Luo F, Burke K, Kantor C, Miller RH., Yang Y (2014) **Cyclin-dependent kinase 5 mediates adult OPC maturation and myelin repair through modulation of Akt and GSK-3 $\beta$  signaling.** *J Neurosci* 34(31):10415–10429. doi:10.1523/JNEUROSCI.0710-14.2014
172. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS., Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006) **Remyelination Is Extensive in a Subset of Multiple Sclerosis Patients.** *Brain* 129(Pt 12). doi:10.1093/brain/awl217
173. Hooijmans CR., Hlavica M, Schuler F af, Good N, Good A, Baumgartner L, Galeno G, Schneider MP., Jung T, Vries R de, Ineichen BV. (2019) **Remyelination promoting therapies in multiple sclerosis animal models: a systematic review and meta-analysis.** *Sci Rep* 9(1):1–17. doi:10.1038/s41598-018-35734-4
174. Llufríu-Daben G, Meffre D, Massaad C, Jafarian-Tehrani M (2019) **A novel model of trauma-induced cerebellar injury and myelin loss in mouse organotypic cerebellar slice cultures using live imaging.** *Journal of Neuroscience Methods* 311:385–393. doi:10.1016/j.jneumeth.2018.09.023
175. Sedgwick JD., Schwender S, Imrich H, Dörries R, Butcher GW., ter Meulen V (1991) **Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16):7438–7442
176. Kondo Y, Duncan ID. (2009) **Selective reduction in microglia density and function in the white matter of colony-stimulating factor-1-deficient mice.** *J Neurosci Res* 87(12):2686–2695. doi:10.1002/jnr.22096
177. Haas AH. de, Boddeke H, Biber K (2008) **Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS.** *Glia* 56(8):888–894. doi:10.1002/glia.20663

- 
- 178.Chistiakov DA., Killingsworth MC., Myasoedova VA., Orekhov AN., Bobryshev YV. (2017) **CD68/macrosialin: not just a histochemical marker.** Lab Invest 97(1):4–13. doi:10.1038/labinvest.2016.116
- 179.Amanzada A, Malik IA., Blaschke M, Khan S, Rahman H, Ramadori G, Moriconi F (2013) **Identification of CD68(+) Neutrophil Granulocytes in in Vitro Model of Acute Inflammation and Inflammatory Bowel Disease.** International journal of clinical and experimental pathology 6(4)
- 180.Yuan H, Gaber MW, McColgan T, Naimark MD., Kiani MF., Merchant TE. (2003) **Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood–brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies.** Brain Res 969(1-2):59–69. doi:10.1016/S0006-8993(03)02278-9
- 181.Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch U-K, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M (2007) **Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions.** Nat Neurosci 10(12):1544–1553. doi:10.1038/nn2015

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ADEM.....	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
APZ .....	Antigen-präsentierende Zelle
CNPase.....	2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
CPu .....	Caudate-Putamen-Komplex
Cup .....	Cuprizone
CupEAE .....	Kombinationsmodell aus Cuprizone-Behandlung und EAE
DAB.....	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI .....	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DIV.....	Tag in Kultur
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EAE.....	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS .....	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS .....	Fetales Kälberserum
FELASA .....	Federation of European Laboratory Animal Science Associatons
FSC .....	Vorwärtsstreulicht
GFAP.....	Gliales fibrilläres saures Protein
GFP .....	Grün fluoreszierendes Protein
HBSS .....	Hank's Balanced Salt Solution
HE .....	Hämalaun-Eosin
Ktrl.....	Kontrolle
LFB.....	Luxol Fast Blue
LPC.....	Lysophosphatidylcholin
MACS.....	Magnetische Zellseparation
MAG.....	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAP2 .....	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MBP.....	Basisches Myelinprotein
MEM .....	Modified Eagle's Medium
MHC II .....	Major Histocompatibility Complex II
MOG .....	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
MS.....	Multiple Sklerose
OB.....	Bulbus olfactorius
PAS.....	Perjodsäure-Schiff

---

PBS .....	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-GTA.....	PBS-Gelatine-Triton X-Azid-Lösung
PLP .....	Proteolipid-Protein
PTX .....	Pertussistoxin
Px .....	postnataler Tag x
RRMS .....	Relapse-remitting MS
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
SN .....	Substantia nigra pars compacta
SPMS .....	Sekundär progressive MS
SSC.....	Seitwärtsstreulicht
TH.....	Tyrosinhydroxylase
TH-GFP.....	GFP-Expression unter Kontrolle des TH-Promotors
TRIS.....	Trishydroxymethylaminomethan
ZNS .....	Zentralnervensystem

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Myelinproteine .....	4
Abbildung 2: Demyelinisierung im Cuprizone-Modell.....	8
Abbildung 3: Immuzellinfiltrate in EAE .....	10
Abbildung 4: Immuzellrekrutierung im kombinierten Cuprizone-EAE-Modell.....	11
Abbildung 5: T-Lymphozytenaktivierung und -migration ins ZNS-Parenchym .....	14
Abbildung 6: Histopathologie von akuten MS-Läsionen .....	16
Abbildung 7: Analyse des Myelinisierungsstatus an cerebellaren Schnittkulturen .....	34
Abbildung 8: Definition von lebenden Einzelzellen für die durchflusszytometrische Auswertung.....	40
Abbildung 9: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Corpus callosum und Gewebeschnitten.....	50
Abbildung 10: Massenspektrometrischer Nachweis von Myelinproteinen.....	51
Abbildung 11: Robustheit der Membranproteinaufreinigung bei geringer Probenmenge .....	52
Abbildung 12: Agaroseeinbettung zum Anfertigen von Gewebekulturen.....	54
Abbildung 13: Tyrosinhydroxylase-positive Neurone in sagittalen Gewebekulturen und <i>in vivo</i> .....	55
Abbildung 14: Frontale organotypische Gewebekulturen.....	57
Abbildung 15: Sagittal-frontale Kokultur von Gewebeschnitten.....	59
Abbildung 16: LPC-Behandlung reduziert die Myelinisierung in organotypischen Schnittkulturen .....	61
Abbildung 17: CD45-positive Zellen im Rückenmark von EAE- und CupEAE-Tieren	63
Abbildung 18: Infiltrierende Zellen und Demyelinisierung im Rückenmark .....	64
Abbildung 19: CD45-positive Zellen im Vorderhirn von Cup-, EAE- und CupEAE- Tieren.....	66
Abbildung 20: CD3-positive Zellen im Rückenmark.....	68
Abbildung 21: CD3-positive Zellen im Vorderhirn .....	69
Abbildung 22: CD4/CD8-Verhältnis in Rückenmark und Vorderhirn .....	70
Abbildung 23: Granzym B-Expression auf CD8-positiven Lymphozyten.....	71
Abbildung 24: B220-positive Zellen in Rückenmark und Vorderhirn .....	72
Abbildung 25: Phagozytierende Zellen in Rückenmark und Vorderhirn.....	74

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien für die Bestimmung des EAE-Scores.....	20
Tabelle 2: Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemie	31
Tabelle 3: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemie .....	31
Tabelle 4: Markierungen für durchflusszytometrische Analysen.....	38
Tabelle 5: Dehydrierung und Paraffinierung von fixiertem Gewebe.....	43
Tabelle 6: Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten .....	44
Tabelle 7: Dehydrierung von gefärbten Paraffinschnitten .....	45
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.....	XXI
Tabelle 9: Puffer und Lösungen .....	XXVI

## 10 Anhang

### 10.1 Chemikalien

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

Chemikalie/Material	Hersteller	Bestellnummer
4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	6335.1
Acetonitril	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	1.00030
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	840004
Ameisensäure	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	F0507
Ammoniumbicarbonat	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	A6141
Ampholyte (40%)	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	A8703
Bepanthen-Salbe	Bayer, Leverkusen, Deutschland	PZN: 01578847
Bovines Serumalbumin	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	A9647
CD45-Mikrobeads	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-052-301
CHAPS	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	C3023
Chloroform	J.T.Baker, Philipsburg, Vereinigte Staaten	7386
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	5949-29-1
Collagenase A	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	COLLA-RO
Cuprizone	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	C9012
Dextran T500	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	31392
Dimethylsulfoxid	BioLegend, San Diego, Vereinigte Staaten	423112
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.06580.1000

Dithiotreitol	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	D0632
DMEM	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	D6046
DMEM/F12	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	D8437
DNase I	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	D5025
EAE-Induktions-Kit (MOG <sub>35-55</sub> )	Hooke Laboratories, Lawrence, Vereinigte Staaten	EK-2110
eFluor506	eBioScience, San Diego, Vereinigte Staaten	65-0866-14
Elite ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Vereinigte Staaten	PK-6101
Eosin Y	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.15935.0025
Essigsäure	J.T.Baker, Philipsburg, Vereinigte Staaten	6052
Ethanol 100%	Walter CMP, Kiel, Deutschland	WAL642 6025
Ethanol 96%	Walter CMP, Kiel, Deutschland	WAL641 6025
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	X986.2
Fetales Kälberserum (FCS)	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	SH30070.03
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.03999.1000
Futtermehl	Ssniff, Soest, Deutschland	V1530-000
Glukose	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	G7528
Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	G9012
Harnstoff	GE Healthcare, Chicago, Vereinigte Staaten	17-1319-01
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	H9269
Immumount	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	9990402
Iodacetamid	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	M32631
Isopentan	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3927.1
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	6781.2

Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	P018.2
Ketamin	bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland	Zul.-Nr. 9089.01.00
L-Glutamin	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	G7513
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Agilent Technologies, Santa Clara, Vereinigte Staaten	K3468
Lithiumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.05680.0250
Luxol Fast Blue (LFB)	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	S3382
Lysophosphatidylcholin (LPC)	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	L4129
Mayers Häkalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.09249.0500
Modified Eagle's Medium (MEM)	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	M2279
Methanol	J.T.Baker, Philipsburg, Vereinigte Staaten	8045
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	K305.1
Natriumcarbonat	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	S7795
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	0962.2
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.06346.1000
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	L3771
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.06469.1000
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1065120250
Normaleserum	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	D9663
Normalziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame, Vereinigte Staaten	S-1000
Paraffin	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.07158.9025
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.04005.1000
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	P4333
Pepstatin A	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	P4265
Periodsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.00524.0100

Pferdeserum	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	H1270
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	78830
Polyethylenglykol 3350	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	P4338
cOmplete™ Proteaseinhibitorcocktail	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	11836153001
Ringer-Lösung	B.Braun, Melsungen, Deutschland	3570030
Saccharose	Haushaltszucker	-
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.00317.1000
Schiff'sches Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.09033.0500
Schwefelsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	320201
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	7908.1
Standard-Haltungsfutter	Ssniff, Soest, Deutschland	V1534-000
Thioharnstoff	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	T7875
TissueTek® Einbettmedium	Sakura, Alphen am Rhein, Niederlande	4583
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	AE15.2
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	T9284
True Nuclear Transcription Buffer Set	BioLegend, San Diego, Vereinigte Staaten	424401
True Stain Fc Block	BioLegend, San Diego, Vereinigte Staaten	101320
Trypanblau	Sigma Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	T6146
Vectashield Hardset	Vector Laboratories, Burlingame, Vereinigte Staaten	H1400-10
Wassergel	Clear H <sub>2</sub> O, Portland, Vereinigte Staaten	70-01-5022
Wasserstoffperoxid 35%	Roth, Karlsruhe, Deutschland	8070.4
Xylazin (Rompun ®)	Bayer, Leverkusen, Deutschland	Zul.-Nr. 6293841.00.00

---

Xylol	J.T.Baker, Philipsburg, Vereinigte Staaten	8118
Zombie Green	BioLegend, San Diego, Vereinigte Staaten	423112

## 10.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Puffer und Lösungen

Acetonitril-Ameisensäure-Lösung	Reinstwasser 20 g/l Acetonitril 1 g/l Ameisensäure
Agaroselösung	Reinstwasser 10 g/l Agarose 30% v/v Glycerol 16 g/l SDS 6,2 g/l TRIS Zuerst Agarose unter Erwärmen und Rühren in Reinstwasser lösen, SDS zuletzt zugeben
Avidin-Biotin-Enzym-Komplex	Nach Herstellerangaben aus Elite ABC-Kit 96% v/v PBS 2% v/v Reagenz A 2% v/v Reagenz B
Blockierlösung (cerebellare Gewebekulturen)	97% v/v PBS-GTA 3% v/v Normalserum (Spezies entspricht Wirtsspezies des Sekundärantikörpers)
Blockierlösung (Durchflusszytometrie)	88% v/v PBS (extrazelluläre Färbung) oder Permeabilisierungslösung (intrazelluläre Färbung) 10% v/v FCS 2% v/v Tru Stain Fc Block
Blockierlösung (Kryoschnitte)	95% v/v PBS 5% v/v Normalserum (Spezies entspricht Wirtsspezies des Sekundärantikörpers) 0,05% v/v Triton X-100
Blockierlösung (Paraffinschnitte)	95% v/v PBS 5% v/v Normalserum (Spezies entspricht Wirtsspezies des Sekundärantikörpers)
Blockierlösung (sagittale und frontale Gewebekulturen)	96% v/v PBS 3% v/v Normalserum (Spezies entspricht Wirtsspezies des Sekundärantikörpers) 1% v/v Triton X-100
DAB-Färbelösung	Nach Herstellerangaben aus Liquid DAB+ Substrate Chromogen System 98% v/v DAB Substrate Buffer 2% v/v DAB Chromogen

DAPI-Arbeitslösung	Destilliertes Wasser 5 µg/ml DAPI
Dextran-Stammlösung	Destilliertes Wasser 200 g/l Dextran T500
Dissoziationslösung	DMEM 1 mg/ml Collagenase A 20 U/ml DNase I
Entkalkifizierungslösung	Destilliertes Wasser 200 g/l EDTA pH 7,4
Entwicklerlösung	Reinstwasser 20 g/l Natriumcarbonat 0,04% v/v Formaldehydlösung 37%
Eosin-Lösung	Destilliertes Wasser 1 g/l Eosin Y Angesäuert mit einem Tropfen Essigsäure je 100 ml
FACS-Puffer	98% v/v PBS 2% v/v Bovines Serumalbumin 0,6 g/l EDTA 0,1 g/l Natriumazid
Färbelösung (Kryoschnitte)	99% v/v PBS 1% v/v Normalserum 0,025% v/v Triton X-100
Färbelösung (sagittale und frontale Gewebekulturen)	98,5% v/v PBS 1% v/v Normalserum 0,5% v/v Triton X-100
Fixierlösung (Durchflusszytometrie)	Nach Herstellerangaben aus True Nuclear Transcription Buffer Set 25% v/v 4x Transcription Factor Fix 75% v/v Fix Diluent
Fixierlösung (Gewebekulturen)	PBS 37 g/l Paraformaldehyd Bei 70° C unter Natriumhydroxidzugabe lösen, abkühlen, pH 7,4 einstellen, filtrieren, bei -20° C lagern
Fixierlösung (Polyacrylamidgele)	45% v/v Reinstwasser 50% v/v Ethanol 96% 5% v/v Essigsäure

Gepufferte Kaliumchloridlösung	Reinstwasser 74,55 g/l Kaliumchlorid 1,82 g/l TRIS pH mit Salzsäure auf 7,4 einstellen
HCl-Alkohol	70% v/v Ethanol 30% v/v destilliertes Wasser Angesäuert mit 3% v/v Salzsäure 37%
Konservierungslösung	PBS 0,01 g/l Natriumazid
Kryoprotektionslösung	PBS 200 g/l Saccharose
LFB-Färbelösung	99,5% v/v Ethanol 96% 0,5% v/v Essigsäure 1 g/l LFB
Lithiumcarbonat-Lösung	Stammlösung: Destilliertes Wasser 0,5 g/l Lithiumcarbonat Beginn der Differenzierung: 1:5-Verdünnung der Stammlösung Finale Differenzierung: 1:10-Verdünnung der Stammlösung
LPC-Stammlösung	50% v/v Chloroform 50% v/v Methanol 100 mg/ml LPC In Glasfläschchen ansetzen, bei 38° C in Lösung bringen, bei -20° C lagern
Lysepuffer (Gesamtprotein)	98,75% v/v Reinstwasser 1,25% v/v Ampholyte 40% 40 g/l CHAPS 10,8 g/l Dithiothreitol 152 g/l Thioharnstoff 420 g/l Harnstoff
Lysepuffer (Membranproteine)	Reinstwasser 152 g/l Thioharnstoff 20 g/l CHAPS 0,78 g/l Dithiothreitol 420 g/l Harnstoff

Natriumthiosulfatlösung	Destilliertes Wasser 2 g/l Natriumthiosulfat
PBS	Destilliertes Wasser 80 g/l Natriumchlorid 2 g/l Kaliumchlorid 16,8 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 2,7 g/l Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4 einstellen
PBS-GTA	97,5% v/v PBS-Gelatine-Lösung (1 Blatt Haushalts-Gelatine in 100 ml PBS einweichen und unter Rühren bei 50° C auflösen) 0,25% v/v Triton X-100 1 g/l Natriumazid Lösung auf Eis filtrieren, bei 4° C lagern
Pepstatin A-Stammlösung	Ethanol 100% 0,1 mg/ml Pepstatin A
Perfusionslösung	90% v/v destilliertes Wasser 10% v/v Formaldehydlösung 37% 4,6 g/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 8 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Periodsäure-Lösung	Destilliertes Wasser 5 g/l Periodsäure
Permeabilisierungspuffer	Nach Herstellerangaben aus True Nuclear Transcription Buffer Set 10% v/v 10x Perm Buffer 90% v/v destilliertes Wasser
Phenylmethansulfonylfluorid-stammlösung	Ethanol 100% 17,42 mg/ml Phenylmethansulfonylfluorid
Polyethylenglykol-Stammlösung	Destilliertes Wasser 400 g/l Polyethylenglykol 3350
Präparationsmedium	DMEM/F12 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Proteaseinhibitor-Stammlösung	10 ml Ethanol 100% 1 Tablette cComplete™ Proteaseinhibitorcocktail

Rehydrationspuffer	97,5% v/v Reinstwasser 2,5% v/v Ampholyte 40% 152 g/l Thioharnstoff 20 g/l CHAPS 2,5 g/l Dithiothreitol 360 g/l Harnstoff
Schnittkulturmedium	50% v/v MEM 25% v/v HBSS 25% v/v Pferdeserum 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin 6,5 g/l Glukose Glukose wird vor Zugabe in geringem Volumen gelöst und durch einen 0,22 µm Spritzenfilter steril filtriert
Silbernitratlösung	Destilliertes Wasser 1,5 g/l Silbernitrat
TRIS/EDTA-Puffer	Destilliertes Wasser 1,21 g/l EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat 0,37 g/l TRIS
TRIS-Stammlösung	Destilliertes Wasser 2,42 g/ml TRIS Mit Schwefelsäure auf pH 7,8 eingestellt
Trypanblau-Lösung	PBS 5 g/l Trypanblau
Zombie Green-Stammlösung	1 Zombie Green – Aliquot 100 µl Dimethylsulfoxid
Zwei-Phasen-System A	598 µl Reinstwasser 742 µl TRIS-Stammlösung 482 µl Polyethylenglykol-Stammlösung 961 µl Dextran-Stammlösung Kräftig mischen und über Nacht bei 4° C lagern
Zwei-Phasen-System B	698 µl Reinstwasser 742 µl TRIS-Stammlösung 482 µl Polyethylenglykol-Stammlösung 961 µl Dextran-Stammlösung Kräftig mischen und über Nacht bei 4° C lagern

## Danksagung

Ich empfinde große Dankbarkeit gegenüber vielen Personen, die mich in den letzten Jahren unterstützt, gefordert und geachtet haben. Auf die immer gleiche Auflistung von Namen in einer steifen Danksagung möchte ich an dieser Stelle aber verzichten. Es dürfte jedem klar sein, dass eine Dissertation stets von sehr vielen Beteiligten gestützt und getragen wird, seien es die Arbeitskollegen, Familie, Vorgesetzte, Freunde, Verwandte, Bekannte oder der Busfahrer mit dem täglichen freundlichen Lächeln. Ich bemühe mich, all diesen Menschen meinen Dank regelmäßig und persönlich auszudrücken und hoffe, dass jeder Betroffene weiß, wie viel er oder sie mir bedeutet.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock, den

Sarah Joost

---

## Wissenschaftlicher Lebenslauf

### Werdegang

Seit 15.12.2015                      Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Anatomie,  
Universitätsmedizin Rostock

01.10.2012 – 11.12.2014        Studium der Medizinischen Biotechnologie an der  
Universität Rostock

Abschluss: Master of Science

Thema der Abschlussarbeit: Funktionelle  
Untersuchungen eines humanen neuronalen *in vitro*  
Modells des Morbus Niemann-Pick Typ C1 basierend auf  
differenzierten patientenspezifischen induzierten  
pluripotenten Stammzellen

01.10.2009 – 05.07.2012        Studium der Medizinischen Biotechnologie an der  
Universität Rostock

Abschluss: Bachelor of Science

Thema der Abschlussarbeit: Die Osteoklastengnese im  
STR/ort-Mausmodell

15.06.2009                        Allgemeine Hochschulreife am Niedersächsischen  
Internatsgymnasium Bad Bederkesa

### Wissenschaftliche Nebentätigkeiten

01.10.2011 – 30.01.2013        Studentische Hilfskraft am Institut für Immunologie,  
Universitätsmedizin Rostock

01.08.2014 – 30.06.2015        Wissenschaftliche Hilfskraft am Albrecht-Kossel-Institut,  
Universitätsmedizin Rostock

## Wissenschaftliche Publikationen

Kaddatz H, Joost S, Nedelcu J, Chrzanowski U, Schmitz C, Gingele S, Gudi V, Stangel M, Zhan J, Santrau E, Greiner T, Frenz J, Müller-Hilke B, Müller M, Amor S, van der Valk P, Kipp M (2020) **Oligodendrocyte degeneration recruits cytotoxic CD8<sup>+</sup> lymphocytes into the central nervous system.** *Glia*. In Revision

Zhan J, Mann T, Joost S, Behrangi N, Frank M, Kipp M (2020) **The Cuprizone Model: Dos and Do Nots.** *Cells*. 2020 Mar 31;9(4):843

Zhan J, Yakimov V, Rühling S, Fischbach F, Nikolova E, Joost S, Kaddatz H, Greiner T, Frenz J, Holzmann C, Kipp M (2019) **High Speed Ventral Plane Videography as a Convenient Tool to Quantify Motor Deficits during Pre-Clinical Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.** *Cells*. 2019 Nov 14;8(11)

Joost S, Mikkat S, Wille M, Schümann A, Schmitt O (2019) **Membrane protein identification in rodent brain tissue samples and acute brain slices.** *Cells* 2019. 8(5), 423

Rabenstein M, Peter F, Joost S, Trilck M, Rolfs A, Frech MJ (2017): **Decreased calcium flux in Niemann-Pick type C1 patient-specific iPSC-derived neurons due to higher amount of calcium-impermeable AMPA receptors.** *Mol Cell Neurosci*. 2017 Sep; 83:27-36.

Joost S, Kobayashi K, Wree A, Haas SJP (2017): **Optimisation of murine organotypic slice culture preparation for a novel sagittal-frontal co-culture system.** *J Neurosci Methods*. 2017 Jun 15;285:49-57.

Pasold J, Engelmann R, Keller J, Joost S, Marshall RP, Frerich B, Müller-Hilke B (2013): **High bone mass in the STR/ort mouse results from increased bone formation and impaired bone resorption and is associated with extramedullary hematopoiesis.** *J Bone Miner Metab*. 2013 Jan;31(1):71-81.

## Konferenzbeiträge

Joost S, Kaddatz H, Kipp M: **Immune cell recruitment in a toxic multiple sclerosis model.** Posterpräsentation, Research Day MS 2020, Berlin, Januar 2020

Joost S, Kaddatz H, Kipp M: **Immune cell recruitment in a toxic multiple sclerosis model.** Vortrag, 114. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, September 2019

Joost S, Kipp M: **Organotypische Slicekulturen als Modell für Demyelinisierung.** Posterpräsentation, Research Day MS 2019, Berlin, Januar 2019

Joost S, Tasler M, Wree A, Haas SJP: **Induction of dopaminergic degeneration in organotypic slice cultures.** Posterpräsentation, 113. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Rostock, September 2018

Joost S, Wree A, Haas SJP: **Induction of dopaminergic neurodegeneration in murine organotypic nigrostriatal slice cultures by 6-hydroxydopamine.** Posterpräsentation, 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin, Juli 2018

Joost S, Wree A, Haas SJP: **Organotypic slice cultures – an alternative for animal experiments in Parkinson's disease research?** Posterpräsentation, Scientific meeting of the MDS Non-Motor PD Study Group, Rostock, März 2018

Joost S, Wree A, Haas SJP: **Organotypic nigrostriatal slice cultures of mice as ex vivo model of the nigrostriatal pathway.** Posterpräsentation, 112. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, September 2017

Joost S, Wree A, Haas SJP: **Long-term cultivation of nigrostriatal organotypic slice cultures.** Posterpräsentation, 12. Göttinger Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, März 2017

Frech MJ, Joost S, Trilck M, Runge F, Rabenstein M, Rolfs A: **Functional characterisation of Niemann-Pick Type C1 neuronal cells derived from patient-specific induced pluripotent stem cells.** Posterpräsentation, 11. Göttinger Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, März 2015