Aus dem Institut für Anatomie

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

Die Rekrutierung peripherer Immunzellen in einem toxischen Multiple Sklerose Tiermodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von
Hannes Kaddatz | geb. am 13.04.1997 in Wismar
aus Rostock | 2021

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004160

DOKTORARBEIT
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Universität Rostock Traditio et Innovatio

Universitätsmedizin Rostock

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Universitätsmedizin Rostock

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp,
Universitätsmedizin Rostock, Institut für Anatomie

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Uwe Zettl, Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Neurologie

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Höglinger,
Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für Neurologie

Datum der Einreichung: 12.07.2021

Datum der Verteidigung: 10.05.2022

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Die Multiple Sklerose – Klinische Aspekte 1
1.2 Pathogenese der MS 2
1.3 T-Zellen als Grundlage der adaptiven Immunantwort 3
1.4 Tiermodelle in der MS-Forschung 5
1.4.1 Das EAE-Modell 5
1.4.2 Das Cuprizone-Modell 6
1.5 Die Relevanz inflammatorischer Prozesse in MS 8
1.6 Fragestellungen der Arbeit 10
2. Material & Methoden 11
2.1 Tiere und Experimentgruppen 11
2.2 Cuprizone-Intoxikation 12
2.3 Transkardiale Perfusion und Gewebeentnahme 13
2.4 Entwässerung, Einbettung und Schnitt 13
2.5 Hirngewebe progressiver MS-Patienten 14
2.6 Histochemische Färbungen 15
2.6.1 Luxol-Fast-Blue- / Periodic-Acid-Schiff-Färbung 15
2.6.2 Nissl-Färbung 17
2.6.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung 19
2.7 Immunhistochemie 20
2.7.1 Prinzip immunhistochemischer Nachweise 20
2.7.2 Durchführung der immunhistochemischen Markierung 21
2.8 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung 26
2.8.1 Prinzip der Immunfluoreszenzmarkierung 26
2.8.2 Durchführung einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung 27
2.9 Negativkontrollen 29
2.10 Auswertung 31
2.10.1 Untersuchte Hirnregionen 31
2.10.2 Quantifizierung der optischen Dichte 32
2.10.3 Quantifizierung von Zelldichten 34
2.10.4 Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen 34
2.10.5 Quantifizierung der Verteilung Granzym B^+ Vesikel in $CD3^+$ Zellen 35
2.10.6 Statistische Auswertung und graphische Darstellung 36
3. Ergebnisse 37
3.1 Cuprizone-induzierte Pathologie 37
3.2 Rekrutierung peripherer Immunzellen im Cuprizone-Modell 39

3.3 Zusammenhang zwischen Demyelinisierung und T-Zell-Rekrutierung 44
3.4 Rekrutierung von Immunzellen nach chronischer Demyelinisierung 47
3.5 Charakterisierung des Subtyps rekrutierter T-Zellen 49
3.6 Phänotyp und Aktivierungszustand rekrutierter T-Zellen 51
3.7 Zusammenhang von Mikrogliose, axonalem Schaden und T-Zell-Rekrutierung 54
3.8 Therapeutische Reduktion der Cuprizone-induzierten Pathologie 55
3.9 T-Zell-Infiltrate in *post mortem* MS-Gewebe 57
4. Diskussion 60
4.1 Diskussion der Methoden und des verwendeten Tiermodells 60
4.1.1 Immunhistochemie und Immunfluoreszenzmarkierung 60
4.1.2 MS-assoziierte Tiermodelle und ihre Limitationen 61
4.2 Immunzellbeteiligung im Cuprizone-Modell 65
4.3 Diskussion der Ergebnisse 66
4.3.1 Die Rolle der T-Zellen in MS und im Cuprizone-Modell 67
4.3.2 Potenzielle Mediatoren der T-Zell-Rekrutierung im Cuprizone-Modell 69
4.3.3 Fazit 71
5. Zusammenfassung 73
6. Thesen 74
7. Literaturverzeichnis III
8. Abbildungsverzeichnis XVIII
9. Tabellenverzeichnis XX
10. Abkürzungsverzeichnis XXI
11. Anhang XXIII
11.1 Chemikalien und Materialien XXIII
11.2 Puffer und Lösungen XXIV
12. Danksagung XXVII
13. Eidesstattliche Versicherung XXVIII
14. Lebenslauf XXIX

1. Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose – Klinische Aspekte

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche, neurodegenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Entzündliche Läsionen entstehen hauptsächlich in der weißen, aber auch in der grauen Substanz des ZNS und sind, abhängig von der Lokalisation, Auslöser unterschiedlicher neurologischer Symptome. Erste Symptome eines demyelinisierenden Ereignisses, die akut auftreten und nicht alle Diagnosekriterien der MS erfüllen, werden unter dem Begriff „klinisch isoliertes Syndrom“ zusammengefasst [1]. Ein klinisch isoliertes Syndrom tritt bei etwa 85% der Patienten vor der MS-Diagnose auf [2]. Lassen sich, neben den klinischen Symptomen, in der T_2-gewichteten Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) hyperintense Läsionen darstellen und sind die Kriterien der zeitlichen und örtlichen Dissemination erfüllt, kann die Ausschlussdiagnose „Multiple Sklerose“ nach den McDonald Kriterien gestellt werden [3].

Grundsätzlich können klinisch drei Verlaufsformen unterschieden werden: die akute, schubförmig-remittierende MS (RRMS), die sekundär progressive (SPMS) und die primär progressive MS (PPMS, Abbildung 1). Den schubförmig-remittierenden Verlauf kennzeichnen akut auftretende neurologische Symptome (Schübe), welche sich im zeitlichen Verlauf teilweise oder vollständig zurückbilden können (Remission). Ein anfangs schubförmig-remittierender Verlauf geht häufig nach zehn bis fünfzehn Jahren in den sekundär progressiven Verlauf über [4]. In dieser Phase bleiben Remissionen von neurologischen Symptomen aus, das Ausmaß der körperlichen Einschränkungen schreitet progressiv voran. Wirksame Therapiemöglichkeiten sind in diesem Stadium der MS sehr eingeschränkt. Antiinflammatorische Medikamente, die in der RRMS sehr erfolgreich zum Einsatz kommen, verlieren in der Phase der SPMS weitestgehend ihre Wirksamkeit [5–9]. Bei 10-15% der Patienten lassen sich zu Beginn der Erkrankung nur bedingt einzelne Schübe voneinander abgrenzen, man spricht von einem primär progressiven Verlauf (PPMS, Abbildung 1) [10]. Ob der primär progressive Verlauf eine Variante der MS ist oder

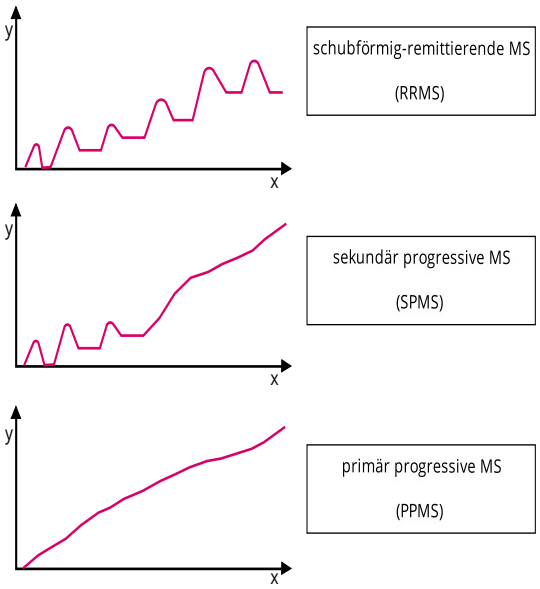


Abbildung 1: Darstellung der unterschiedlichen MS-Verlaufsformen

eine eigene Krankheitsentität darstellt, ist Gegenstand aktueller Diskussionen (Übersichtsartikel in: [11]).

1.2 Pathogenese der MS

Die auslösenden Faktoren der MS sind zum aktuellen Zeitpunkt ungeklärt. Diskutiert werden unter anderem genetische Prädispositionen durch Risikoallele wie zum Beispiel *HLA-DRB1*1501*, welches sich bei circa 75% der MS-Patienten findet [12, 13]. Infektionen mit humanen Herpesviren, insbesondere dem Epstein-Barr-Virus, werden ebenfalls als Risikofaktoren oder als möglicher Auslöser angenommen [14]. Neben Infektionen werden auch andere Umwelteinflüsse wie die Exposition gegenüber UV-Licht und der damit verbundene Vitamin-D-Spiegel in Zusammenhang mit dem MS-Risiko gebracht. Begründet wird diese Hypothese unter anderem durch die Beobachtung, dass die individuelle Sonnenlicht-Exposition negativ mit der MS-Prävalenz korreliert [15]. Hohe Vitamin-D-Spiegel im Blut korrelieren außerdem mit einem niedrigen Risiko an MS zu erkranken [16].

Die der MS zugrundeliegende Pathophysiologie ist multifaktoriell und bis heute nicht aufgeklärt. Neuropathologisch kommt es zur Entstehung von multiplen demyelinisierenden Läsionen. Diese Läsionen werden begleitet von einem Untergang der Myelin-bildenden Oligodendrozyten [17], einer reaktiven Astro- und Mikrogliose [18], akutem axonalen Schaden [19] sowie Infiltraten peripherer Immunzellen [20].

Hinsichtlich der Läsionsentstehung und der Reihenfolge pathologischer Ereignisse in der MS wurden unterschiedliche Hypothesen postuliert (Abbildung 2) [21]. Ob gezielt in das ZNS eingewanderte autoreaktive T-Zellen eine inflammatorische Demyelinisierung auslösen oder ob primär zytodegenerative Prozesse im ZNS eine sekundäre Rekrutierung von T-Zellen herbeiführen, ist nicht geklärt. Traditionell wurde die MS als primär inflammatorische Autoimmunerkrankung verstanden. Dies beschreibt unter anderem die „Outside-In“-Hypothese. Demnach werden in der Peripherie naive T-Zellen zu autoreaktiven T-Zellen transformiert. Diese überwinden die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und

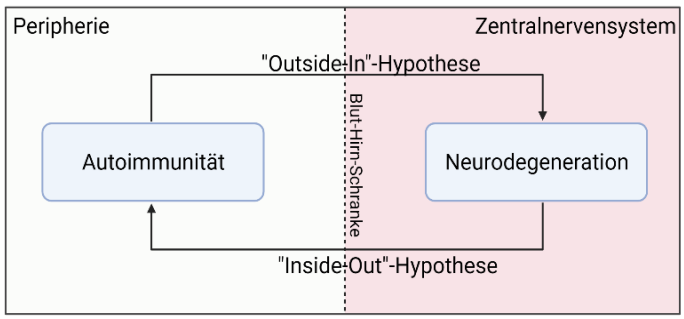


Abbildung 2: Modelle der MS-Pathogenese
Die „Outside-In“-Hypothese beschreibt in der Peripherie entstehende autoreaktive T-Zellen, die in das ZNS einwandern und eine Demyelinisierung auslösen. Im Gegensatz dazu geht die „Inside-Out“-Hypothese von einem primär zytodegenerativen Prozess aus, welcher sekundär zu einer Rekrutierung von Immunzellen in das ZNS führt.

führen im ZNS zu fokalen Inflammationen mit anschließender Demyelinisierung und Neurodegeneration. Bei der „Inside-Out“-Hypothese geht man hingegen von einem primär zytodegenerativen oder neurodegenerativen Vorgang im ZNS aus, welcher sekundär zu einer Einwanderung von peripheren Immunzellen führt (Übersichtsartikel in: [22, 23]).

1.3 T-Zellen als Grundlage der adaptiven Immunantwort

T-Lymphozyten sind ein essenzieller Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Nach der Reifung im Thymus zirkulieren sie als naive T-Zellen in der Peripherie zwischen dem Blut und den sekundären lymphatischen Organen. Grundsätzlich lassen sich zwei große Subpopulationen an T-Zellen unterscheiden. Gemäß der CD („cluster of differentiation“) - Nomenklatur grenzt man die $CD4^+$ T-Helferzellen von den zytotoxischen $CD8^+$ Effektorzellen ab. Damit eine naive T-Zelle in einen aktivierten Zustand übergehen kann (Differenzierung), ist der Kontakt mit einem spezifischen Antigen erforderlich. Diese Aufgabe übernehmen antigenpräsentierende Zellen (APZ). Sie präsentieren den T-Zellen Antigene mithilfe von sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC, engl. „major histocompatibility complex“). Den $CD4^+$ T-Helferzellen werden Antigene über den MHC-II-Komplex von professionellen APZ präsentiert, den $CD8^+$ Effektorzellen über den auf allen kernhaltigen Körperzellen vorhandenen MHC-I-Komplex (Abbildung 3).

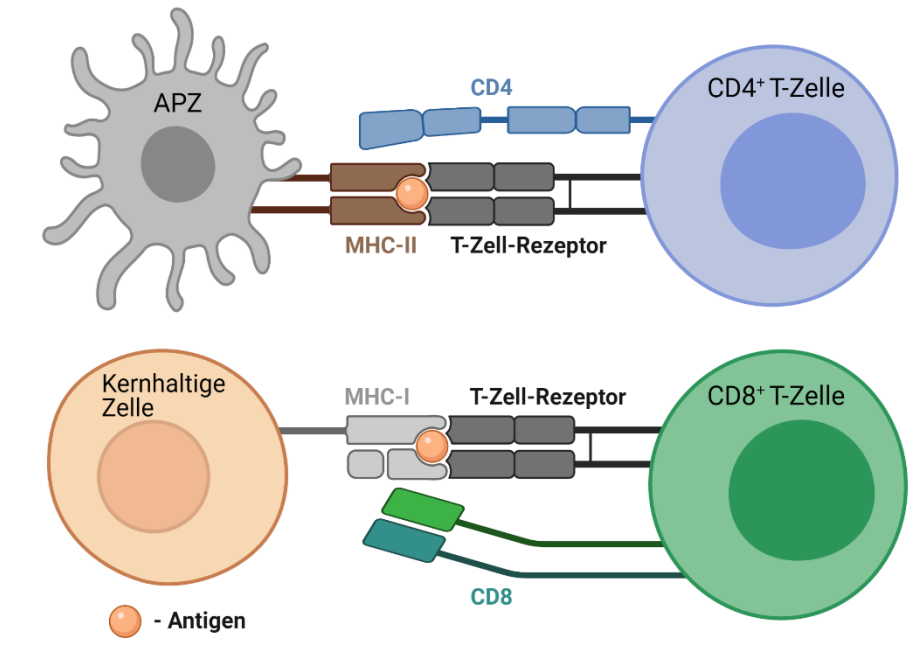


Abbildung 3: Präsentation von Antigenen an T-Zellen

Professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) präsentieren über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II Antigene an $CD4^+$ T-Zellen. $CD8^+$ T-Zellen können Antigene über MHC-I von allen kernhaltigen Zellen präsentiert werden. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Der Antigenkontakt mit ZNS-spezifischen Antigenen ist für T-Zellen zum einen das Signal zur weiteren Differenzierung und Proliferation, zum anderen aber auch eine Voraussetzung, um die geschlossene BHS gezielt passieren zu können [24, 25]. Eine Möglichkeit, wie T-Zellen in der Peripherie mit ZNS-spezifischen Antigenen in Kontakt kommen können, ist die Migration von dendritischen Zellen (spezialisierten APZ) aus dem ZNS in zervikale Lymphknoten, in denen sie naiven T-Zellen ZNS-spezifische Antigene präsentieren können [26]. Um in das ZNS zu migrieren, überwinden T-Lymphozyten nach aktueller Auffassung in einem ersten Schritt die Endothelzellen der postkapillären Venolen und gelangen so in das *Spatium perivasculare*. Dieser perivaskuläre Spalt wird auch als Virchow-Robin-Raum bezeichnet.

Die zweite Barriere ist eine von Astrozytenfortsätzen gebildete Grenzmembran, die *Membrana glia limitans perivascularis* (Übersichtsartikel in: [27]). Nach der Migration ins Hirnparenchym und der Erkennung des Zielantigens haben T-Zellen unterschiedliche Möglichkeiten, inflammatorische Reaktionen auszulösen. $CD4^+$ T-Helferzellen, insbesondere T_H1-Zellen & T_H17-Zellen, können proinflammatorische Zytokine und Chemokine produzieren. Diese Chemokine halten inflammatorische Signalkaskaden aufrecht und rekrutieren weitere T-Zellen zum Ort der Inflammation. $CD8^+$ T-Zellen vermitteln ihre zytotoxische Wirkung auf die immunologische Zielzelle hauptsächlich über die Sekretion zytotoxischer Effektormoleküle wie Perforine und Granzyme, welche in der Zielzelle die Apoptose induzieren (Abbildung 4) [28]. Zytotoxischen T-Zellen wird eine große Rolle an der Progression der MS-Pathologie zugeschrieben, da sie die Anzahl von $CD4^+$ T-Helferzellen in den Läsionen aller MS-Krankheitsverläufe deutlich übertreffen [29–32].

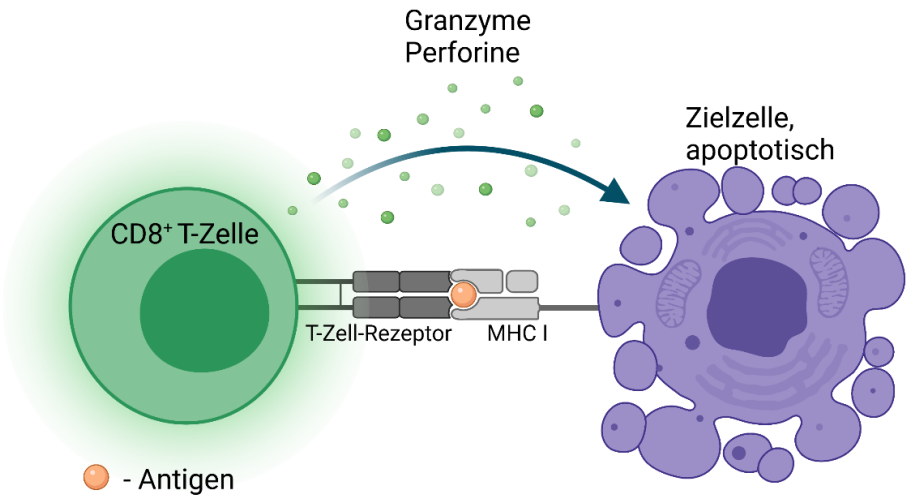


Abbildung 4: Sekretion zytotoxischer Effektormoleküle

Nach der Antigenerkennung sekretiert die $CD8^+$ T-Zelle Enzyme, welche in der Zielzelle die Apoptose induzieren. Perforine erhöhen die Permeabilität der Zellmembran der Zielzelle. Granzyme, zum Beispiel Granzym B, können so in die Zielzelle gelangen und Signalkaskaden einleiten, die die Apoptose induzieren. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

1.4 Tiermodelle in der MS-Forschung

1.4.1 Das EAE-Modell

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) stellt ein sehr häufig genutztes Tiermodell für die Untersuchung autoimmunvermittelter Erkrankungen dar (Übersichtsartikel in: [33, 34]). Die Immunisierung mit Myelinfragmenten, beispielsweise dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein 35-55 (MOG_{35-55}), führt zu einer autoimmunen Reaktion in den Empfängertieren. Diese Myelinfragmente werden einmalig mit komplettem Freund-Adjuvans (hitzeinaktivierte Mykobakterien) subkutan injiziert (Abbildung 5 A). Zur weiteren Steigerung der Immunreaktion wird den Mäusen zusätzlich Pertussis-Toxin (PTX) appliziert. Im Rahmen der ausgelösten autoimmunen Reaktion kommt es zu einer Migration von T-Zellen in das ZNS, welche spezifisch gegen das MOG-Antigen gerichtet sind. Bei den T-Zellen handelt es sich zu einem Großteil um $CD4^+$ T-Helferzellen vom Typ T_H1 oder T_H17 [35, 36]. Sekundär führen diese MOG_{35-55} -autoreaktiven Lymphozyten zu einer entzündlichen Demyelinisierung im ZNS, vor allem in der weißen Substanz [37, 38]. Der Krankheitsverlauf der immunisierten Tiere ist monophasisch und akut (Abbildung 5 B) [39]. Im Gegensatz zu human-pathologischen MS-Befunden entstehen die inflammatorischen Läsionen vor allem im Rückenmark und im *Cerebellum* (Abbildung 5 C) [40].

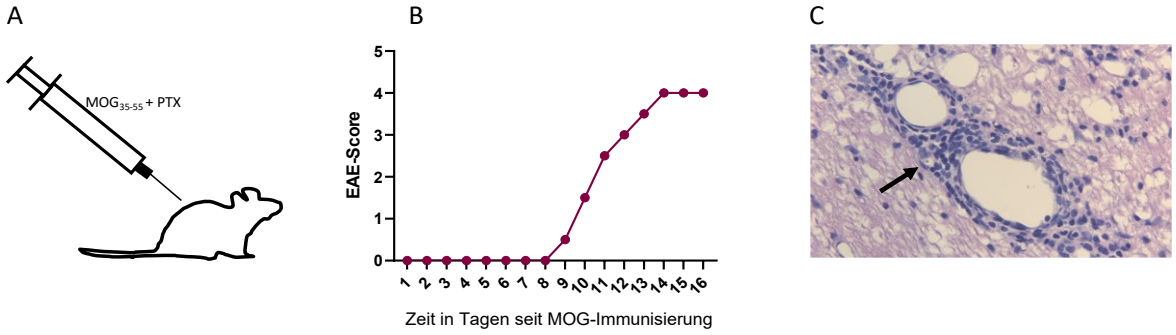


Abbildung 5: Schematischer Ablauf einer MOG-EAE-Induktion

(**A**) Myelinfragmente (MOG_{35-55}) werden mit komplettem Freund-Adjuvans und Pertussis-Toxin (PTX) subkutan appliziert. (**B**) Schematische Darstellung des monophasischen Krankheitsverlaufs nach der EAE-Immunisierung. (**C**) Perivaskuläre Infiltrate mit Immunzellen sind im ZNS immunisierter Mäuse zu finden (Pfeil).

Das hier beschriebene MOG-EAE-Modell ähnelt im symptomatischen Verlauf und der zugrunde liegenden Pathophysiologie der akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM). Diese Entmarkungserkrankung entwickelt sich vor allem bei Kindern nach viralen Infektionen und ist durch perivenöse, demyelinisierende und inflammatorische Läsionen charakterisiert [41]. Im monophasischen Krankheitsverlauf der ADEM [42] kommt es, ähnlich wie in der MOG-EAE, primär zur Einwanderung von Immunzellen und sekundär zu einer Demyelinisierung [43].

1.4.2 Das Cuprizone-Modell

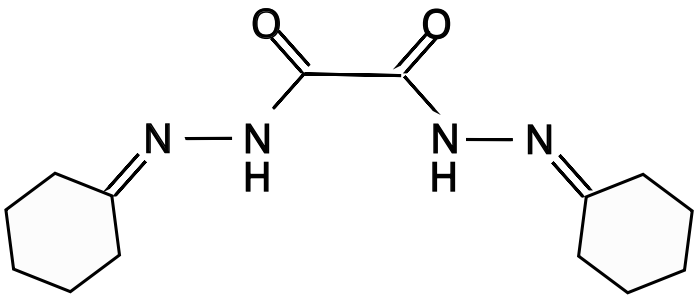


Abbildung 6: Strukturformel von Cuprizone

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches, zytodegeneratives Tiermodell. Es dient insbesondere der Untersuchung von De- und Remyelinisierungsvorgängen (Übersichtsartikel in: [44, 45]). William W. Carlton führte erste Tierexperimente mit dem Kupferchelator Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon, Abbildung 6) durch. Carlton und Kollegen konnten mehrere pathologische Veränderungen im ZNS der intoxikierten Tiere beobachten. Eine Zugabe von Cuprizone zum Futter führte nach einigen Wochen zu einem Hydrocephalus, zur Bildung von zerebellären Ödemen, sowie zu einer zentralen Demyelinisierung im Hirn der intoxikierten Mäuse [46]. Die Auswirkung einer Cuprizone-Intoxikation auf den Organismus ist zum einen von der Dauer und Konzentration der eingesetzten Cuprizone-Dosis abhängig, zum anderen von dem verwendeten Mausstamm sowie dem Alter, Geschlecht und Gewicht der Tiere (Übersichtsartikel in: [47]). In nachfolgenden Studien wurde eine Cuprizone-Konzentration etabliert, die zur Entstehung einer reproduzierbaren Demyelinisierung im *Telencephalon* der Mäuse führt und gleichzeitig möglichst wenig unerwünschte Nebenwirkungen auslöst. Eine fünf- bis sechswöchige Intoxikation mit 0,2% bis 0,25% Cuprizone im Normalfutter führt zu einer fast vollständigen und symmetrischen Demyelinisierung des *Corpus callosum* von C57BL/6-Mäusen [48]. Demyelinisierende Prozesse finden nicht nur im *Corpus callosum* statt, sondern entstehen auch in anderen Regionen der weißen Substanz wie dem *Pedunculus cerebellaris superior* [49]. In der grauen Substanz wie dem primär somatosensorischen und primär somatomotorischen *Cortex* [50], dem *Cerebellum* [51] und dem *Hippocampus* [52] ist ebenfalls eine Abnahme der Myelindichte festzustellen.

Eine einwöchige Cuprizone-Intoxikation führt bereits in einem Großteil der Myelin-bildenden Oligodendrozyten zu zellulären Stressreaktionen [53] und nachfolgend zur Induktion des Zelluntergangs [54]. Nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation ist eine signifikante und nach fünfwöchiger Intoxikation eine fast vollständige Demyelinisierung des medialen *Corpus callosum* gegenüber Kontrolltieren nachweisbar. Letzteren Zustand bezeichnet man als „akute Demyelinisierung“ (Übersichtsartikel in: [44]).

Wird die Cuprizone-Intoxikation nach fünf Wochen beendet, lässt sich im weiteren zeitlichen Verlauf eine spontane Remyelinisierung beobachten [55]. Von einer „chronischen Demyelinisierung“ spricht man bei einer Cuprizone-Intoxikation von 11 bis 13 Wochen. Eine spontane Remyelinisierung ist nach einer chronischen Demyelinisierung nur noch sehr eingeschränkt zu beobachten (Abbildung 7) [56].

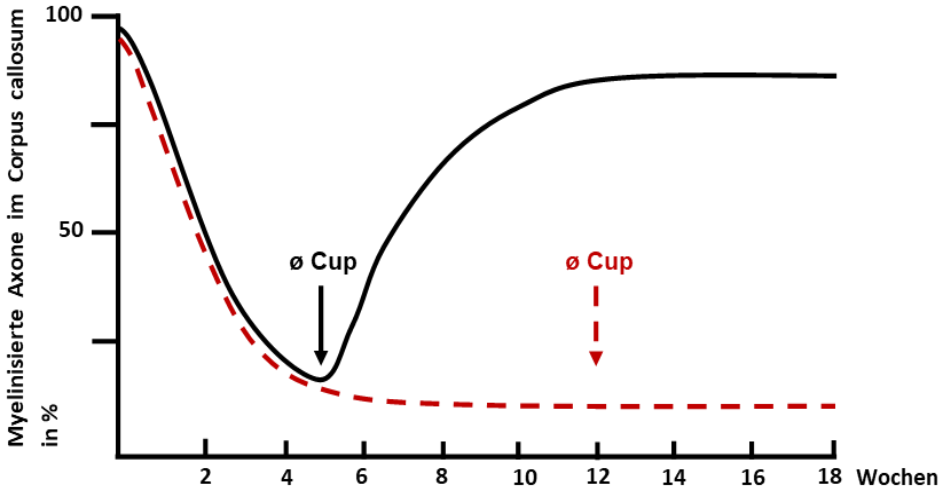


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Verlaufs der akuten und chronischen Demyelinisierung

In schwarz ist der Verlauf der akuten Demyelinisierung dargestellt. Nach fünf Wochen wird die Cuprizone-Intoxikation beendet (ø Cup, schwarzer Pfeil). Eine spontane Remyelinisierung entwickelt sich in den darauffolgenden Wochen. In rot gestrichelt ist der Verlauf der chronischen Demyelinisierung dargestellt. Die Cuprizone-Intoxikation wird für 11 bis 13 Wochen durchgeführt (ø Cup, gestrichelter roter Pfeil). Nach Beendigung der Cuprizone-Intoxikation bleibt eine spontane Remyelinisierung weitestgehend aus.

Der genaue Wirkmechanismus des Cuprizone ist nicht vollständig geklärt. Cuprizone stört nachweislich die Kupfer-Homöostase intoxikierter Tiere [57, 58]. Kupfer ist wiederum ein essenzieller Kofaktor wichtiger mitochondrialer Enzyme, insbesondere der Atmungskette [59]. Der Nachweis von „Riesenmitochondrien“ in den Oligodendrozyten Cuprizone-intoxikierter Tiere [60] führte zu der Hypothese, dass die zytotoxische Wirkung auf metabolischen Stress zurückzuführen ist [61]. Dass adulte, myelinisierende Oligodendrozyten selektiv vulnerabel gegenüber Cuprizone sind [62], wird unter anderem mit einem vergleichsweise hohen Energiebedarf dieses Zelltyps begründet (Übersichtsartikel in: [63]). Neueste Untersuchungen weisen auf eine spezielle Form des Zelltods in den Oligodendrozyten hin. Die sogenannte Ferroptose ist eine eisenabhängige, nicht-apoptotische Variante des Zelltods und durch die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies charakterisiert (Übersichtsartikel in: [64]). Diese Sonderform des Zelluntergangs konnte vor kurzem in den Oligodendrozyten Cuprizone-intoxikierter Tiere beobachtet werden [65].

Der Untergang adulter Oligodendrozyten und die akute Demyelinisierung werden von einer ausgeprägten Mikrogliaaktivierung [66], einer Astrogliose [67] und einem Verlust der axonalen Integrität begleitet [68]. Die BHS ist in diesem Tiermodell weitestgehend intakt [69–72].

Eine inflammatorische Komponente im Cuprizone-Modell ist bislang umstritten. Aktivierte Mikrogliazellen und auch reaktive Astrozyten können Chemokine und proinflammatorische Zytokine synthetisieren, welchen eine potenzielle Rolle bei der Progression der Demyelinisierung zugeschrieben wird [73–75]. Peripheren Immunzellen, insbesondere Lymphozyten, wird bislang kein wesentlicher Anteil an der Entwicklung und Progression der Cuprizone-induzierten Pathologie beigemessen [76].

1.5 Die Relevanz inflammatorischer Prozesse in MS

Die RRMS ist histopathologisch durch wiederkehrende Episoden von inflammatorischer Demyelinisierung charakterisiert. Diese inflammatorischen Vorgänge werden von peripheren T-Zellen dominiert, welche über eine geschädigte beziehungsweise offene BHS ins ZNS migrieren und dort zur Demyelinisierung sowie zum Untergang von Oligodendrozyten und neuronalen Komponenten beitragen. Die Pathologie der RRMS ist im überwiegenden Einklang mit einer autoimmun-vermittelten Erkrankung.

Während der progressiven Krankheitsphase der MS wird die Relevanz inflammatorischer Vorgänge im ZNS, insbesondere die Rekrutierung von Lymphozyten und deren potenzielle Zytotoxizität, jedoch kontrovers diskutiert. Gadolinium-anreichernde Herde im MRT repräsentieren inflammatorische Läsionen und sind im Stadium der RRMS in hoher Anzahl und Ausdehnung darzustellen. In der SPMS hingegen nimmt die Zahl neuer Gadolinium-anreichernder Läsionen deutlich ab [77]. In progressiven Krankheitsphasen verlieren zudem die in der Behandlung der RRMS effektiven, antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Medikamente weitestgehend ihre Wirksamkeit [5–9].

In einer groß angelegten pathologischen Studie, welche das Autopsiematerial von MS-Patienten in unterschiedlichen Krankheitsstadien und Kontrollpatienten ohne neurologische Auffälligkeiten verglich, konnte dennoch gezeigt werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Inflammation (T-Zellen, Plasmazellen, B-Zellen und Antigen-präsentierenden Mikroglia) und dem Ausmaß des akuten axonalen Schadens (Amyloid Precursor Protein$^+$ (APP$^+$) und Synaptophysin$^+$ Sphäroiden) im ZNS von progressiven MS-Patienten zu finden ist [78]. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Pathologie der SPMS im Einklang mit einer inflammatorischen Erkrankung ist und die inflammatorischen Prozesse „gefangen“ hinter einer geschlossenen BHS ablaufen sollen.

Eine alternative Erklärung für die beobachtete positive Korrelation von Inflammation und akutem axonalem Schaden könnte darin bestehen, dass primär stattfindende, neurodegenerative Prozesse eine sekundäre Rekrutierung von Immunzellen auslösen (vgl. „Inside-Out“-Hypothese, Abbildung 2). So konnte erst kürzlich in einem neuen zytodegenerativen Tiermodell mit autoimmuner Komponente gezeigt werden, dass die Cuprizone-induzierte Oligodendrozyten-Degeneration ein potenter Auslöser für die Rekrutierung von T-Zellen in das *Telencephalon* von Mäusen ist, bei denen zusätzlich eine aktive oder passive MOG-EAE induziert wurde (sogenanntes Cup/EAE-Modell) [79–82]. Im Rahmen der aktiven MOG-EAE-Induktion werden autoreaktive T-Zellen artifiziell generiert, welche in das ZNS der Mäuse einwandern und dort eine inflammatorische Demyelinisierung auslösen. Bei einer Kombination der beiden Tiermodelle (Cuprizone- und EAE-Modell) kommt es, anders als bei der akuten MOG-EAE (Kapitel 1.4.1), bei der sich inflammatorische Infiltrate fast ausschließlich im Rückenmark und im Kleinhirn formieren [40], auch zur Bildung von perivaskulären, inflammatorischen Infiltraten in verschiedenen Bereichen des *Telencephalon* wie dem *Corpus callosum*, dem *Cortex* und verschiedenen subkortikalen Strukturen [81, 82].

Während diese Studien implizieren, dass primär zytodegenerative Prozesse unter autoimmunen Bedingungen im ZNS eine T-Zell-Rekrutierung an den Ort der Demyelinisierung auslösen, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Cuprizone-induzierte Demyelinisierung, ohne die Generierung von autoreaktiven T-Zellen, ein suffizienter Trigger für die Rekrutierung von peripheren Immunzellen darstellt.

1.6 Fragestellungen der Arbeit

Die zentrale Hypothese dieser Arbeit ist, dass ein primär zytodegenerativer Prozess im ZNS zu einer sekundären Rekrutierung von peripheren Lymphozyten führt. Diese Annahme ist zurückzuführen auf die in Kapitel 1.2 erläuterte „Inside-Out“-Hypothese.

In dieser Studie wird das Cuprizone-Modell verwendet, um eine primär zytodegenerative Pathologie im Gehirn der Versuchstiere zu induzieren. Diese Pathologie im ZNS intoxikierter Tiere äußert sich in Form eines Untergangs adulter Oligodendrozyten mit darauffolgender zentraler telencephaler Demyelinisierung sowie einer begleitenden Mikrogliaaktivierung und Astrogliose.

Die übergeordneten Hypothesen und verwendeten Methoden dieser Arbeit sind nachfolgend aufgeführt.

Hypothese 1: Im Rahmen der zytodegenerativen Prozesse kommt es im Cuprizone-Modell zu einer Rekrutierung peripherer Immunzellen an den Ort der Demyelinisierung.

Methode 1: Hirnschnitte Cuprizone-intoxikierter Mäuse wurden immunhistochemisch markiert und auf das Vorhandensein von T-Zellen und B-Zellen untersucht.

Hypothese 2: Rekrutierte Immunzellen im Cuprizone-Modell sind in Quantität und Qualität vergleichbar mit histopathologischen Befunden progressiver MS-Läsionen.

Methode 2: Hirnschnitte Cuprizone-intoxikierter Mäuse und progressiver MS-Patienten wurden zur Charakterisierung des Phänotyps und des Aktivitätszustands rekrutierter Immunzellen immunhistochemisch sowie Immunfluoreszenz-markiert und die Ergebnisse verglichen.

Eine genauere Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und treibenden Faktoren der T-Zell-Rekrutierung ist von essenzieller Bedeutung für ein besseres Verständnis der Pathogenese progressiver MS-Formen und stellt mögliche Ansatzpunkte für neue MS-Therapiemöglichkeiten dar.

2. Material & Methoden

2.1 Tiere und Experimentgruppen

Für die Experimente wurden Mäuse vom Stamm C57BL6/J von Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden nach den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Associaton's (FELASA)" in Käfigen gehalten, die wöchentlich gewechselt wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte bei einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden, einer Raumtemperatur von 22°C ± 2°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% ± 10%. In einem Käfig mit 100cm² Grundfläche befanden sich maximal fünf Tiere, welche *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser hatten. Jeder Käfig war standardmäßig mit Einstreu, Versteckmöglichkeit, Nestbaumaterial, Kauholz, einer Trinkflasche und 140g des Standard-Haltungsfutters oder des Cuprizone Futtergemisches ausgestattet. Eine Genehmigung für die Durchführung des Tierexperiments gemäß §8 Tierschutzgesetz lag von den jeweiligen Landesbehörden vor (Regierung Oberbayern, Tierversuchsnummer 55.2-154-2532-73-15; Regierung Mecklenburg-Vorpommern, Tierversuchsnummer 7221.3-1-001/19; Regierung Niedersachsen, Tierversuchsnummer 15/1762). Vor Beginn des Experiments konnten sich die Tiere für eine Woche an die Umgebung gewöhnen. Mäuse, welche mit Cuprizone intoxikiert wurden, erhielten eine 0,2%ige bis 0,25%ige Dosis Cuprizone vermischt mit gemahlenem Standard-Haltungsfutter. Der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich über die Dauer des Tierexperiments nach den Kriterien Aktivität, Atmung, Bewegung, Fell-Beschaffenheit, Konstitution und Dehydrierung beurteilt. Paraffin-Hirnschnitte von Mäusen aus anderen, unabhängig durchgeführten Tierexperimenten wurden zusätzlich in dieser Studie untersucht. Detaillierte Informationen zu den verwendeten Experimentalgruppen sind in Tabelle 1 dargestellt. Diese Tierexperimente wurden von verschiedenen Experimentatoren unabhängig betreut, aber mit vergleichbaren Protokollen durchgeführt.

Tabelle 1: In dieser Studie verwendete Experimentalgruppen

Bezeichnung der Experimental-gruppe	Maus-stamm	Alter in Wochen	Gewicht in Gramm	Ge-schlecht	Cuprizone (Cup) Dosis in %	Experimentgruppen
München	C57BL/6	6	19-21	♂	0,25	- Kontrolle (n=5) - 1w Cup (n=5) - 3w Cup (n=5) - 5w Cup (n=5)
Rostock	C57BL/6	10	20-22	♀	0,25	- Kontrolle (n=5) - 1w Cup (n=5) - 3w Cup (n=5) - 5w Cup (n=5)
Hannover	C57BL/6	8-12	20-22	♂	0,2	- Kontrolle (n=5) - 5w Cup (n=5)
Glasgow	C57BL/6	10	20-22	♂	0,25	- Kontrolle (n=3) - 11w Cup (n=4)
Remyelini-sierung	C57BL/6	7-8	19-20	♂	0,25	- Kontrolle (n=5) - 5w Cup (n=5) - 5w Cup + 2w Standard-Haltungsfutter (n=6)
Laquinimod	C57BL/6	8	19-21	♀	0,25	- Cup-Vehikel (n=5) - Cup-Laquinimod (n=5)

2.2 Cuprizone-Intoxikation

Die Versuchstiere wurden für bis zu 11 Wochen mit Cuprizone intoxikiert. Gemahlenes Standardfutter (Futtermehl) wurde mit 0,2% bis 0,25% Cuprizone versetzt. Das Cuprizone-Futtermehl-Gemisch wurde jeden Tag frisch mit einer handelsüblichen Küchenmaschine (Kult X, WMF, Geislingen, Deutschland) hergestellt. Futtermehl und Cuprizone wurden auf Präzisionswaagen abgewogen und auf der höchsten Geschwindigkeitseinstellung für eine Minute unter manuellem Schwenken in der Küchenmaschine vermengt. Das Cuprizone-Futtermehl-Gemisch wurde anschließend in zwei getrennte Petrischalen im Käfig aufgeteilt. Die Kontrollgruppe wurde über den gesamten Zeitraum des Tierversuchs mit Haltungsfutter gefüttert und zusammen mit den Tieren der letzten Behandlungsgruppe zum spätesten Zeitpunkt des Tierexperiments perfundiert. Die Käfige aller

Experimentgruppen wurden dreimal wöchentlich gewechselt. Folgende Abbruchkriterien galten für die im Experiment verwendeten Tiere: ausgeprägte Gewichtsreduktion (>10% in 24h), deutliche Verhaltensänderungen (verringerte Bewegung, Krämpfe, Stupor) oder Infektionen. Die Abbruchkriterien wurden während des gesamten Experiments von keinem Tier erreicht.

2.3 Transkardiale Perfusion und Gewebeentnahme

Zur Einleitung einer terminalen Narkose wurde den Mäusen am Ende des Experiments ein Ketamin/Xylazin-Gemisch (drei Volumenanteile Ketamin (10%), ein Volumenanteil Xylazin (2%)) in einer Dosis von 0,1ml/10g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Fiel die anschließende Prüfung der Schmerz- und Hirnstammreflexe negativ aus, wurde die transkardiale Perfusion begonnen. Haut und *Peritoneum* der Maus wurden am unteren Teil des Abdomens aufgetrennt, das *Peritoneum* bis zum *Diaphragma* durchtrennt und anschließend das *Diaphragma* eröffnet. Der Brustkorb wurde seitlich abgesetzt, am nun frei zugänglichen Herz ein Schnitt am rechten Vorhof gesetzt und eine stumpfe Kanüle vorsichtig in den linken Ventrikel eingeführt. Über diese wurden manuell zunächst 20ml Phosphatpuffer (PBS 1x) und anschließend 50ml Fixierlösung zum Fixieren des Gewebes appliziert. An einer Schlauchpumpe (IsmaTec, IPC-4) wurde die Maus mit einer Geschwindigkeitseinstellung von 40 (circa 22ml/min) weitere sieben Minuten mit Fixierlösung perfundiert. Der Kopf wurde anschließend mit einer scharfen Schere abgetrennt und die Schädelkalotte vorsichtig sagittal eröffnet. Der gesamte Kopf mit eröffneter Kalotte wurde über Nacht bei 4°C in frischer Fixierlösung postfixiert. Am Folgetag wurde das Hirn vorsichtig herauspräpariert und in eine Gewebekassette überführt.

2.4 Entwässerung, Einbettung und Schnitt

Die Gewebekassetten wurden für mindestens sechs Stunden unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend über Nacht bei 4°C in 50% Ethanol inkubiert. Die Dehydrierung erfolgte manuell in einer aufsteigenden Alkoholreihe unter konstanter Bewegung (Tabelle 2). Die Hirne wurden abschließend in flüssigem, 60°C warmen Paraffin in Blöcke eingebettet.

Tabelle 2: Manuelle Entwässerung und Einbettung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	70% Ethanol	40 Minuten
2	70% Ethanol	40 Minuten
3	96% Ethanol	40 Minuten
4	96% Ethanol	40 Minuten
5	96% Ethanol	40 Minuten
6	100% Ethanol	40 Minuten
7	100% Ethanol	40 Minuten
8	100% Ethanol	60 Minuten
9	Xylol 1	40 Minuten
10	Xylol 2	40 Minuten
11	Xylol 3	40 Minuten
12	Paraffin 1	60 Minuten
13	Paraffin 2	60 Minuten
14	Paraffin 3	48 Stunden

Nach dem Aushärten der Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte wurden circa 5µm dicke Paraffinschnitte an einem Rotationsmikrotom (Leica, RM 2255) angefertigt. Auf einen Objektträger wurden zwei Paraffinschnitte direkt aus dem warmen Wasserbad (45-47°C) aufgenommen und über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet.

2.5 Hirngewebe progressiver MS-Patienten

Post mortem Hirngewebe wurde, in Zusammenarbeit mit der niederländischen *Brain Bank* und dem Institut für Neuropathologie am *VU University Medical Center* in Amsterdam, durch ein schnelles Autopsie-Protokoll von Spendern mit progressiver MS gewonnen und in Paraffin-Blöcke eingebettet. Die Studie wurde vom Ethik-Ausschuss der Einrichtung genehmigt und alle Spender beziehungsweise ihre Angehörigen gaben eine schriftliche Einwilligung für die Verwendung des Hirngewebes und den Informationen zum klinischen Krankheitsverlauf zu Forschungszwecken. Für diese Studie wurden sieben chronisch aktive Läsionen von sieben Spendern eingeschlossen (Tabelle 3). Das durchschnittliche Alter zum Todeszeitpunkt in Jahren betrug 52,4 ± 10,2 (Mittelwert ± Standardabweichung (SD)). Die durchschnittliche Zeit, die zwischen Feststellung des Todes und Entnahme und Fixierung des Hirngewebes verging (*post mortem delay*), betrug 10,32 ± 1,27 Stunden.

Das Klassifizieren der Läsionen wurde anhand konsekutiver anti-Myelin-Proteolipid-Protein (anti-PLP) und anti-Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC-II)/LN3 markierter Hirnschnitte durchgeführt [83]. Chronisch aktive Läsionen wurden, wie bereits publiziert [84], als Läsionen mit einem hypozellulären Zentrum und einem hyperzellulären Randsaum definiert.

Tabelle 3: Klinische Details des in der Arbeit verwendeten Hirnmaterials der progressiven MS-Patienten

Geschlecht	Alter Tod	MS Dauer	Geburts -jahr	Jahr MS Diagnose	PMD	MS-Art	Todes-ursache
♂	49y	25y	1959	1983	8h	SPMS	Pneumonie
♂	44y	21y	1965	1988	10,25h	PPMS	Endstadium MS, Infektion
♂	51y	unbekannt	1958	<1990	11h	SPMS	Infektion
♀	60y	10y	1950	2003	10,66h	SPMS	Euthanasie
♀	66y	32y	1945	1988	9,5h	PPMS	Euthanasie
♀	62y	24y	1949	1990	12,5h	PPMS	Kachexie
♀	35y	10y	1979	2004	10,33h	SPMS	Euthanasie

Abkürzungen: *post mortem* Zeit (PMD), sekundär progressive MS (SPMS), primär progressive MS (PPMS).

2.6 Histochemische Färbungen

2.6.1 Luxol-Fast-Blue- / Periodic-Acid-Schiff-Färbung

Die Luxol-Fast-Blue (LFB) / Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung besteht aus einer Kombination mehrerer histochemischer Färbungen. Bei LFB handelt es sich um einen basischen Kupferphthalocyanin-Farbstoff, welcher in saurer, ethanolhaltiger Lösung Verbindungen mit den Lipoproteinen der Myelinscheiden eingeht und diese blau anfärbt [85]. PAS ist die Kombination aus Periodsäure und Schiff'schem Reagenz. Kohlenhydratreiche Komponenten wie Glykogene und Muzine werden in der PAS-Färbung rot-violett dargestellt. Eine optimal durchgeführte LFB/PAS-Färbung erlaubt die Beurteilung des Grades der Demyelinisierung. Die graue Substanz des ZNS sollte hierzu leicht rot-violett, die weiße Substanz kräftig blau angefärbt sein (Abbildung 8).

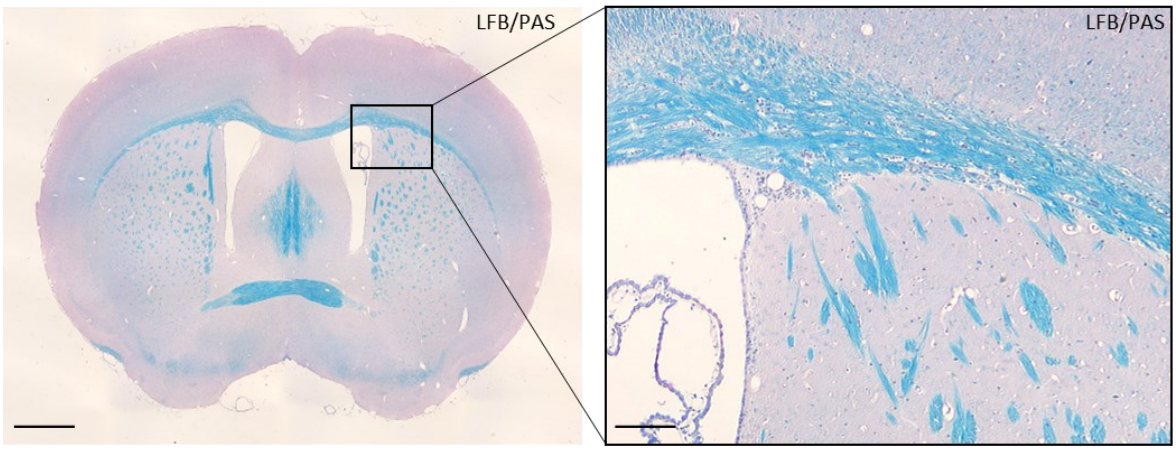


Abbildung 8: LFB/PAS-Färbung mit optimalem Färbeergebnis

Übersicht eines LFB/PAS-gefärbten Maushirnschnitts. Die weiße Substanz (*Corpus callosum*, siehe Ausschnittsvergrößerung) ist kräftig blau angefärbt und lässt sich gut von der farblosen bis rot-violett-angefärbten grauen Substanz unterscheiden. Maßstab: links 200µm, rechts 50µm.

Um ein einheitliches und vergleichbares Färbeergebnis zu erzielen, wurden alle Objektträger einer Färbereihe zur selben Zeit und nach dem gleichen Protokoll verarbeitet. Die Paraffinschnitte wurden nach einem Standardprotokoll entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe bis zu 96%igem Ethanol rehydriert. Über Nacht erfolgte die Inkubation in LFB-Farblösung bei 56°C in einem Wärmeschrank. Am Folgetag erfolgte die Differenzierung von überschüssiger LFB-Färbung in der grauen und weißen Substanz des ZNS in unterschiedlichen Verdünnungen einer Lithiumcarbonat-Lösung. Dieser Differenzierungsprozess konnte so oft wiederholt werden, bis in der mikroskopischen Beurteilung ein optimales Färbeergebnis zu sehen war. Die PAS-Reaktion folgte im direkten Anschluss an die Differenzierung der LFB-Färbung. Die Schritte im Arbeitsprotokoll der LFB/PAS-Färbung sind zusammenfassend in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Arbeitsprotokoll der LFB/PAS-Färbung

Chemikalie	Zeit	Kommentar
Xylol 1	10min	Entparaffinierung und Rehydrierung
Xylol 2	10min	
Xylol 3	10min	
Xylol 50%/Ethanol 50%	5min	
100% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
LFB-Farblösung	10h	LFB-Färbung

Lithiumcarbonat-Lösung Verdünnung 1	10sec	Grobdifferenzierung
70% Ethanol	1min	„Auswaschen“ der Färbung
destilliertes Wasser		Stopp der Differenzierung und mikroskopische Beurteilung
Lithiumcarbonat-Lösung Verdünnung 2	10sec	Grobdifferenzierung
70% Ethanol	1min	„Auswaschen“ der Färbung
destilliertes Wasser		Stopp der Differenzierung und mikroskopische Beurteilung
Periodsäure-Lösung 0,5%	2min	Hydroxylgruppen werden zu Aldehydgruppen oxidiert
destilliertes Wasser	15sec	Spülen
Schiff’sche Reagenz	3min	Bindung der Schiff-Reagenz an die freien Aldehydgruppen
fließendes Leitungswasser	5min	Pinkfärbung der Schiff‘schen Reagenz
destilliertes Wasser	1min	Stopp der PAS-Reaktion
Mayers Hämalaunlösung	5-20sec	Kerngegenfärbung
HCl-Alkohol	3-5sec	Farbumschlag des Hämalaun bei pH 3
fließendes Leitungswasser	5min	„Bläuen“ der Hämatoxylinfärbung
destilliertes Wasser	1min	Stopp der Hämatoxylinfärbung
80% Ethanol	3min	Entwässerung
96% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
Xylol 50%/Ethanol 50%	5min	
Xylol 1	10min	
Xylol 2	10min	
Xylol 3	10min	

Nach der Entwässerung folgte das Eindecken der Schnitte mit einem Deckglas mit DePeX.

2.6.2 Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung ermöglicht durch die Darstellung der Zellart-typischen Zellkörper die prinzipielle Unterscheidung von Nerven- und Gliazellen. Kresylviolett, der verwendete basische Farbstoff, bindet an negativ geladene Zellbestandteile wie die Ribonukleinsäure (RNS) im rauen endoplasmatischen Retikulum (sogenannte Nissl-Schollen) und die Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Zellkern.

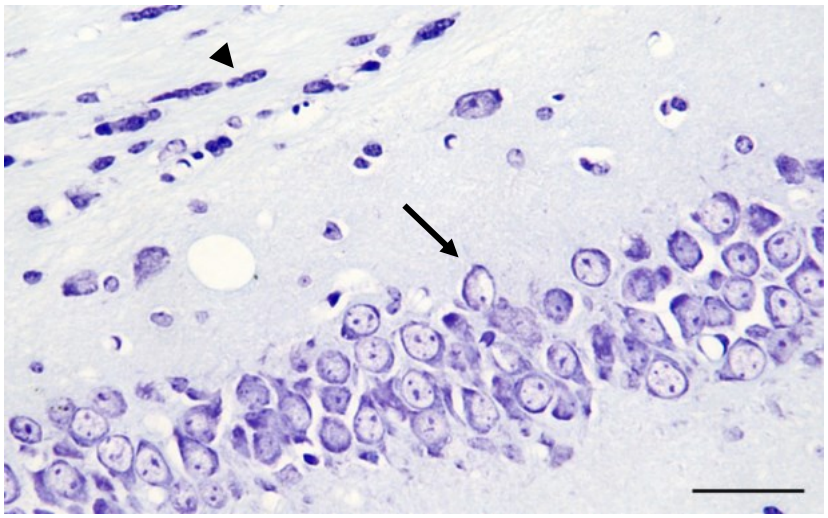


Abbildung 9: Nissl-Färbung
Im Bereich des *Hippocampus* (unterer Bildabschnitt) sind viele, dicht-liegende Neurone mit großen Perikarya (Pfeil) zu erkennen. Im *Corpus callosum* (oberer Bildabschnitt) sind vor allem Gliazellen mit einem kompakten, sogenannten „nackten" Zellkern (Pfeilkopf) dargestellt. Maßstab: 20µm.

Die Nissl-Färbung wurde durchgeführt, um die Hirnregionen, welche in dieser Studie untersucht wurden, eindeutig zu identifizieren. Die Schritte im Arbeitsprotokoll der Nissl-Färbung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Arbeitsprotokoll der Nissl-Färbung

Chemikalie	Zeit	Kommentar
Xylol 1	10min	Entparaffinierung und Rehydrierung
Xylol 2	10min	
Xylol 3	10min	
Xylol 50%/Ethanol 50%	5min	
100% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
90% Ethanol	3min	
70% Ethanol	3min	
destilliertes Wasser	1min	
Nissl-Farblösung	10min	Nissl-Färbung
Natriumacetat-Puffer	20sec	„Auswaschen" überschüssiger Färbung
70% Ethanol	3min	Entwässerung
90% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	

Xylol 50%/Ethanol 50%	5min	
Xylol 1	10min	
Xylol 2	10min	
Xylol 3	10min	

2.6.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Färbung beziehungsweise die Eosin-Färbung wurden in dieser Studie an Hirnschnitten durchgeführt, um nach erfolgten immunhistochemischen Markierungen die Abgrenzung der weißen Substanz von der grauen Substanz zu erleichtern. Bei immunhistochemischen Markierungen mit erwartetem membranösen Markierungsmuster half die Hämatoxylin-Färbung zusätzlich bei der Identifizierung von Zellen (mit blau angefärbtem Zellkern) und Artefakten (kein Zellkern vorhanden). Bei dem verwendeten Hämatoxylin handelte es sich um eine Farbvorstufe, die durch Oxidation zu Hämatein und in Verbindung mit Aluminiumionen zum Farbstoff Hämalaun umgesetzt wird. Das Hämalaun lagert sich aufgrund seiner basischen Eigenschaften an negativ geladene Zellbestandteile wie beispielsweise dem Zellkern an.

Bei immunhistochemischen Markierungen mit erwarteten nukleären oder zytoplasmatischen Markierungsmustern (zum Beispiel anti-Granzym B Markierung), wurde statt der Hämatoxylin- eine Eosin-Färbung durchgeführt. Eosin ist ein Farbstoff, welcher basische beziehungsweise acidophile Zellbestandteile rot anfärbt. Dazu gehören beispielsweise das Zytoplasma und das glatte endoplasmatische Retikulum, nicht aber der Zellkern. Die Schritte für die Hämatoxylin- oder Eosin-Färbung sind im Arbeitsprotokoll der immunhistochemischen Markierung enthalten (Tabelle 11, Schritt 17.1 – 17.3). Im Anschluss an die Hämatoxylin- oder Eosin-Färbung erfolgte das Entwässern gemäß Tabelle 10 und das Eindecken der Schnitte unter einem Deckglas mit DePeX.

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Prinzip immunhistochemischer Nachweise

Zur spezifischen Darstellung von unterschiedlichen Proteinen wurde die immunhistochemische Markierung nach der ABC-Methode angewandt. Dabei handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren von Antigenen:

- Der Primärantikörper bindet möglichst spezifisch an das gesuchte Antigen im untersuchten Gewebe.
- Der biotinylierte Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und bindet an diesen.
- Der zugesetzte Avidin-Biotin-Enzym-Komplex bindet aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin an den biotinylierten Sekundärantikörper.
- Unter H_2O_2 katalysiert die im Avidin-Biotin-Enzym-Komplex enthaltene Meerrettichperoxidase (HRP) die Umwandlung des phenolischen DAB-Substrats in dessen unlösliche Form. Bei dieser Umwandlung entsteht das bräunliche Präzipitat (Abbildung 10).

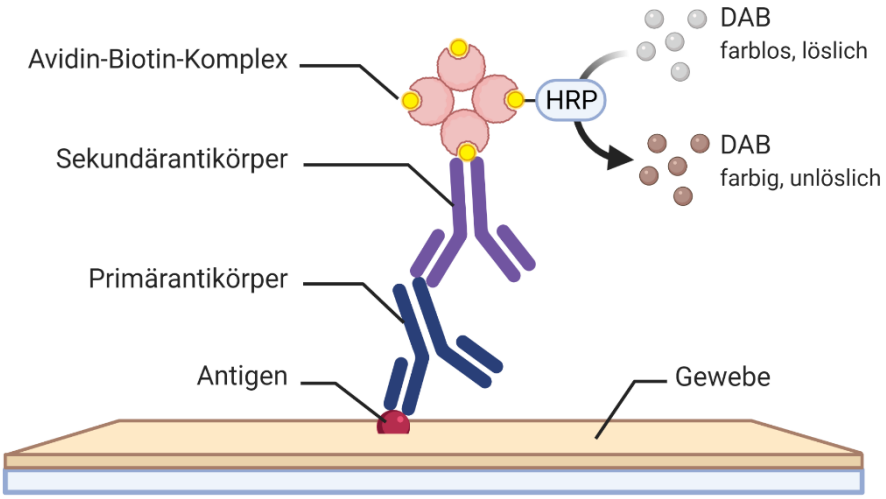


Abbildung 10: Schematische Darstellung der immunhistochemischen ABC-Methode

Abbildung erstellt mit Biorender.com

Im Rahmen der immunhistochemischen Markierung können der Primär- oder Sekundärantikörper unspezifisch Bindungen eingehen. Ein Grund dafür sind unter anderem Immunglobulin (Ig)-ähnliche Proteine im untersuchten Gewebe, an die der Sekundärantikörper bindet und so schlussendlich ein unspezifisches Signal entsteht. Um diesem Phänomen vorzubeugen, wird das sogenannte „Blocken“ durchgeführt. Bevor der Primär- und Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben werden, wird mit 5%igem Normalserum aus der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, das Blocken durchgeführt. Die Bindungsstellen an Ig-ähnlichen Proteinen werden so von Antikörpern aus dem Normalserum maskiert und der Sekundärantikörper kann im weiteren Verlauf nicht mehr daran binden. Somit wird das unspezifische Signal reduziert. Ein weiterer Grund eines unspezifischen Signals ist die endogene Peroxidase. Dieses gewebsintrinsische Enzym ist in der Lage, die Umwandlung von farblosem DAB-Substrat in das unlösliche braune Präzipitat zu katalysieren und so zu einem unspezifischen Hintergrundsignal zu führen. Um dies zu verhindern, werden die Schnitte in 0,35% Wasserstoffperoxid in PBS (1x) für 30 Minuten in einer Glasküvette unter minimalem Lichteinfall inkubiert. So wird die endogene Peroxidase gesättigt, die Aktivität des Enzyms reduziert und das unspezifische Hintergrundsignal gesenkt. Um ein bestmögliches Signal-Rausch-Verhältnis für jeden eingesetzten Primärantikörper zu erhalten, wird das Färbeprotokoll für jeden Primärantikörper in einem zweistufigen Verfahren etabliert. Diese Etablierung beginnt in der vom Antikörper-Hersteller empfohlenen Verdünnung und an dem als Positivkontrolle empfohlenen Gewebe. In einem ersten Schritt wird getestet, ob eine Demaskierung durch Kochen in Citrat-Puffer (pH 6.0) oder Tris/EDTA-Puffer (pH 9.0) notwendig ist und welche Option das beste Resultat liefert. Ausgehend von dem Ergebnis des ersten Etablierungsschrittes wird nun anhand einer Verdünnungsreihe die optimale Konzentration des Primärantikörpers ermittelt, die wiederum das beste Signal-Rausch-Verhältnis ergibt. Auf diese Weise wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper, mit Ausnahme der bereits in der Arbeitsgruppe etablierten anti-PLP, anti-IBA1 und anti-APP Antikörper, etabliert.

2.7.2 Durchführung der immunhistochemischen Markierung

Um ein einheitliches, qualitatives und vergleichbares Ergebnis zu erhalten, wurden alle Objektträger einer immunhistochemischen Markierung zur selben Zeit und nach dem gleichen Arbeitsprotokoll bearbeitet. Zu Beginn des Protokolls erfolgte die Entparaffinierung, beginnend in Xylol sowie eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 6).

Tabelle 6: Entparaffinierung mit Xylol & Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Xylol 1	10 Minuten
2	Xylol 2	10 Minuten
3	Xylol 3	10 Minuten
4	50% Xylol / 50% Ethanol	5 Minuten
5	100% Ethanol	3 Minuten
6	100% Ethanol	3 Minuten
7	96% Ethanol	3 Minuten
8	96% Ethanol	3 Minuten
9	70% Ethanol	3 Minuten
10	50% Ethanol	3 Minuten
11	Destilliertes Wasser	3 Minuten

Das Einbetten in Paraffin sowie das Fixieren des Gewebes führt zu sogenannten Maskierungen (Quervernetzungen, engl. „crosslinks“). Diese Maskierungen binden freie Antigene und können das Ergebnis der immunhistochemischen Markierung verschlechtern. Um die Antigene wieder freizulegen, wurde nach der Entparaffinierung und Rehydrierung das „HIER“ (engl. „heat induced epitope retrieval“) zur Demaskierung angewandt. Die Schnitte wurden dazu für zehn Minuten in Citrat-Puffer (pH 6.0) oder Tris/EDTA-Puffer (pH 9.0) in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Die Objektträger wurden im Anschluss für 15 Minuten in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Unter leichtem Schütteln wurden die Schnitte in Glasküvetten mit PBS (1x) gewaschen. Das Waschen wurde zwischen allen Inkubationsschritten außer dem Blocken wiederholt. Das Blocken wurde mit 5%igem normalen Ziegenserum durchgeführt. Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer überführt, das Blockserum auf die Schnitte aufgetragen und anschließend für eine Stunde inkubiert. Das Blockserum wurde anschließend von den Schnitten abgekippt und der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 7, 8) appliziert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper in immunhistochemischen Markierungen an murinem Gewebe

Antigen	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Wirt	Demaskierung
APP A4	Merck	MAB348	1:5000	Maus	Tris/EDTA
B220 (CD45R)	Invitrogen	14-0452-82	1:400	Ratte	Citrat
CD3	Abcam	ab11089	1:250	Ratte	Tris/EDTA
CD4	Abcam	ab183685	1:1000	Kaninchen	Tris/EDTA
CD8α	Abcam	ab209775	1:1000	Kaninchen	Tris/EDTA
GFAP	Abcam	ab68428	1:250	Kaninchen	Tris/EDTA
Granzym B	Abcam	ab255598	1:500	Kaninchen	Tris/EDTA
IBA1	Wako	019-19741	1:5000	Kaninchen	Tris/EDTA
PLP	BioRad	MCA839G	1:5000	Maus	keine

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper in immunhistochemischen Markierungen an humanem Gewebe

Antigen	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Wirt	Demaskierung
CD3	Abcam	ab11089	1:250	Ratte	Tris/EDTA
CD4	Abcam	ab133616	1:500	Kaninchen	Tris/EDTA
CD8α	Abcam	ab17147	1:100	Maus	Tris/EDTA
MHC-II/LN3	Thermo Fisher	MA5-11966	1:1500	Maus	Citrat
PLP	BioRad	MCA839G	1:5000	Maus	keine

Am Folgetag wurde der benötigte Sekundärantikörper in 5%igem normalen Ziegenserum verdünnt (Tabelle 9) und auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper in immunhistochemischen Markierungen an murinem und humanem Gewebe

Antikörper	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Wirt	Konjugat
Anti-Kaninchen IgG	VECTOR	BA1000	1:200	Ziege	Biotin
Anti-Maus IgG	VECTOR	BA9200	1:200	Ziege	Biotin
Anti-Ratte IgG	VECTOR	BA9400	1:200	Ziege	Biotin

Der Avidin-Biotin-Enzym-Komplex muss mindestens 30 Minuten vor dem Verwenden aus Reagenz A (Avidin) und Reagenz B (biotinyliertes HRP) angesetzt werden. Nach einer einstündigen Inkubationszeit des ABC-Komplexes bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer und kurzem Waschen wurde der DAB-Komplex auf die Objektträger pipettiert und nach zehn Minuten Inkubation für zehn Sekunden in Leitungswasser und anschließend für fünf Minuten in destilliertem Wasser abgewaschen und somit die enzymatische Farbreaktion gestoppt. Um das Abgrenzen der anatomischen Strukturen im Hirnschnitt zu erleichtern, wurde nach einigen immunhistochemischen Markierungen mit sehr geringem Hintergrundsignal eine Hämatoxylin-Gegenfärbung (H-Färbung) oder eine Eosin-Gegenfärbung durchgeführt (Kapitel 2.6.3). Die Schnitte wurden nachfolgend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tabelle 10) dehydriert und mit DePeX unter einem Deckglas eingedeckt.

Tabelle 10: Dehydrierung mit aufsteigender Alkoholreihe

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Destilliertes Wasser	3 Minuten
2	50% Ethanol	3 Minuten
3	70% Ethanol	3 Minuten
4	96% Ethanol	3 Minuten
5	96% Ethanol	3 Minuten
6	100% Ethanol	3 Minuten
7	100% Ethanol	3 Minuten
8	50% Xylol / 50% Ethanol	5 Minuten
9	Xylol 1	10 Minuten
10	Xylol 2	10 Minuten
11	Xylol 3	10 Minuten

Die Schritte im Arbeitsprotokoll der standardisierten immunhistochemischen Markierung sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Arbeitsprotokoll der immunhistochemischen Markierung

Schritt	Arbeitsablauf
1	Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (gem. Tabelle 6)
2	Demaskierung („HIER“): zehnminütiges Kochen der Schnitte in Citrat- (pH 6.0) oder Tris/EDTA-Puffer (pH 9.0)
3	Abkühlung der Objektträger auf Raumtemperatur in einem Wasserbad
4	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
5	„Blocking“ mit 5% Normalserum für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
6	Normalserum abkippen
7	Primärantikörper applizieren und über Nacht bei 4°C inkubieren
8	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
9	Inkubation für 30 Minuten in 0,35% H_2O_2 unter leichtem Schütteln im Dunkeln
10	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
11	Sekundärantikörper applizieren und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
12	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
13	Applikation des Avidin-Biotin-Komplexes und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
14	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
15	Applikation des DAB-Komplexes zur Visualisierung für zehn Minuten unter einem Abzug
16	Zehn Sekunden spülen in Leitungswasser
17	Fünf Minuten in destilliertem Wasser spülen
17.1	H-Färbung, 15 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung und anschließend fünf Sekunden in HCl-Alkohol eintauchen
17.2	Zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser inkubieren (bläuen)
17.3	Zwei Minuten in Eosin-Farblösung, danach in 70% Ethanol differenzieren
18	Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (gem. Tabelle 10)
19	Eindecken der Objektträger mit DePeX und Deckgläsern unter dem Abzug
20	Trocknen der eingebetteten Schnitte unter dem Abzug

= fakultative Arbeitsschritte

2.8 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

2.8.1 Prinzip der Immunfluoreszenzmarkierung

Um gleichzeitig mehr als nur ein Protein beziehungsweise Antigen darzustellen, wurden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen durchgeführt. Wie die bereits beschriebene Immunhistochemie ist die Immunfluoreszenzmarkierung eine indirekte Nachweismethode. Die Methode beruht auf folgendem Prinzip:

- Die beiden Primärantikörper aus verschiedenen Spezies binden möglichst spezifisch an die entsprechenden Antigene.
- Die Sekundärantikörper sind mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) gekoppelt und binden an die Primärantikörper.
- Eine universelle nukleäre Markierung erfolgt mit dem fluoreszierenden 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).
- Die Anregung des Fluorochroms erfolgt am Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM6 B) mit der jeweiligen Anregungswellenlänge.
- Dort, wo die Sekundärantikörper an die Primärantikörper binden konnten, entsteht bei Anregung ein Signal in Form von emittiertem Licht in der spezifischen Emissionswellenlänge des Fluorochroms (Abbildung 11).

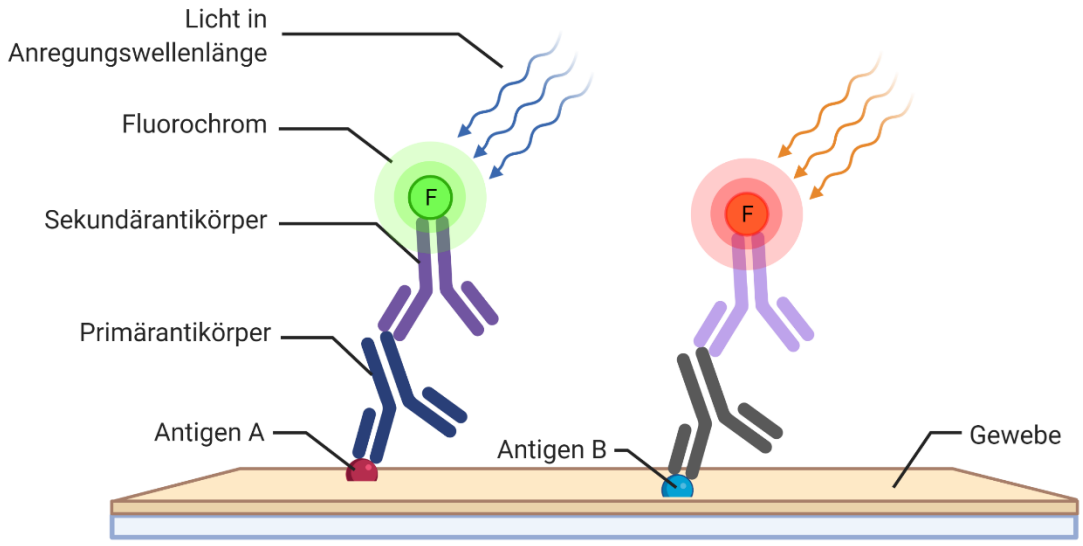


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenzmarkierung

Abbildung erstellt mit Biorender.com

2.8.2 Durchführung einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

Die ersten Schritte im Arbeitsprotokoll der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung entsprechen den ersten Vorgängen im Protokoll der immunhistochemischen Markierung (Tabelle 11). Nach dem Blocken wurden die Primärantikörper (Tabelle 12, 13) in entsprechender Verdünnung in 5%igem normalen Eselserum auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper in Immunfluoreszenzmarkierungen an murinem Gewebe

Antigen	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Wirt	Demaskierung
CD3	Abcam	ab11089	1:250	Ratte	Tris/EDTA
CD8α	Abcam	ab209775	1:1000	Kaninchen	Tris/EDTA
Granzym B	Abcam	ab255598	1:500	Kaninchen	Tris/EDTA
Ki-67	Abcam	ab15580	1:250	Kaninchen	Citrat
PCNA	Abcam	ab29	1:10000	Maus	Tris/EDTA

Tabelle 13: Verwendete Primärantikörper in Immunfluoreszenzmarkierungen an humanem Gewebe

Antigen	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Wirt	Demaskierung
CD3	Abcam	ab11089	1:250	Ratte	Tris/EDTA
CD8α	Abcam	ab17147	1:100	Maus	Tris/EDTA
Granzym B	Abcam	ab255598	1:1000	Kaninchen	Tris/EDTA

Am Folgetag wurden die Sekundärantikörper in 5%igem Eselserum verdünnt (Tabelle 14). Die jeweiligen Sekundärantikörper wurden 1:250 verdünnt in 5%igem Eselserum auf die Schnitte aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Tabelle 14: Verwendete Sekundärantikörper in Immunfluoreszenzmarkierungen

Antikörper	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Wirt	Konjugat
Anti-Kaninchen-IgG	Abcam	ab150065	1:250	Esel	Alexafluor488
Anti-Maus-IgG	Abcam	ab150109	1:250	Esel	Alexafluor488
Anti-Ratte-IgG	Invitrogen	A21209	1:250	Esel	Alexafluor594

Um ein „Ausbleichen“ des Fluorochroms zu vermeiden, wurden alle folgenden Arbeitsschritte unter möglichst geringem Lichteinfall durchgeführt. Für die nukleäre Markierung wurden die Schnitte für zehn Minuten mit DAPI in einer Konzentration von 5µg/ml inkubiert. In humanem Gewebe wurde die unter anderem von Erythrozyten und

Lipofuszin-Granula ausgehende Autofluoreszenz durch eine zehnminütige Inkubation in Sudanschwarz-Farblösung abgeschwächt (engl. „quenching“). Die Schnitte wurden anschließend in PBS (1x) dreifach gespült und abschließend für eine Minute in destilliertes Wasser überführt. Die Objektträger wurden danach mit dem wässrigen Eindeckmedium Immu-Mount™ unter einem Deckglas eingedeckt. Die Schnitte wurden anschließend bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Tabelle 15: Arbeitsprotokoll der Immunfluoreszenzmarkierung

Schritt	Arbeitsablauf
1	Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (gem. Tabelle 6)
2	Demaskierung („HIER“): zehn-minütiges Kochen der Schnitte in Citrat- oder Tris/EDTA-Puffer
3	Abkühlung der Objektträger auf Raumtemperatur in einem Wasserbad
4	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
5	„Blocking“ mit 5% Normalserum für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
6	Normalserum abkippen
7	Primärantikörper applizieren und über Nacht bei 4°C inkubieren
8	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
9	Sekundärantikörper applizieren und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
10	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
11	Applikation der DAPI Lösung (5µg/ml).
12	Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
13	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
13.1	An humanem Gewebe: Inkubation für zehn Minuten in Sudanschwarz-Farblösung
13.2	Kurzes Spülen in 70% Ethanol zur Entfernung von überschüssiger Sudanschwarz-Farblösung
13.3	Drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
14	Spülen in destilliertem Wasser für eine Minute
15	Einbetten der Objektträger mit Immu-Mount™
16	Lagerung bei 4°C in dunkler Umgebung

= Arbeitsschritte unter minimalem Lichteinfall

2.9 Negativkontrollen

Spezifische oder unspezifische Bindungen der verwendeten Sekundärantikörper, hohe endogene Biotin-Konzentrationen sowie ein hohes Vorkommen von endogener Peroxidase-Aktivität im untersuchten Gewebe führen zu einem unerwünschten, nicht spezifischen Signal im Rahmen von immunhistochemischen Markierungen. Ob der verwendete Primärantikörper für die Entstehung eines spezifischen Signals verantwortlich ist, lässt sich mit verschiedenen Negativkontrollen überprüfen (Abbildung 12 A, B). Das in jeder immunhistochemischen Markierung als Negativkontrolle mitgeführte Gewebe exprimierte das untersuchte Antigen und wurde zur gleichen Zeit und nach demselben Protokoll wie alle anderen Schnitte verarbeitet. Der Primärantikörper wird nicht auf die Negativkontrollen pipettiert, stattdessen inkubierten diese über Nacht in 5%igem Normalserum. In Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen besteht darüber hinaus das potenzielle Risiko, dass die verwendeten Sekundärantikörper an die „falschen" Primärantikörper binden. In sogenannten „Kreuzkontrollen", die parallel zu allen Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen durchgeführt wurden, wurden jeweils beide Primärantikörper mit den „nicht passenden" Sekundärantikörpern inkubiert (Abbildung 12 D, D'). Negativkontrollen, wie oben beschrieben, wurden zusätzlich durchgeführt (Abbildung 12 D''). Das Ausmaß des Hintergrundsignals, welches durch Bindungen des Primärantikörpers an beispielsweise Fc-Rezeptor-tragende Zellen entsteht, lässt sich mit Isotyp-Kontrollen untersuchen. In der Arbeit wurden hierzu Antikörper ohne spezifisches Zielantigen verwendet, die der gleichen Istoyp-Klasse zugeordnet werden, wie die verwendeten Primärantikörper. Parallel zu den durchgeführten immunhistochemischen Markierungen wurden Schnitte mit den in Tabelle 16 aufgeführten Isotyp-Kontrollen in der gleichen Konzentration wie der verwendete Primärantikörper inkubiert.

Tabelle 16: Verwendete Isotyp-Kontrollen

Isotyp	Firma	Bestellnummer	Wirt
IgG1	Thermo Fisher	14-4301-82	Ratte
IgG1	Thermo Fisher	14-4714-85	Maus
IgG2b	Thermo Fisher	14-4732-85	Maus
IgG	Thermo Fisher	86199	Kaninchen

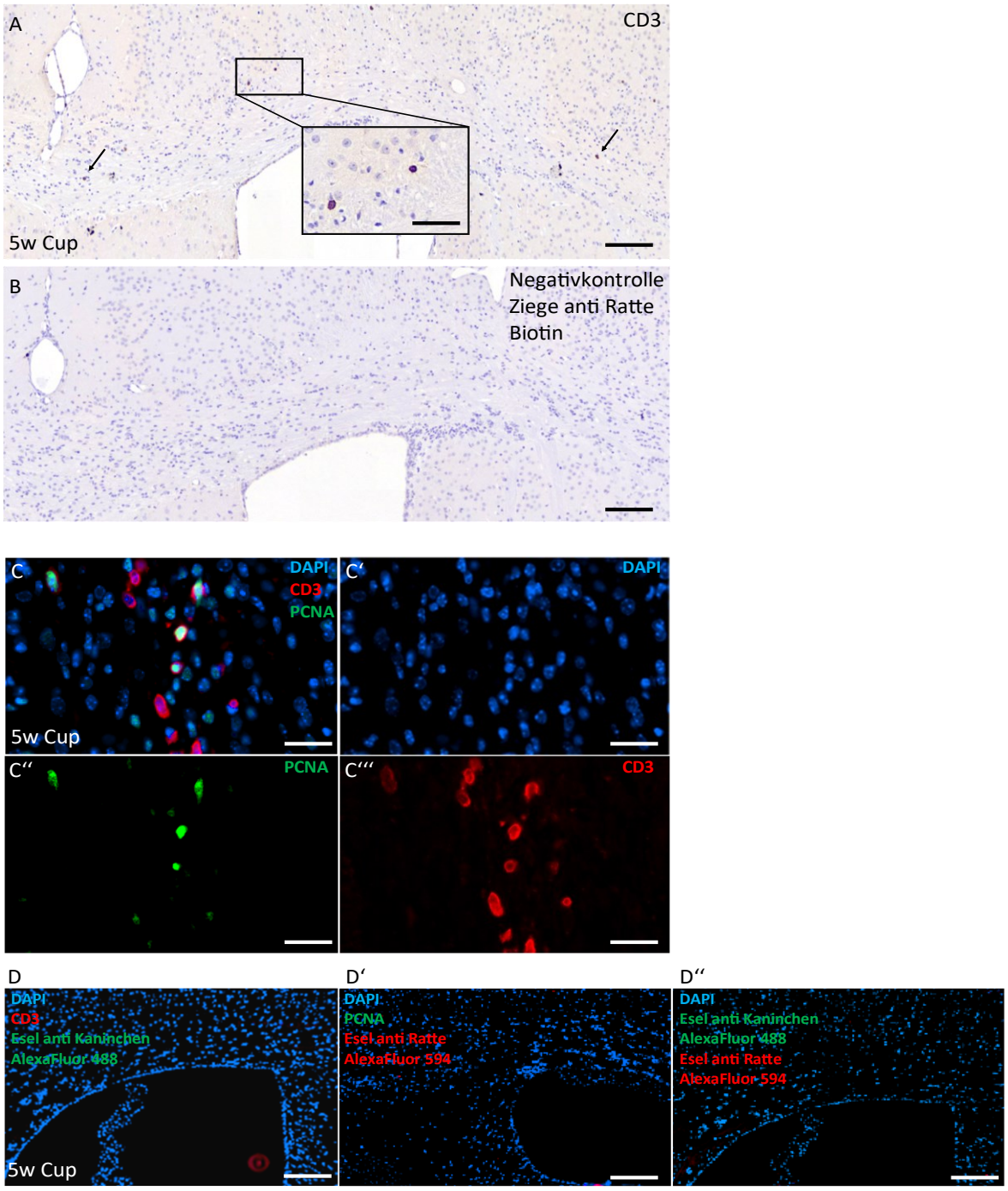


Abbildung 12: Negativkontrollen und Kreuzkontrollen bei immunhistochemischen Markierungen und Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

(**A**) Eine immunhistochemische Markierung mit einem anti-CD3 Antikörper stellt braune, membranös-markierte Zellen (Pfeile, Ausschnittsvergrößerung) im *Corpus callosum* von fünf Wochen Cuprizone (5w Cup) - intoxikierten Mäusen dar. (**B**) Die Negativkontrolle zeigt, neben der histochemischen Hämatoxylin-Färbung, kein Signal. (**C-C‘‘‘**) Eine Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung am Beispiel von CD3 und Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) doppelmarkierten 5w Cup Hirnschnitten, nukleär markiert mit 4′,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, blau). (**D, D‘**) „Kreuzkontrollen“ zeigen Hirnschnitte, die mit einem Primärantikörper und dem nicht zugehörigen Sekundärantikörper inkubiert wurden. (**D‘‘**) Eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper, aber mit beiden in dem Experiment verwendeten Sekundärantikörpern. Maßstab (**A**, **B**): 70µm, Ausschnittsvergrößerung (**A**): 30µm, (**C-C‘‘‘**): 15µm, (**D-D‘‘**): 70µm.

2.10 Auswertung

2.10.1 Untersuchte Hirnregionen

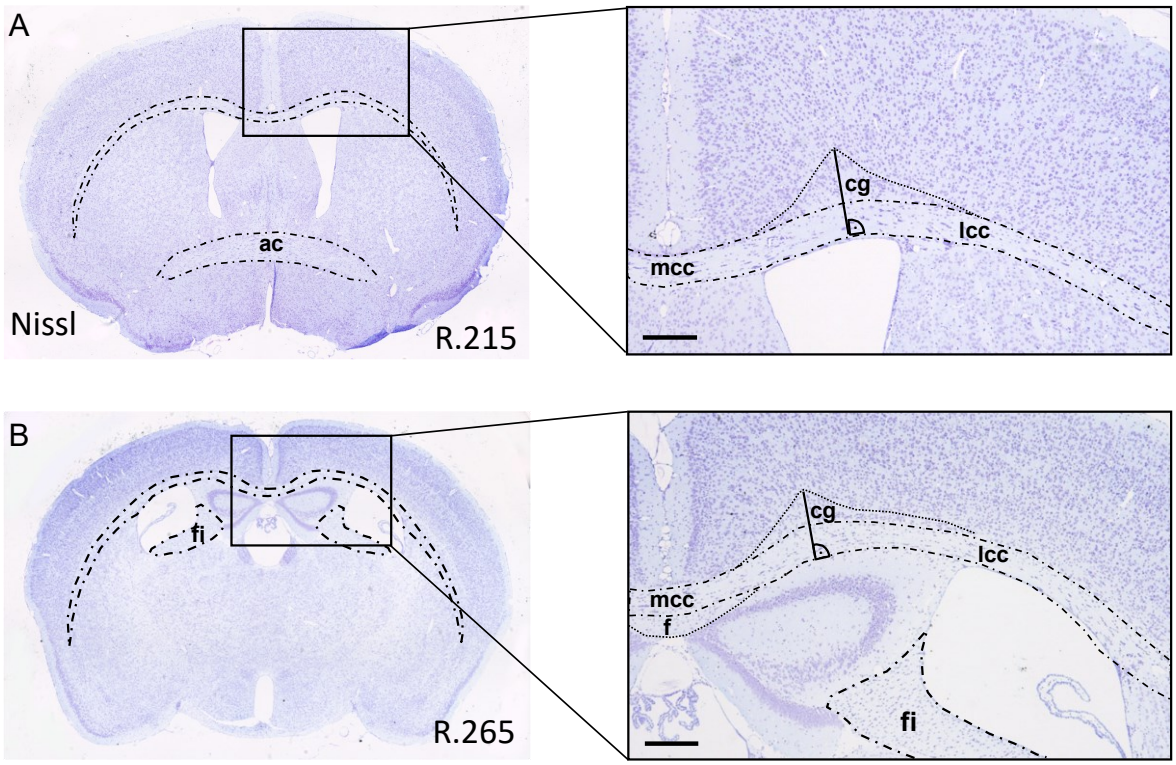


Abbildung 13: Untersuchte Hirnregionen

(**A**) Übersicht der rostral gelegenen Hirnregion auf Höhe der *Commissura anterior* (ac) (Region 215). Die Ausschnittsvergrößerung stellt das *Corpus callosum* (cc) dar, unterteilt in mediales (mcc) und laterales *Corpus callosum* (lcc) mithilfe eines von der Spitze des *Cingulum* (cg) gefällten Lots. (**B**) Übersicht der okzipital gelegenen untersuchten Hirnregion auf Höhe des rostralen *Hippocampus* (Region 265). Die Unterteilung in mcc und lcc erfolgt analog zu der in (**A**). Abkürzungen = mcc: mediales *Corpus callosum*, lcc: laterales *Corpus callosum*, cg: *Cingulum*, f: *Fornix cerebri*, ac: *Commissura anterior*, fi: *Fimbria hippocampi*. Maßstab (**A, B**): 200µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

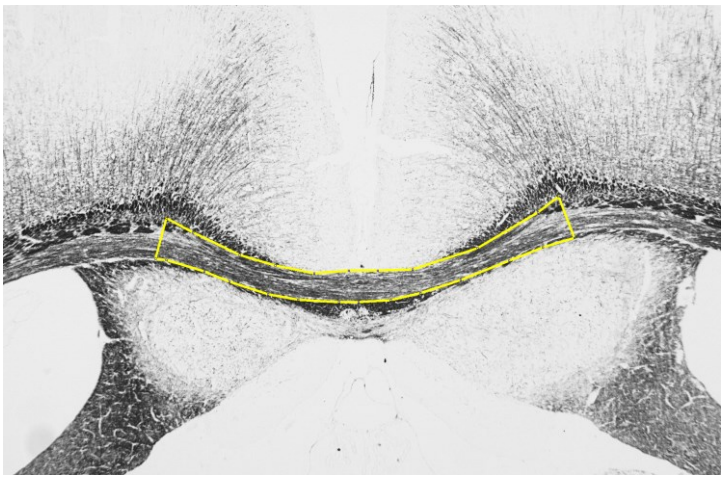
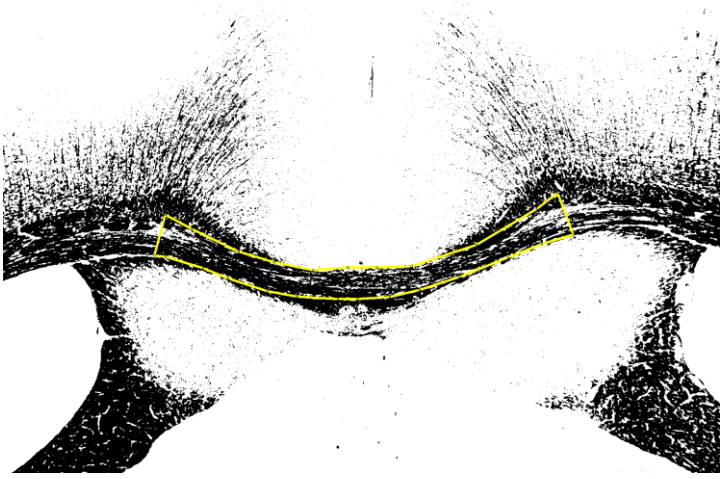
Unterschiedliche ROIs (engl. „regions of interest“) wurden definiert, um verschiedene Anteile des *Corpus callosum* selektiv beurteilen zu können. Von dem höchsten Punkt des *Cingulum* wurde ein Lot gefällt, welches das *Corpus callosum* in einen medialen und lateralen Anteil unterteilt (gem. Abbildung 13). In dieser Studie wurden die Hirnregion 215 und 265 gemäß des Maushirn-Atlas nach Sidman *et al.* (http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html) untersucht. Region 215 befindet sich rostral auf Höhe der *Commissura anterior*. Hirnregion 265 ist weiter okzipital auf Höhe des rostralen *Hippocampus* gelegen. Gemäß dem Maushirn-Atlas von Franklin und Paxinos [86] entspricht Region 215 den stereotaktischen Koordinaten Bregma +0.14 und Region 265 Bregma -1.01. In Region 215 wurden als ROIs das mediale und das laterale *Corpus*

callosum sowie die *Commissura anterior* definiert. Die ROIs in Region 265 waren das mediale und das laterale *Corpus callosum* sowie die *Fimbriae hippocampi*.

2.10.2 Quantifizierung der optischen Dichte

Hirnschnitte wurden über die Bestimmung der optischen Dichte ausgewertet, wenn eine immunhistochemische Markierung eine manuelle Auszählung von Zellen oder Partikeln nicht zuverlässig ermöglicht. Dies war bei den durchgeführten anti-PLP, anti-IBA1 und anti-GFAP Markierungen der Fall. Die Hirnschnitte wurden zunächst mit Hilfe eines Mikroskops (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einem installierten Kamerasystem (DMC 6200, Leica, Wetzlar, Deutschland) digitalisiert. An einem Hirnschnitt wurden alle Einstellungen des Mikroskops optimiert, um dieselben Einstellungen bei allen weiteren Hirnschnitten so beizubehalten und eine möglichst große Vergleichbarkeit der aufgenommenen Fotos zu gewährleisten. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit der Software „ImageJ“ (Version 1.52a für Windows, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) [87]. Die aufgenommenen Fotos wurden verblindet in ImageJ importiert und die definierte ROI (engl. „region of interest“) mithilfe der „Polygon Auswahl“ manuell umrandet. Der Bildtyp wurde anschließend in ein „8-Bit-Graustufenbild“ (engl. „8-bit-grayscale“) geändert. Um die Analyse der optischen Dichte für alle importieren Aufnahmen zu vereinheitlichen, wurde eine sogenannte Schwellenwertmessung durchgeführt. Durch diesen angelegten Schwellenwert wird jeder Pixel in der importierten Aufnahme als eindeutig „schwarz“ oder eindeutig „weiß“ zugeordnet, indem die importierte Aufnahme in einen binären Bildtyp geändert wurde. Die von ImageJ durchgeführte Analyse „Area fraction“ bestimmte nun den Anteil an schwarzen Pixeln (spezifische immunhistochemische Markierung) im Verhältnis zu weißen Pixeln (kein spezifisches Signal im Hirnschnitt) und gab einen Prozentwert in der Einheit „[%] Area“ an. Für die folgenden immunhistochemischen Markierungen wurden jeweils Schwellenwertmessungen ausgewählt, die nach der Umwandlung in den binären Bildtyp das ursprüngliche, spezifische Markierungsmuster der immunhistochemischen Markierung am besten widerspiegelten: anti-PLP-Markierung: Schwellenwert „Max Entropy“, anti-IBA1-Markierung: Schwellenwert „Default“, anti-GFAP-Markierung: Schwellenwert „Huang“. Eine Zusammenfassung der einzelnen Schritte findet sich in Tabelle 17 am Beispiel einer immunhistochemischen anti-PLP Markierung.

Tabelle 17: Arbeitsschritte bei der Messung der optischen Dichte mit ImageJ

Funktion in ImageJ	Abbildung	Kommentare
„Polygon Auswahl“		Die ROI wurde manuell umrandet. Hier: das mediale *Corpus callosum* in einer immunhisto-chemischen PLP-Markierung (gelbe Umrandung)
„Image“ „Type“ „8-bit“		Die importierte Aufnahme wurde in ein „8-Bit-Graustufenbild“ umgewandelt.
„Image“ „Adjust“ „Threshold“		Die Aufnahme wurde nach dem ausgewählten Schwellenwert in ein binäres Format umgewandelt. Die Dichte schwarzer Pixel in der ROI wurde durch ImageJ gemessen und in [%] Area angegeben.

2.10.3 Quantifizierung von Zelldichten

Nach durchgeführten histochemischen Markierungen, die ein zuverlässiges manuelles Auszählen von Zellen, Partikeln oder Sphäroiden ermöglichten, wurden von jedem Hirnschnitt Fotos mit einem manuellen Scanning-Mikroskop aufgenommen (Mikroskop: Nicon Eclipse E200, Kamera: Basler acA1920-40uc). Die ROI des jeweiligen Gewebeschnitts wurde hierzu am Mikroskop umrandet und mit der Software „Manual-WS-Imaging 2019“ (Version 2019b) von Microvisioneer an einem Computer automatisch eine zusammengesetzte Aufnahme erstellt. Alle Aufnahmen wurden mit denselben Einstellungen am Mikroskop angefertigt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Das Zählen der spezifisch markierten Zellen wurde mit dem Programm „ViewPoint“ (Version 1.0.0.9628) von PreciPoint durchgeführt. Hierzu wurden die jeweiligen Bilder verblindet importiert, die exakte ROI manuell umrandet und unter Zuhilfenahme eines Markierungs-Werkzeugs die spezifisch markierten Zellen, Partikel oder Sphäroide innerhalb der ROI markiert. Werte bezüglich der Anzahl der markierten Zellen und die Fläche der ROI konnten anschließend exportiert und so eine Zelldichte pro mm² errechnet werden. Pro Objektträger wurden zwei Hirnschnitte desselben Tieres auf diese Weise verblindet ausgewertet. Nach Auflösung der Verblindung wurde aus den Zelldichten beider Hirnschnitte eines Tieres der $\text{Mittelwert}_{\text{Tier}}$ gebildet. Aus allen $\text{Mittelwerten}_{\text{Tier}}$ einer Experimentgruppe wurde der $\text{Mittelwert}_{\text{Gruppe}}$ errechnet und dieser mit anderen $\text{Mittelwerten}_{\text{Gruppe}}$ statistisch untereinander verglichen.

Das Quantifizieren der Dichten immunhistochemisch markierter Zellen in humanen MS-Läsionen erfolgte mit den gleichen Programmen und nach vergleichbarer Vorgehensweise. In jedem Hirnschnitt und in jeder ROI (Rand und Zentrum der Läsion und der normal-erscheinenden weißen Substanz, engl. „normal-appearing white matter“ (NAWM)) wurden aus der Anzahl spezifisch markierter Zellen und der Fläche eine Zelldichte pro mm² errechnet.

2.10.4 Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen wurden in dieser Arbeit durchgeführt, um $CD3^+$ T-Zellen hinsichtlich kolokalisierter membranöser Proteine (CD8), zytoplasmatischer Proteine (Granzym B) und nukleärer Proteine (PCNA und KI-67) zu untersuchen. Zur Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen wurden an einem Epifluoreszenzmikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) zunächst in allen Kanälen Aufnahmen in optimalen Einstellungen angefertigt und gespeichert.

Für die durchgeführten Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen wurden Fluoreszenzkanäle mit folgenden Filtereigenschaften für die Aufnahmen genutzt:

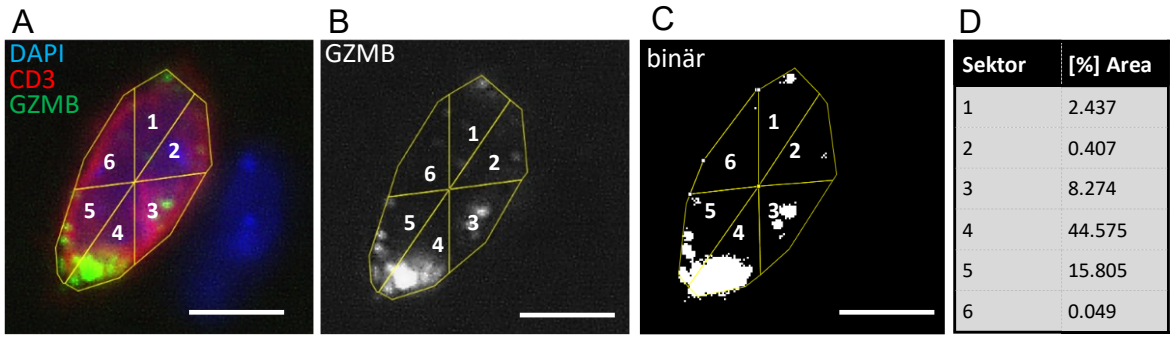
- blau - Exzitation (Ex.) 350/50nm, Emission (Em.) 460/50nm: DAPI,
- rot - Ex. 560/40nm, Em. 645/75nm: CD3,
- grün - Ex. 480/40nm, Em. 527/30nm: CD8, GZMB, PCNA oder KI-67.

Die Aufnahmen aller Hirnschnitte wurden am selben Tag vorgenommen, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Im roten Kanal wurden in 63-facher Objektivvergrößerung spezifisch markierte $CD3^+$ Zellen in der ROI aufgesucht, der Fokus eingestellt und ein Bild in allen Kanälen aufgenommen und gespeichert. Auf diese Weise wurden 15-20 $CD3^+$ Zellen pro ROI und pro Hirnschnitt aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder wurden im Nachhinein manuell ausgewertet, indem jede $CD3^+$ Zelle auf ein kolokalisiertes (doppelt-positives) Signal im grünen Kanal untersucht wurde. Pro Objektträger wurden auf diese Weise zwei Hirnschnitte desselben Tieres ausgewertet. So konnte ein Verhältnis von $CD3^+$doppelt-positiv zu $CD3^+$einfach-positiv gebildet werden. Die Zellzahlen der beiden ausgewerteten Hirnschnitte wurden zu einem $Mittelwert_{Tier}$ zusammengefasst. Aus den $Mittelwerten_{Tier}$ wurde ein $Mittelwert_{Gruppe}$ gebildet.
Analog erfolgte die Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen in untersuchten humanen Hirnschnitten. Pro ROI und Hirnschnitt wurden 15-20 $CD3^+$ auf ein kolokalisiertes Signal überprüft.

2.10.5 Quantifizierung der Verteilung Granzym B^+ Vesikel in $CD3^+$ Zellen

Eine zusätzliche Art der Auswertung von Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen in dieser Arbeit bestand in der Analyse der räumlichen Verteilung von Granzym B^+ Vesikeln innerhalb von $CD3^+$ Zellen. Einzelne $CD3^+$ Zellen wurden hierzu, wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben, innerhalb der ROI aufgesucht und eine Aufnahme in allen Kanälen (blau: DAPI, rot: CD3, grün: Granzym B) in der größten Objektivvergrößerung (63-fach) gespeichert. Aufnahmen, in denen alle drei Farbkanäle überlagert dargestellt werden, wurden als RGB-Bild in ImageJ importiert (Abbildung 14 A). Die $CD3^+$ Zelle wurde mit der ImageJ-Funktion „Polygon-Auswahl“ manuell umrandet. Eine eigens für diese Auswertung angefertigte Befehlsabfolge für ImageJ (sogenanntes „Macro“) unterteilte die polygonale Auswahl in sechs gleich große Sektoren. Das importierte RGB-Bild wurde nun mit der ImageJ-Funktion „RGB-Stack“ verlustfrei in den ursprünglichen blauen, roten und grünen Kanal konvertiert (Abbildung 14 B). Der ehemals grüne Kanal wurde nun als 8-Bit-Graustufenbild dargestellt und repräsentiert das spezifische Signal der anti-Granzym B Markierung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen. Eine nun folgende Schwellenwertmessung

konvertierte die importierte Aufnahme in einen binären Bildtyp, indem alle Pixel in der Aufnahme eindeutig weiß (spezifische Immunfluoreszenzmarkierung) oder eindeutig schwarz (kein spezifisches Signal) zugeordnet wurden (Abbildung 14 C). Für jeden der sechs Sektoren konnte so der Anteil weißer Pixel gegenüber schwarzen Pixeln bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Die so bestimmte optische Dichte pro Sektor wurde in der Einheit „[%] Area“ angegeben (Abbildung 14 D). Für die Interpretation der Ergebnisse wurden zwei Zustände definiert: Bei ≥ 75% der [%] Area in zwei benachbarten Sektoren galt die analysierte Zelle als polarisiert. Bei < 75% der [%] Area in zwei benachbarten Sektoren galt die analysierte Zelle als nicht polarisiert.



Sektor	[%] Area
1	2.437
2	0.407
3	8.274
4	44.575
5	15.805
6	0.049

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Auswertung der Granzym B Vesikelverteilung innerhalb einzelner Zellen mit ImageJ

(**A**) Eine $CD3^+$Granzym B $(GZMB)^+$ Zelle im RGB-Bildformat. (**B**) Umwandlung mit der Funktion „RGB-Stack“ in ein 8-Bit-Graustufenbild. (**C**) Umwandlung in ein binäres Bildformat. (**D**) Gemessene optische Dichte pro Sektor. Abkürzungen = DAPI: 4′,6-Diamidino-2-phenylindole, GZMB: Granzym B. Maßstab (**A**-**C**): 5µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

2.10.6 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung sowie die grafische Darstellung wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 8.0.2, GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler (engl. „Standard Error of the Mean“ (SEM)) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als Sterne gekennzeichnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurden die importierten Daten auf Normalverteilung überprüft. Die angewandten statistischen Tests sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben.

3. Ergebnisse

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlich in: Kaddatz, Hannes; Joost, Sarah; Nedelcu, Julia; Chrzanowski, Uta; Schmitz, Christoph; Gingele, Stefan et al. (2021): Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. In: Glia 69 (4), S. 925–942. DOI: 10.1002/glia.23937 [88].

3.1 Cuprizone-induzierte Pathologie

In einem ersten Schritt wurde der Verlust der Myelin-Integrität über den Zeitraum der Cuprizone-Intoxikation analysiert. Mäuse wurden mit 0,25% Cuprizone vermischt im Standard-Futter intoxikiert und nach einer Woche sowie drei und fünf Wochen perfundiert. Koronare Hirnschnitte von Hirnregion 215 wurden histochemisch gefärbt und immunhistochemisch markiert, um den Verlust von Myelin im *Corpus callosum* darzustellen (Abbildung 15).

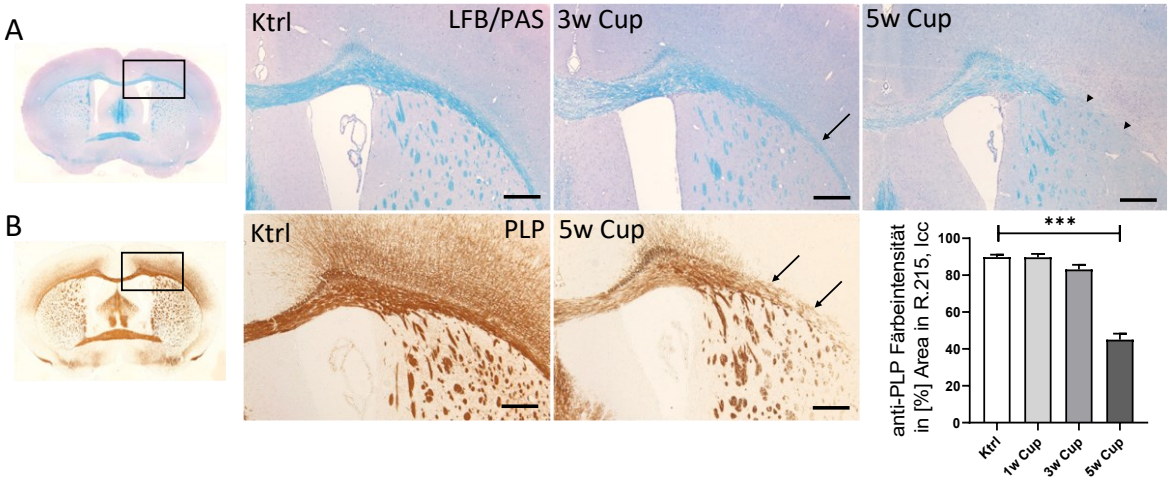


Abbildung 15: Cuprizone-induzierte Demyelinisierung

(**A**) Die histochemische Luxol-Fast-Blue (LFB) / Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung stellt in Kontrollen (Ktrl) das *Corpus callosum* kräftig blau angefärbt dar. Nach drei Wochen Cuprizone-Intoxikation (3w Cup) ist im Bereich des lateralen *Corpus callosum* (Pfeil) eine deutliche Abnahme der Färbeintensität zu erkennen. Nach fünf Wochen Cuprizone (5w Cup) ist das gesamte *Corpus callosum* deutlich schwächer angefärbt. Im lateralen *Corpus callosum* (Pfeilköpfe) ist ein vollständiger Verlust der LFB/PAS-Färbeintensität erkennbar. (**B**) Die immunhistochemische Markierung mit anti-Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) stellt in Kontrolltieren eine regelrechte Markierung des Myelins im *Corpus callosum* und im *Cortex* dar. Nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation ist eine deutliche Abnahme des Signals, vor allem im lateralen *Corpus callosum* (Pfeile) sichtbar. Unterschiede zwischen Kontrollen und Cuprizone-Experimentgruppen wurden mit der Einweg-Varianzanalyse (engl. „one-way ANOVA“) gefolgt vom Dunnett‘s Test ermittelt. (**A**, **B**) Alle Gruppen n=5. (**A**, **B**) Maßstab: 200µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

In der LFB/PAS-Färbung stellte sich das *Corpus callosum* von Kontrolltieren kräftig blau angefärbt dar. Im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation war eine Abnahme der LFB-Färbeintensität vor allem im lateralen *Corpus callosum* zu erkennen (Abbildung 15 A). Das Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) ist das mengenmäßig häufigste Protein in den Myelinscheiden und lässt sich immunhistochemisch nachweisen. In der densitometrischen Auswertung der anti-PLP markierten Hirnschnitte stellte sich eine signifikante Abnahme der optischen Dichte im lateralen *Corpus callosum* über den Verlauf der Cuprizone-Intoxikation dar (Ktrl: 89,78 ± 1,39 %, 1w Cup: 89,75 ± 1,78 %, 3w Cup: 83,12 ± 2,47 %, 5w Cup: 45,00 ± 3,30 %; Abbildung 15 B).

Eine Aktivierung und Dichtezunahme von Mikrogliazellen ist ein weiteres Charakteristikum der Cuprizone-induzierten Pathologie. Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) wird von Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert. Im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation war eine signifikante Zunahme der Dichte von IBA1-exprimierenden Zellen im lateralen *Corpus callosum* zu beobachten (Ktrl: 5,96 ± 0,36 %, 1w Cup: 11,92 ± 1,03 %, 3w Cup: 15,59 ± 1,37 %, 5w Cup: 33,28 ± 6,09 %; Abbildung 16).

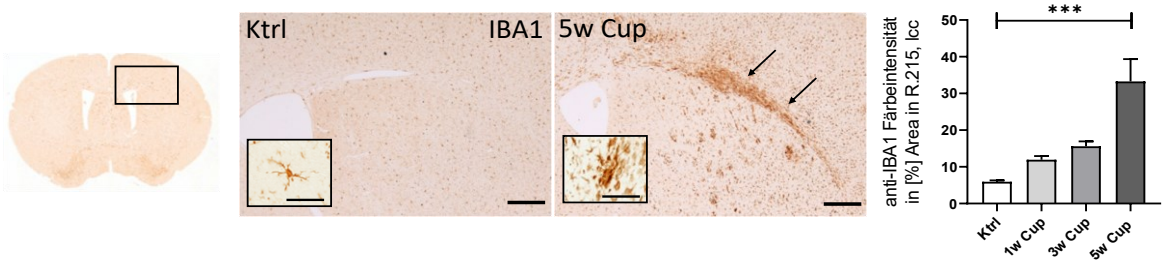


Abbildung 16: Reaktive Mikrogliose im *Corpus callosum* Cuprizone-intoxikierter Tiere

Anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (anti-IBA1) markierte Hirnschnitte von Kontrolltieren (Ktrl) und fünf Wochen Cuprizon Tieren (5w Cup). In Kontrollhirnen stellen sich IBA1$^+$ Zellen hypotroph und mit ramifizierten Zellfortsätzen dar (Ausschnittsvergrößerung Ktrl). In 5w Cup Hirnschnitten findet sich eine Dichtezunahme von IBA$^+$ Zellen vor allem im lateralen *Corpus callosum* (Pfeile). IBA1$^+$ Zellen haben einen amöboiden, hypertrophen Phänotyp in Cuprizone-intoxikierten Tieren (Ausschnittsvergrößerung 5w Cup). Unterschiede zwischen Kontrollen und Cuprizone-Experimentgruppen wurden mit der Einweg-Varianzanalyse (engl. „one-way ANOVA“) gefolgt vom Dunnett‘s Test ermittelt. Alle Gruppen n=5. Maßstab: 200µm, Ausschnittsvergrößerung: 15µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

Akuter axonaler Schaden kann über die Darstellung von APP$^+$ Sphäroiden nachgewiesen werden. Bei akutem axonalen Schaden und dem dadurch gestörten axonalen Transport akkumuliert APP in Form von Sphäroiden innerhalb der geschädigten Axonen. Im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation ließ sich eine signifikante Zunahme der Dichte der APP$^+$ Sphäroide im lateralen *Corpus callosum* nachweisen (Ktrl: 0,00 ± 0,00 Sphäroide/mm², 1w Cup: 3,52 ± 1,46 Sphäroide/mm², 3w Cup: 22,71 ± 4,49 Sphäroide/mm², 5w Cup: 171,40 ± 39,44 Sphäroide/mm²; Abbildung 17).

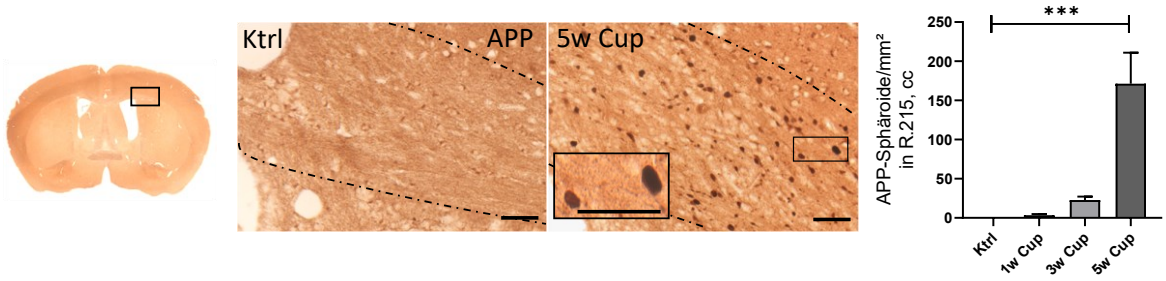


Abbildung 17: Akuter axonaler Schaden im *Corpus callosum* Cuprizone-intoxikierter Tiere

Hirnschnitte von Kontrolltieren (Ktrl) und fünf Wochen Cuprizone-intoxikierten Tieren (5w Cup). Die gestrichelte Linie markiert das laterale *Corpus callosum*. In Kontrollschnitten waren keine Amyloid Precursor Protein$^+$ (APP$^+$) Sphäroide nachweisbar. In 5w Cup Hirnschnitten fanden sich spezifisch markierte APP$^+$ Sphäroide in hoher Dichte. In der Ausschnittsvergrößerung sind repräsentative APP$^+$ Sphäroide dargestellt. Unterschiede zwischen Kontrollen und Cuprizone-Experimentgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. Alle Gruppen n=5. Maßstab: 60µm, Ausschnittsvergrößerung: 30µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

3.2 Rekrutierung peripherer Immunzellen im Cuprizone-Modell

Die übergeordnete Arbeitshypothese dieser Studie lautet, dass es im Rahmen von primär zytodegenerativen Prozessen im ZNS zu einer Rekrutierung peripherer Immunzellen kommt. Hirnschnitte von Kontrolltieren und Cuprizone-intoxikierten Tieren wurden immunhistochemisch mit dem pan-B-Zell Marker B220 (CD45R) und dem pan-T-Zell Marker CD3 markiert. Über den gesamten Verlauf der Cuprizone-Intoxikation hinweg konnte keine signifikante Zunahme von B220-exprimierenden B-Zellen im *Corpus callosum* nachgewiesen werden (Ktrl: 0,18 ± 0,18 Zellen/mm², 1w Cup: 0,43 ± 0,43 Zellen/mm², 3w Cup: 0,00 ± 0,00 Zellen/mm², 5w Cup: 0,18 ± 0,18 Zellen/mm²; Abbildung 18 A, B). In Milzen von Kontrolltieren, welche als Positivkontrolle während der immunhistochemischen Markierung mitgeführt wurden, konnte jedoch mit dem gleichen Antikörper eine hohe Anzahl B220 (CD45R) exprimierender, membranös markierter Zellen dargestellt werden (Abbildung 18 C).

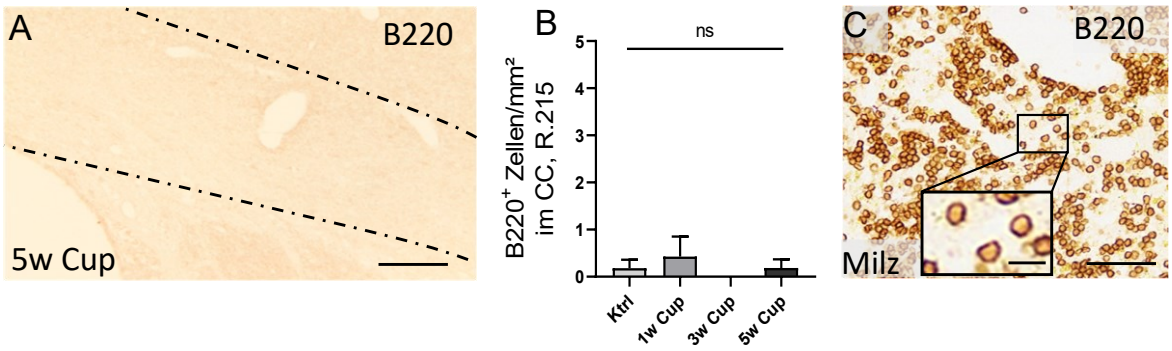


Abbildung 18: Immunhistochemische Markierung mit anti-B220 (CD45R)

(**A**) Hirnschnitt eines anti-B220 (CD45R) immunhistochemisch markierten, fünf Wochen Cuprizone (5w Cup) intoxikierten Tieres. Die gestrichelte Linie markiert das laterale *Corpus callosum*. (**B**) Unterschiede zwischen Kontrollen und Cuprizone-Experimentgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. (**C**) Immunhistochemische Markierung von B220 (CD45R) in einem Milzschnitt (Positivkontrolle) eines Kontrolltieres. Alle Gruppen n=5. Maßstab (**A**): 60µm, (**C**): 50µm, Ausschnittsvergrößerung: 10µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

T-Zellen, unabhängig des Subtyps oder Aktivierungszustandes, exprimieren CD3 als Teil des T-Zell-Rezeptors. T-Helferzellen exprimieren zusätzlich CD4 und zytotoxische T-Zellen exprimieren neben CD3 außerdem CD8 auf der Zelloberfläche.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass T-Zellen im Rahmen der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung ins ZNS rekrutiert werden, wurden zunächst Hirnschnitte von Kontrolltieren und Cuprizone-intoxikierten Mäusen aus Region 215 immunhistochemisch anti-CD3, anti-CD4 und anti-CD8 markiert (Abbildung 19).

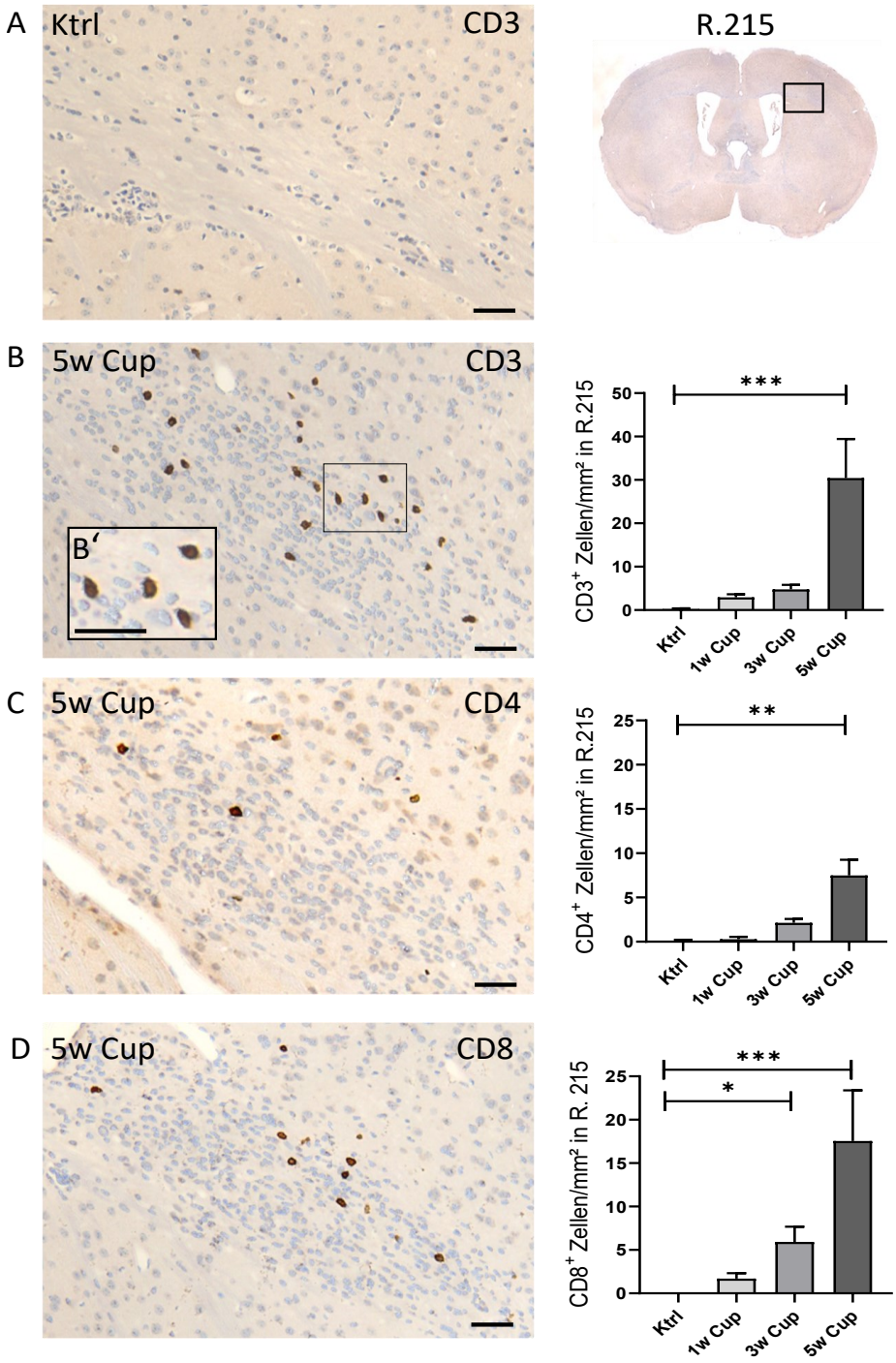


Abbildung 19: Rekrutierung peripherer Immunzellen nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung in Region 215

(**A**) Anti-CD3 markierter Hirnschnitt eines Kontrolltieres. Dargestellt ist das laterale *Corpus callosum* aus Hirnregion 215. Keine spezifisch markierten $CD3^+$ Zellen sind erkennbar. (**B**) Anti-CD3 markierter Hirnschnitt eines fünf Wochen Cuprizone-intoxikierten Tieres (5w Cup). Zahlreiche $CD3^+$ Zellen sind membranös markiert (**B'**). Im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation lässt sich ein signifikanter Anstieg der Zelldichten von $CD3^+$ (**B**), $CD4^+$ (**C**) und $CD8^+$ Zellen (**D**) erkennen. Unterschiede zwischen Kontrollen und Cuprizone-Experimentgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. Alle Gruppen n=5. Maßstab (**A-D**): 30µm, (**B'**): 25µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

Die Dichte von $CD3^+$ Zellen nahm graduell mit dem Verlauf der Cuprizone-Intoxikation im *Corpus callosum* zu (Ktrl: 0,25 ± 0,15 Zellen/mm², 1w Cup: 2,96 ± 0,67 Zellen/mm², 3w Cup: 4,76 ± 1,07 Zellen/mm², 5w Cup: 30,43 ± 9,01 Zellen/mm²; Abbildung 19 A, B).
Ein Anstieg der Zelldichten fand sich auch für die $CD4^+$ T-Helferzellen (Ktrl: 0,11 ± 0,11 Zellen/mm², 1w Cup: 0,27 ± 0,27 Zellen/mm², 3w Cup: 2,13 ± 0,44 Zellen/mm², 5w Cup: 7,50 ± 1,77 Zellen/mm²; Abbildung 19 C) und die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (Ktrl: 0,00 ± 0,00 Zellen/mm², 1w Cup: 1,70 ± 0,63 Zellen/mm², 3w Cup: 5,93 ± 1,74 Zellen/mm², 5w Cup: 17,56 ± 5,83 Zellen/mm²; Abbildung 19 D) im *Corpus callosum* der Cuprizone-intoxikierten Tiere. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden Schnitte einer weiteren Hirnregion (Region 265) immunhistochemisch anti-CD3, anti-CD4 und anti-CD8 markiert (Abbildung 20). In Region 265 stellte sich im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation ebenfalls eine Rekrutierung von T-Zellen dar, die vergleichbar mit den ermittelten Zelldichten in Region 215 war (vgl. Abbildung 19). Im gesamten *Corpus callosum* nahm die Dichte von T-Zellen über den Verlauf der Cuprizone-Intoxikation signifikant zu ($CD3^+$ Zellen: Ktrl: 0,11 ± 0,11 Zellen/mm², 1w Cup: 3,00 ± 0,82 Zellen/mm², 3w Cup: 5,45 ± 1,62 Zellen/mm², 5w Cup: 23,04 ± 8,40 Zellen/mm²; $CD4^+$ Zellen: Ktrl: 0,10 ± 0,10 Zellen/mm², 1w Cup: 0,96 ± 0,38 Zellen/mm², 3w Cup: 1,18 ± 0,70 Zellen/mm², 5w Cup: 4,40 ± 0,71 Zellen/mm²; $CD8^+$ Zellen: Ktrl: 0,00 ± 0,00 Zellen/mm², 1w Cup: 1,81 ± 0,58 Zellen/mm², 3w Cup: 2,67 ± 0,78 Zellen/mm², 5w Cup: 12,78 ± 3,04 Zellen/mm²). Um zu verifizieren, dass die beobachtete T-Zell-Rekrutierung nicht auf die Laborumgebung beziehungsweise die Bedingungen des Tierexperiments zurückzuführen ist, wurden die Ergebnisse an dem Material von zwei separaten Experimentalgruppen verifiziert (vgl. Kapitel 2.1). Übereinstimmend mit den Vorergebnissen war die Dichte von T-Zellen in fünf Wochen Cuprizone-intoxikierten Tieren signifikant höher als in Kontrollgruppen:

- Experimentalgruppe „Hannover“: 0,52 ± 0,35 $CD3^+$ Zellen/mm² in Kontrolltieren, 27,20 ± 5,10 $CD3^+$ Zellen/mm² nach fünf Wochen Cuprizone,

- Experimentalgruppe „Rostock“: 0,08 ± 0,08 $CD3^+$ Zellen/mm² in Kontrolltieren, 17,46 ± 4,17 $CD3^+$ Zellen/mm² nach fünf Wochen Cuprizone.

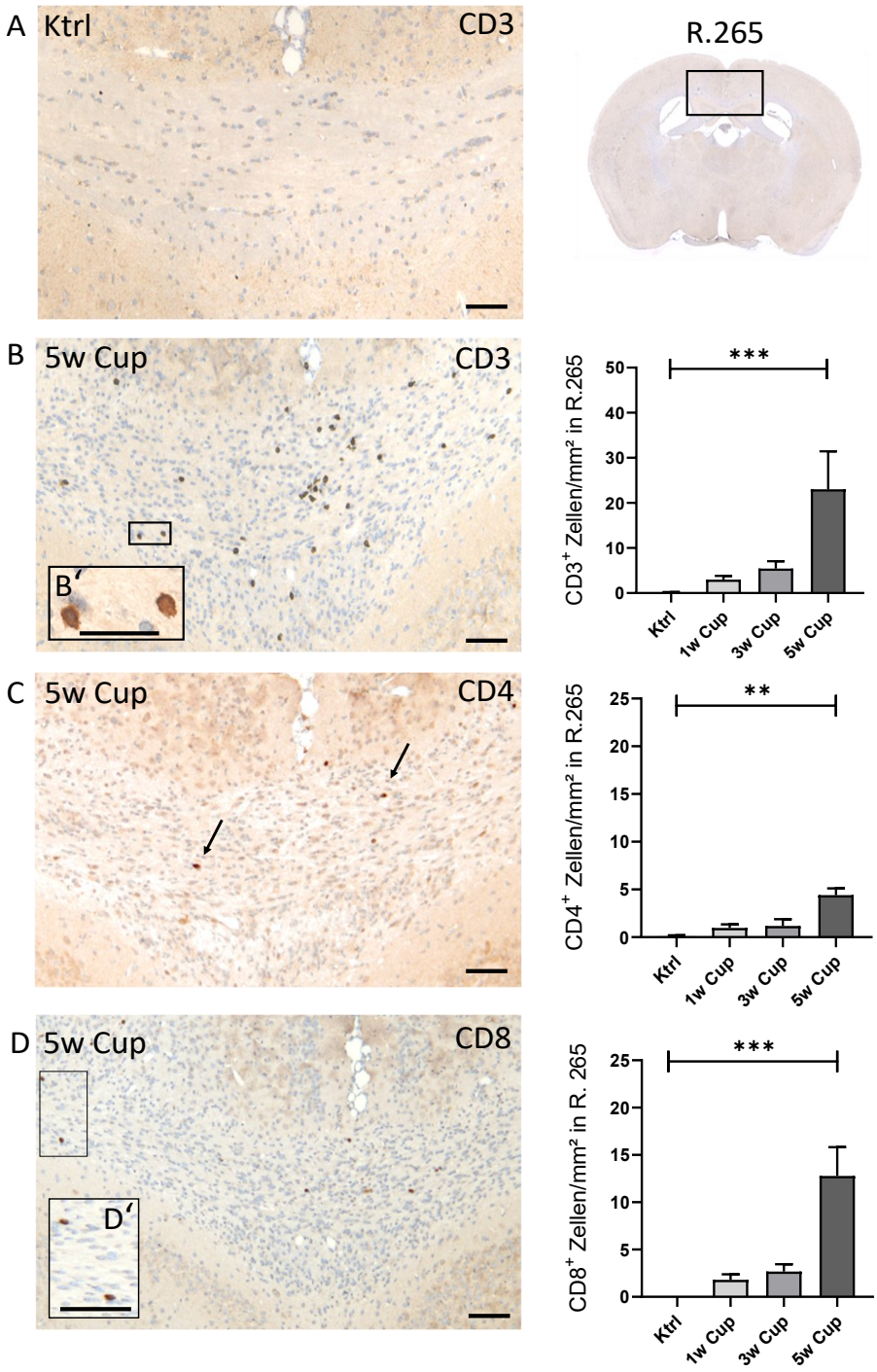


Abbildung 20: Rekrutierung peripherer Immunzellen nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung in Region 265.

Analog zu Region 215 wurden Hirnschnitte aus Region 265 immunhistochemisch anti-CD3, -CD4 und -CD8 markiert. (**A**) Dargestellt ist das mediale *Corpus callosum* eines Kontrollhirns (Ktrl). Im gesamten *Corpus callosum* kam es zu einer signifikanten Zunahme der Dichte $CD3^+$ (**B**), $CD4^+$ (**C**) und $CD8^+$ (**D**) Zellen. (**B'**, **D'**) Das membranöse Markierungsmuster ist in den Ausschnittsvergrößerungen hervorgehoben. Unterschiede zwischen Kontrollen und Cuprizone-Experimentgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. Alle Gruppen n=5. Maßstab (**A**-**D**): 50µm, (**B'**): 25µm, (**D'**): 40µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

Wie in Kapitel 1.4.2 der Einleitung beschrieben, kommt es nach Beendigung der fünfwöchigen Cuprizone-Intoxikation zu einer spontanen Remyelinisierung. Um zu überprüfen, ob die T-Zell-Infiltrate im Verlauf der Remyelinisierung persistieren, wurde die Dichte von T-Zellen nach einer Remyelinisierungsphase von zwei Wochen (5w Cup + 2w Remy) untersucht. Die endogene Remyelinisierung zeigte sich durch den Anstieg der PLP-Färbeintensität (5w Cup + 2w Remy; Abbildung 21). Wie bereits beschrieben, waren die Zelldichten von T-Zellen nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation erhöht (5w Cup: 33,27 ± 10,31 $CD3^+$ Zellen/mm²) und auch zwei Wochen nach Beendigung der Cuprizone-Intoxikation fanden sich signifikant erhöhte T-Zell-Dichten im *Corpus callosum* verglichen mit Kontrolltieren (5w Cup + 2w Remy: 22,91 ± 2,99 $CD3^+$ Zellen/mm²; Abbildung 21).

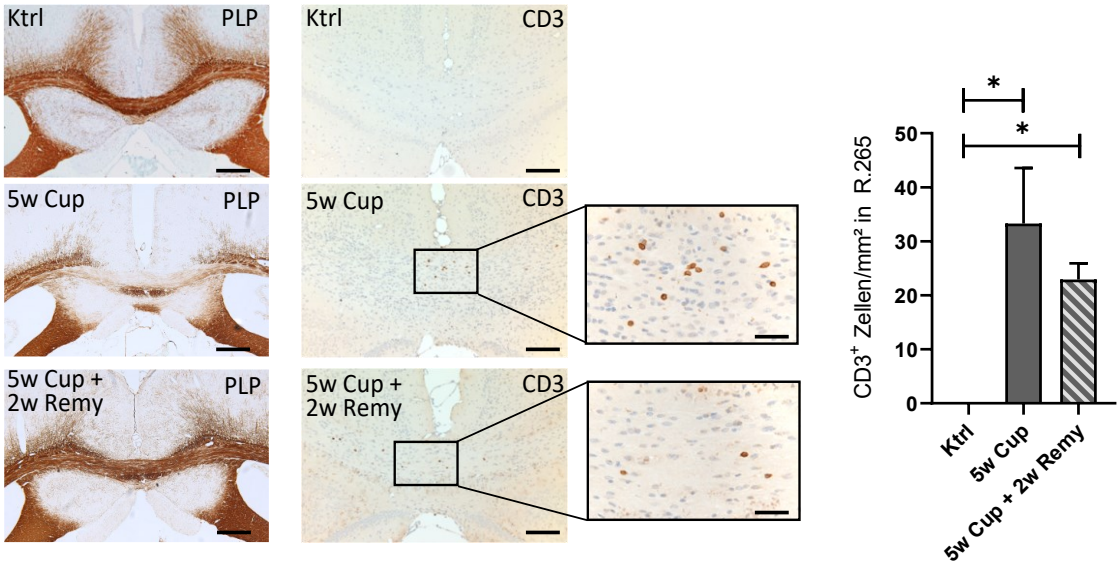


Abbildung 21: T-Zell-Dichten im Verlauf der endogenen Remyelinisierung

In der linken Bildreihe sind anti-Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) markierte Hirnschnitte von Kontrolltieren (Ktrl), fünf Wochen Cuprizone (5w Cup) intoxikierten Tieren und 5w Cup Tieren mit zusätzlicher, zweiwöchiger Remyelinisierungsphase (5w Cup + 2w Remy) dargestellt. Im *Corpus callosum* fanden sich sowohl in 5w Cup als auch in 5w Cup + 2w Remy membranös markierte $CD3^+$ Zellen (Ausschnittsvergrößerungen, mittlere Bildreihe). T-Zell-Dichten waren in 5w Cup und 5w Cup + 2w Remy signifikant gegenüber Ktrl erhöht. Unterschiede zwischen Kontrollen und Cuprizone-Experimentgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. Ktrl n=5, 5w Cup n=5, 5w Cup + 2w Remy n=6. Maßstab: 60µm, Ausschnittsvergrößerung: 20µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

3.3 Zusammenhang zwischen Demyelinisierung und T-Zell-Rekrutierung

Die übergeordnete Arbeitshypothese ist, dass die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung die treibende Kraft der Immunzellrekrutierung darstellt. Zur Überprüfung der Hypothese wurde in einem ersten Schritt ein potenzieller Zusammenhang zwischen der Dichte von

rekrutierten T-Zellen und dem Schweregrad der lokalen Demyelinisierung untersucht. Die Dichte von Myelin (anti-PLP) und T-Zellen (anti-CD3) wurde hierzu in zwei unterschiedlichen Hirnregionen untersucht (vgl. Kapitel 2.10.1). In Region 215 war der Verlust von Myelin vor allem im lateralen *Corpus callosum* ausgeprägt (-44,78%, Pfeile; Abbildung 22 A), wohingegen in Region 265 der Verlust vor allem im medialen *Corpus callosum* ausgeprägt war (-80,41%, Pfeilköpfe; Abbildung 22 B). In der *Commissura anterior* (ac, Region 215) und den *Fimbriae hippocampi* (fi, Region 265) war kein signifikanter Verlust der anti-PLP Färbeintensität zu beobachten.

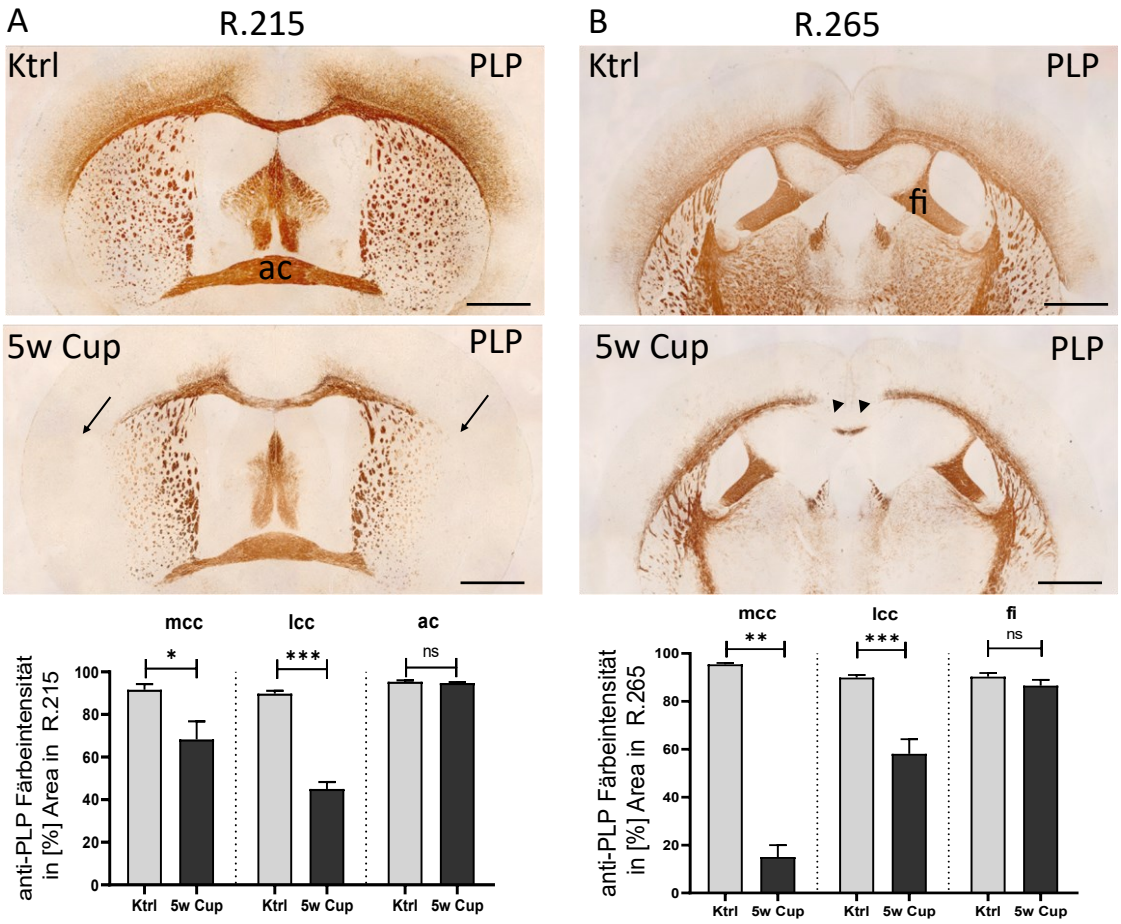


Abbildung 22: Selektive Demyelinisierung in unterschiedlichen Bereichen des *Corpus callosum*

(**A**) Repräsentativer anti-Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) markierter Hirnschnitt von einem Kontrolltier (Ktrl) und einem fünf Wochen Cuprizone (5w Cup)-intoxikierten Tier. Die Pfeile markieren den Verlust des Myelins im lateralen *Corpus callosum* (lcc). Im Bereich der *Commissura anterior* (ac) war kein signifikanter Verlust von Myelin im Vergleich zu Ktrl zu beobachten. Unterschiede in anti-PLP Färbeintensität zwischen Ktrl und 5w Cup wurden für das mediale *Corpus callosum* (mcc), lcc und ac mit dem ungepaarten t-Test ermittelt. (**B**) Anti-PLP markierte Hirnschnitte aus Region 265. Die Pfeilköpfe markieren im 5w Cup Hirnschnitt den Verlust des Myelins im mcc. Die anti-PLP Färbeintensität im Bereich der *Fimbriae hippocampi* (fi) war unverändert zu Kontrolltieren. Unterschiede zwischen Ktrl und 5w Cup wurden für das mcc mit dem Mann-Whitney-Test und für das lcc und die fi mit dem ungepaarten t-Test ermittelt. Alle Gruppen n=5. Maßstab (**A**, **B**): 200µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

Eine statistisch signifikante negative Korrelation fand sich bei der Analyse der beiden Variablen *Myelindichte* und *T-Zell-Dichte* hinsichtlich der Stärke ihrer Beziehung (Region 215: r = -0,79, p < 0,0001; Region 265: r = -0,72, p = 0,0003; Abbildung 23).

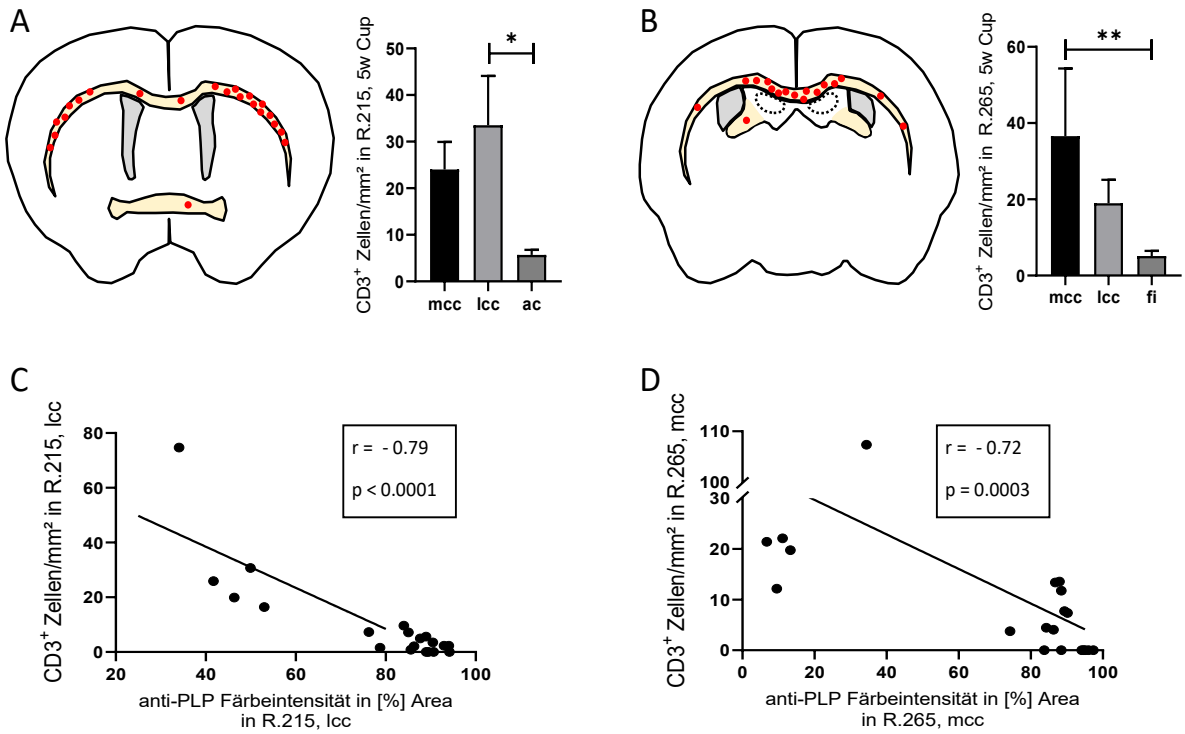


Abbildung 23: Korrelation von Myelin- und T-Zell-Dichte

(**A**) Schematische Darstellung, welche die räumliche Verteilung von CD3⁺ Zellen (rote Punkte) in Region 215 (R.215) und (**B**) Region 265 (R.265) zeigt. Unterschiede zwischen analysierten Hirnregionen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. (**C**, **D**) Die Korrelation zwischen den Parametern *Myelindichte* (Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) Färbeintensität, x-Achse, n=20) und *T-Zell-Dichte* (CD3⁺ Zell-Dichte, y-Achse, n=20) in R.215 und R.265 wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ermittelt. Alle Gruppen n=5. Abkürzungen: mcc: mediales *Corpus callosum*, lcc: laterales *Corpus callosum*, ac: *Commissura anterior*, fi: *Fimbria hippocampi*. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

3.4 Rekrutierung von Immunzellen nach chronischer Demyelinisierung

Für ein besseres Verständnis der Dynamik der T-Zell-Rekrutierung wurden zusätzlich Hirnschnitte von Tieren untersucht, die über einen verlängerten Zeitraum von 11 Wochen mit Cuprizone intoxikiert wurden (11w Cup). Dieser Zustand wird als chronische Demyelinisierung bezeichnet, da aus diesem keine beziehungsweise eine nur eingeschränkte endogene, spontane Remyelinisierung hervorgeht (vgl. Kapitel 1.4.2).
Nach 11w Cup fanden sich im *Corpus callosum* der intoxikierten Tiere ähnlich hohe Dichten von T-Zellen, wie nach fünf Wochen Cuprizone (11w Cup: 36,38 ± 8,39 $CD3^+$ Zellen/mm², 5w Cup: 30,43 ± 9,01 $CD3^+$ Zellen/mm²; Abbildung 24 A). Die Dichte von Mikrogliazellen und Makrophagen (anti-IBA1 Färbeintensität) nahm im Verlauf der chronischen Demyelinisierung ab (Woche 5: 29,46 ± 5,85 %, Woche 11: 14,41 ± 1,17 %; Abbildung 24 B), während die Dichte der reaktiven Astrozyten (anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) Färbeintensität) im *Corpus callosum* von fünf Wochen (5w Cup: 89,57 ± 1,09 %) und 11 Wochen Cuprizone-intoxikierten Mäusen (11w Cup: 94,10 ± 0,95 %) auf einem vergleichsweise hohen Niveau blieb (Abbildung 24 C).

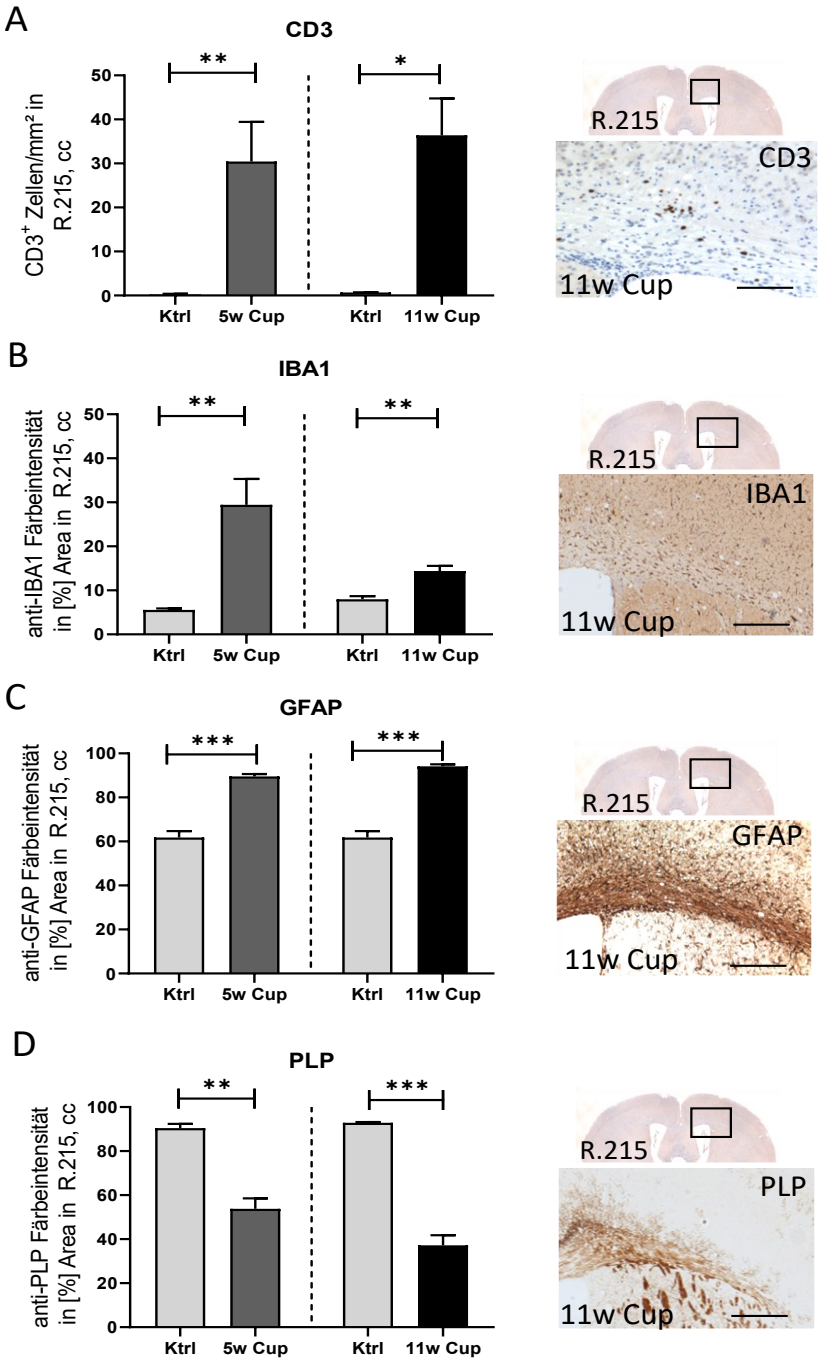


Abbildung 24: Dichte der T-Zellen nach chronischer Demyelinisierung

(**A**) Quantifizierung von anti-CD3, (**B**) anti ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1), (**C**) anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) und (**D**) anti-Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) markierten Hirnschnitten von 11 Wochen (11w Cup, Experimentalgruppe „Glasgow“) und fünf Wochen Cuprizone-intoxikierten Mäusen (5w Cup, Experimentalgruppe „München“). Repräsentative Aufnahmen zeigen das laterale *Corpus callosum* aus Region 215. Zu beachten ist die Verringerung der anti-IBA1 Färbeintensität in 11w Cup im Vergleich zu 5w Cup (**B**). Die Unterschiede zwischen Cuprizone-intoxikierten Mäusen und Kontrollgruppen wurden mit dem ungepaarten t-Test bestimmt. Experimentalgruppe „Glasgow”: 11w Cup n=4, Ktrl n=3; Experimentalgruppe „München”: 5w Cup n=5, Ktrl n=5. Maßstab (**A**): 50µm, (**B-D**): 80µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

3.5 Charakterisierung des Subtyps rekrutierter T-Zellen

Im Gegensatz zu den meisten EAE-Modellen (vgl. Kapitel 1.4.1), in denen die inflammatorischen Infiltrate aus $CD4^+$ T_H1 und T_H17 Zellen bestehen [35, 89], setzen sich die T-Zell-Infiltrate in MS-Läsionen hauptsächlich aus $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen zusammen [30–32].

Um die in dieser Studie nachgewiesenen Infiltrate hinsichtlich ihrer Zusammensetzung weiter zu charakterisieren, wurden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen von anti-CD3 und anti-CD8 durchgeführt und das CD3-CD8 Verhältnis im demyelinisierten *Corpus callosum* in zwei Hirnregionen analysiert (Abbildung 25 A). Wie in Abbildung 25 B dargestellt, handelte es sich bei mehr als der Hälfte der nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation rekrutierten T-Zellen um zytotoxische CD8-exprimierende Lymphozyten (R.215: 56,65 ± 3,46 %; R.265: 52,93 ± 4,01 %). Um mögliche Veränderungen der T-Zell-Komposition während der Remyelinisierungsphase oder einer verlängerten Cuprizone-Intoxikation (chronische Demyelinisierung) zu untersuchen, wurden analoge Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen an Hirnschnitten von Tieren nach zweiwöchiger Remyelinisierungsphase (5w Cup + 2w Remy) und 11 Wochen Cuprizone-Intoxikation (11w Cup) durchgeführt. Es fanden sich vergleichbare CD3-CD8 Verhältnisse wie nach fünfwöchiger Cuprizone-Intoxikation (5w Cup + 2w Remy: 44,00 ± 3,68 %; 11w Cup: 52,86 ± 5,20 %; Abbildung 25 C).

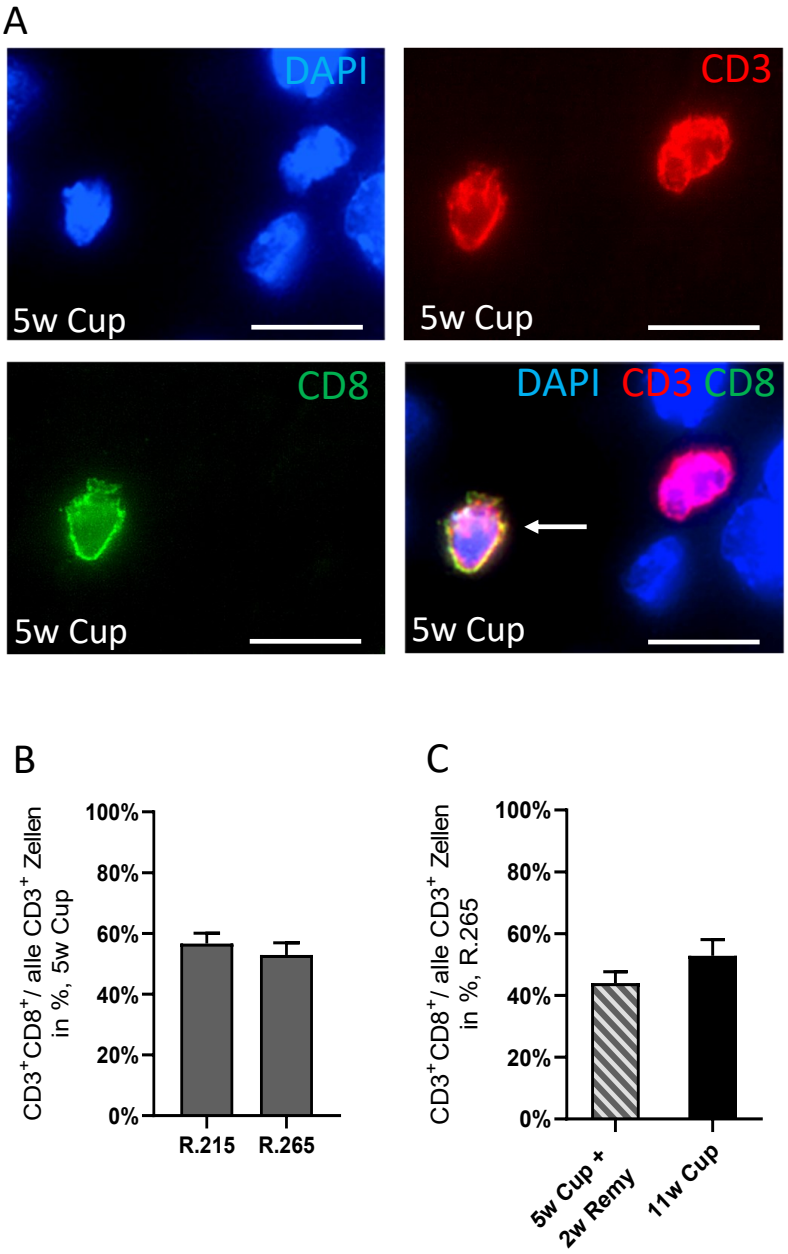


Abbildung 25: CD3-CD8 Verhältnis der rekrutierten T-Zellen im Cuprizone-Modell

(**A**) Repräsentative immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit anti-CD3 (rot) und anti-CD8 (grün), nukleär markiert mit 4′,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, blau). Zu beachten ist das kolokalisierte Signal von $CD3^+CD8^+$ Zellen (Pfeil). (**B**) Für Region 215 (R.215) und Region 265 (R.265) wurden jeweils fünf Tiere und mindestens 15 $CD3^+$ Zellen pro Hirnschnitt auf ein kolokalisiertes Signal überprüft. (**C**) Für die Gruppen „5w Cup + 2w Remy“ (Experimentalgruppe „Remyelinisierung“) und „11w Cup“ (Experimentalgruppe „Glasgow“) wurden mindestens 15 $CD3^+$ Zellen pro Hirnschnitt auf ein kolokalisiertes Signal überprüft. 5w Cup n=5, 5w Cup + 2w Remy n=6, 11w Cup n=4. Maßstab (**A**): 10µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

3.6 Phänotyp und Aktivierungszustand rekrutierter T-Zellen

In einem nächsten Schritt wurde der Phänotyp der rekrutierten T-Zellen weiter untersucht. Dazu wurden die rekrutierten T-Zellen zum einen auf die Expression von Proliferationsmarkern untersucht (KI-67 und PCNA), zum anderen wurde das Vorhandensein von Granzym B (GZMB) überprüft, einem akzeptierten Indikator für zytotoxische T-Zellaktivität [90, 91].

Wie in Abbildung 26 A dargestellt, exprimierten 21,12 ± 0,23 % der $CD3^+$ Zellen in Region 215 und 24,28 ± 2,52 % der $CD3^+$ Zellen in Region 265 KI-67. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung exprimierten 30,62 ± 4,19 % der $CD3^+$ Zellen in Region 215 und 23,68 ± 1,27 % der $CD3^+$ Zellen in Region 265 PCNA (Abbildung 26 B).

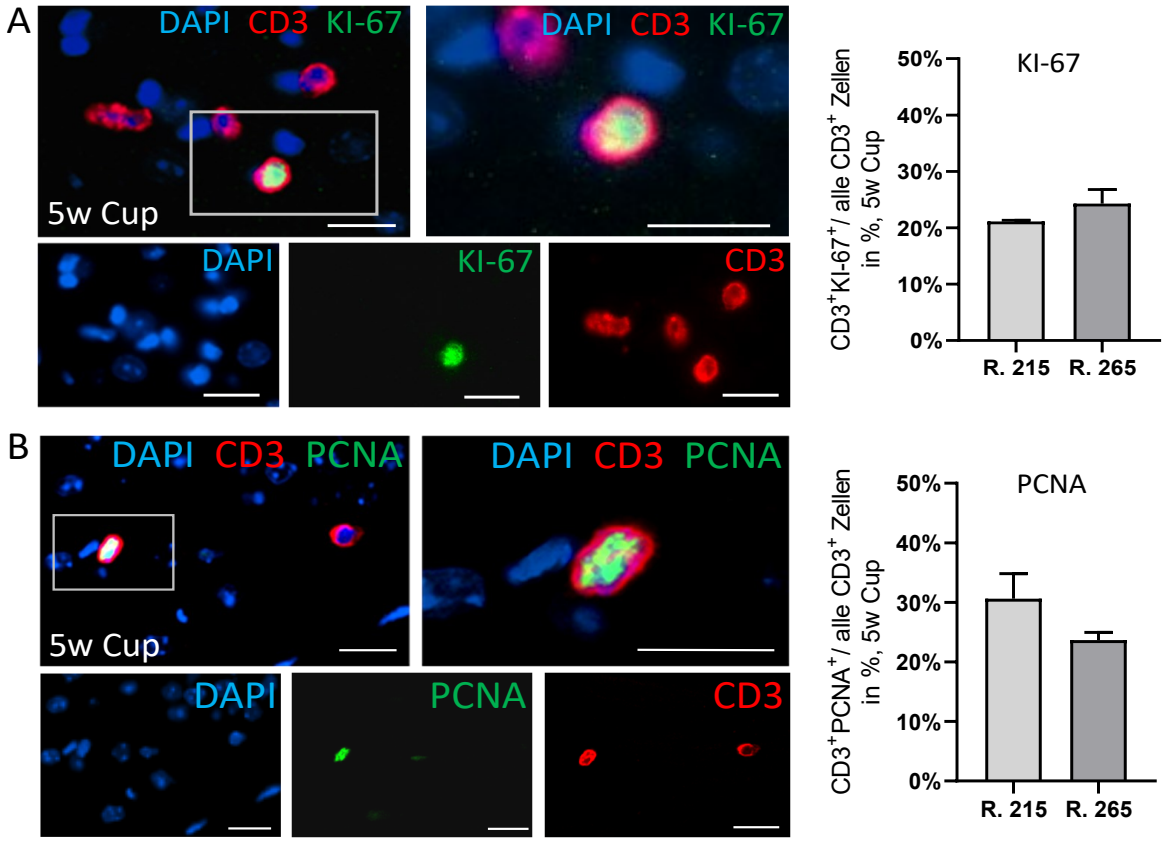


Abbildung 26: Rekrutierte T-Zellen exprimieren Proliferationsmarker

(**A**) Repräsentative Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit anti-CD3 (rot) und anti-KI-67 (grün) oder anti-Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA, grün, **B**), nukleär markiert mit 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blau). Zu beachten ist das kolokalisierte Signal von $CD3^+KI\text{-}67^+$ (Ausschnittsvergrößerung **A**) oder $CD3^+PCNA^+$ Zellen (Ausschnittsvergrößerung **B**). Für Region 215 (R.215) und Region 265 (R.265) wurden jeweils fünf Tiere und mindestens 15 $CD3^+$ Zellen pro Hirnschnitt auf ein kolokalisiertes Signal überprüft. 5w Cup n=5. Maßstab (**A**, **B**): 10µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

GZMB ist eine Serinprotease, die vor allem von zytotoxischen Effektor-T-Zellen gebildet und in Vesikeln im Zytoplasma gespeichert wird. GZMB induziert in der Zielzelle Caspase 3 abhängige Signalkaskaden, die zur Apoptose der Zelle führen [92]. Die Dichte von GZMB-exprimierenden Zellen nahm im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation kontinuierlich zu (Abbildung 27). Die höchste Dichte an GZMB$^+$ Zellen wurde nach fünfwöchiger Cuprizone-Intoxikation in beiden untersuchten Hirnregionen nachgewiesen:

- Region 215: Ktrl: 0,00 ± 0,00 Zellen/mm², 1w Cup: 0,77 ± 0,46 Zellen/mm², 3w Cup: 1,50 ± 0,52 Zellen/mm², 5w Cup: 9,16 ± 2,37 Zellen/mm²,
- Region 265: Ktrl: 0,00 ± 0,00 Zellen/mm², 1w Cup: 1,38 ± 0,74 Zellen/mm², 3w Cup: 2,53 ± 0,74 Zellen/mm², 5w Cup: 9,35 ± 1,62 Zellen/mm².

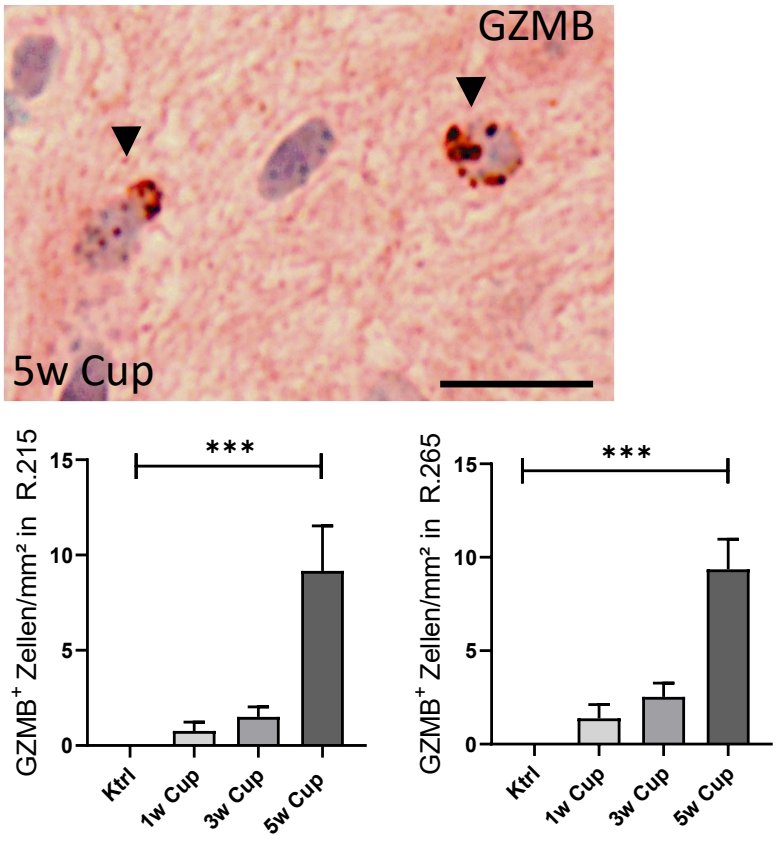


Abbildung 27: Zunahme der Dichte Granzym B$^+$ Zellen im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation

Repräsentativer, anti-Granzym B (GZMB) markierter Hirnschnitt eines fünf Wochen Cuprizone (5w Cup)-intoxikierten Tieres. Im *Corpus callosum* von 5w Cup Tieren fanden sich zytoplasmatisch-granulär markierte Zellen (Pfeilköpfe). Die Unterschiede zwischen Kontrollgruppen und Cuprizone-Experimentgruppen in Region 215 und Region 265 wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. Alle Gruppen n=5, Maßstab (**A**): 10µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

Nach fünfwöchiger Cuprizone-Intoxikation waren in Hirnregion 215 37,94 ± 2,59 % und in Hirnregion 265 39,80 ± 3,82 % der $CD3^+$ Zellen zusätzlich $GZMB^+$ (Abbildung 28 A, B). Der Transport zytotoxischer $GZMB^+$ Vesikel zu einem Zellpol (sogenannte Polarisierung) und die anschließende Degranulation sind wichtige Schritte der Lymphozyten-vermittelten Zytotoxizität [93, 94]. Um den ersten Punkt zu adressieren, wurden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen mit anti-CD3 und anti-GZMB durchgeführt und die $CD3^+GZMB^+$ Zellen hinsichtlich der Vesikelpolarisierung untersucht (vgl. Kapitel 2.10.5). Wie in Abbildung 28 C dargestellt, war die Expression der Granzym B^+ Vesikel in der Mehrzahl der $CD3^+GZMB^+$ Zellen nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt, sondern stark zu einem Zellpol polarisiert (R.215: 50,21 ± 7,07 %, R.265: 73,00 ± 9,95 %).

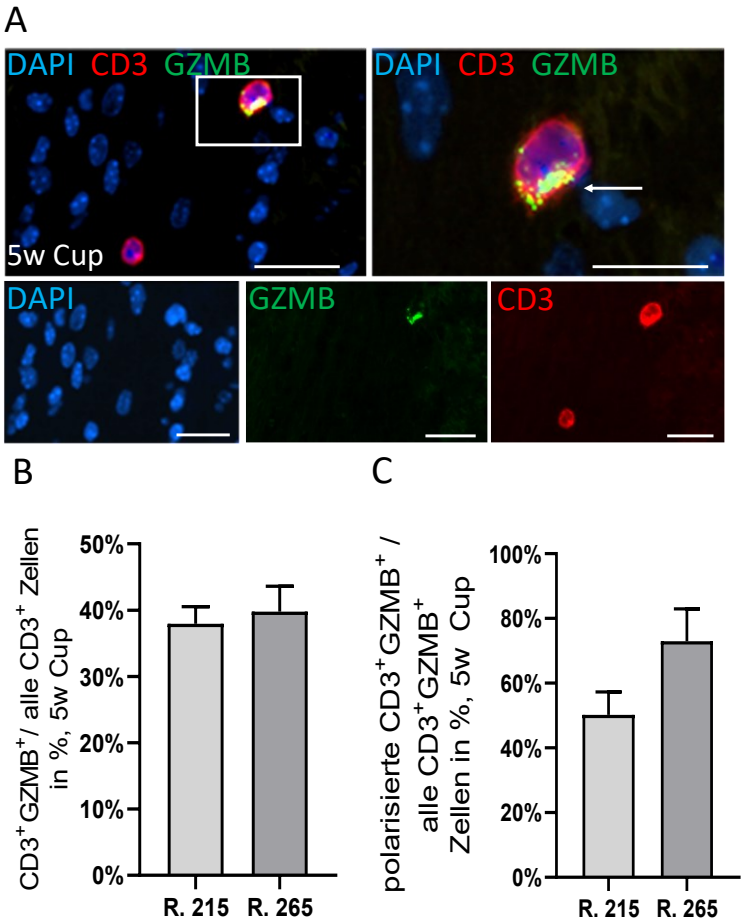


Abbildung 28: Granzym B Expression und Vesikelpolarisierung in rekrutierten T-Zellen

(**A**) Repräsentative Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit anti-CD3 (rot) und anti-Granzym B (GZMB, grün), nukleär markiert mit 4′,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, blau). Zu beachten ist das membranöse Signal von CD3 und das zytoplasmatisch-granuläre Signal von GZMB (Pfeil). (**B**) Für Region 215 und Region 265 wurden jeweils fünf Tiere und mindestens 15 $CD3^+$ Zellen pro Hirnschnitt auf ein kolokalisiertes Signal überprüft. (**C**) Auswertung der räumlichen Verteilung von $GZMB^+$ Vesikeln innerhalb der $CD3^+GZMB^+$ Zellen. Die Ergebnisse sind angegeben als Verhältnis von polarisierten $CD3^+GZMB^+$ zu allen $CD3^+GZMB^+$ Zellen in %. Alle Gruppen n=5. Maßstab (**A**): 10µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

3.7 Zusammenhang von Mikrogliose, axonalem Schaden und T-Zell-Rekrutierung

In histopathologischen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen Inflammation und Neurodegeneration in Hirnen von progressiven MS-Patienten festgestellt [78]. Um diesen Punkt in der vorgelegten Arbeit zu untersuchen, wurden konsekutive Hirnschnitte Cuprizone-intoxikierter Mäuse immunhistochemisch anti-CD3, anti-IBA1 oder anti-APP markiert und die Zelldichten beziehungsweise Färbeintensitäten korreliert. Wie in Abbildung 29 A und B dargestellt, fand sich in beiden untersuchten Hirnregionen eine starke positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Mikrogliose (anti-IBA1 Färbeintensität) sowie dem akuten axonalen Schaden (Dichte der APP^+ Sphäroide) mit der Dichte von rekrutierten $CD3^+$ Zellen (T-Zellen und APP^+ Sphäroide in R.215: $p < 0{,}0001$, $r = 0{,}84$, siehe Abbildung 29 A; T-Zellen und Monozyten/Mikroglia in R.215: $p < 0{,}0001$, $r = 0{,}87$, siehe Abbildung 29 B). Bei der Untersuchung der gleichen Variablen in einer Referenzregion ohne signifikante Demyelinisierung nach fünfwöchiger Cuprizone-Intoxikation (*Commissura anterior*, ac, Region 215) fand sich eine geringere Korrelation im Vergleich zum demyelinisierten *Corpus callosum* (T-Zellen und APP^+ Sphäroide in R.215: $p = 0{,}001$, $r = 0{,}68$, siehe Abbildung 29 C; T-Zellen und Monozyten/Mikroglia in R.215: $p = 0{,}0002$, $r = 0{,}73$, siehe Abbildung 29 D).

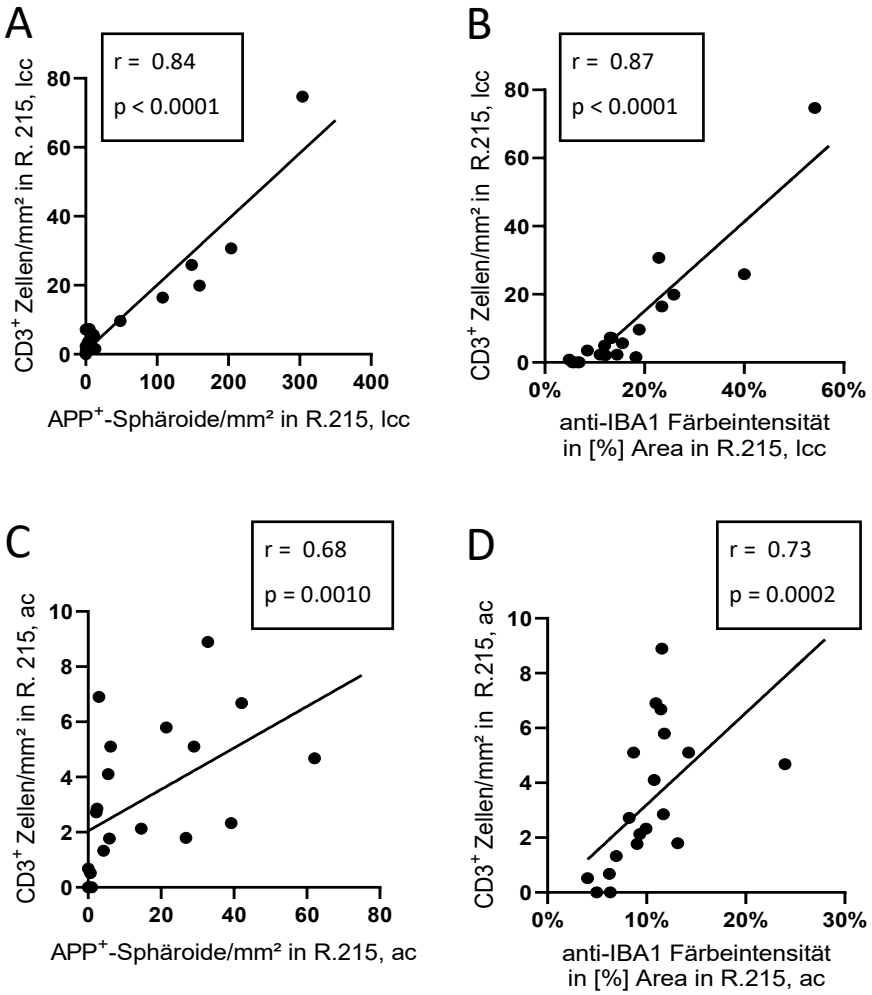


Abbildung 29: Korrelation von Mikrogliose, axonalem Schaden und T-Zell-Dichte

(**A**) Die Korrelation zwischen den Parametern akuter axonaler Schaden (anti-Amyloid Precursor Protein$^+$ (APP^+) Sphäroid-Dichte, n=20, x-Achse) und der Dichte von $CD3^+$ Zellen (n=20, y-Achse) im lateralen *Corpus callosum* (lcc) und der Referenzregion *Commissura anterior* (ac, **C**) in Region 215 wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ermittelt. (**B**) Die Korrelation zwischen den Parametern Mikroglia/Makrophagen Reaktivität (anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) Färbeintensität, n=20, x-Achse) und der Dichte $CD3^+$ Zellen (n=20, y-Achse) im lcc und der Referenzregion ac (**D**) in Region 215 wurden ebenfalls mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ermittelt. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

3.8 Therapeutische Reduktion der Cuprizone-induzierten Pathologie

In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Mäusen, die mit Laquinimod behandelt wurden, die Cuprizone-induzierte Pathologie deutlich reduziert wird [95]. Um zu überprüfen, ob eine therapeutische Reduktion der Cuprizone-induzierten demyelinisierenden Prozesse in einer abgeschwächten Immunzell-Rekrutierung resultiert, wurden Hirnschnitte aus der oben genannten Studie immunhistochemisch anti-CD3 markiert. Wie in Abbildung 30 dargestellt, fanden sich hohe T-Zell-Dichten in Hirnschnitten

Cuprizone-intoxikierter Mäuse, die eine Vehikel-Lösung bekamen (Cup-Veh R.215: 19,91 ± 6,12 Zellen/mm²; R.265: 47,12 ± 8,53 Zellen/mm²). Mäuse, die über die Dauer der Cuprizone-Intoxikation mit Laquinimod behandelt wurden, zeigten signifikant geringere T-Zell-Dichten im *Corpus callosum* (Cup-Laq R.215: 0,41 ± 0,28 Zellen/mm²; R.265: 0,98 ± 0,43 Zellen/mm²).

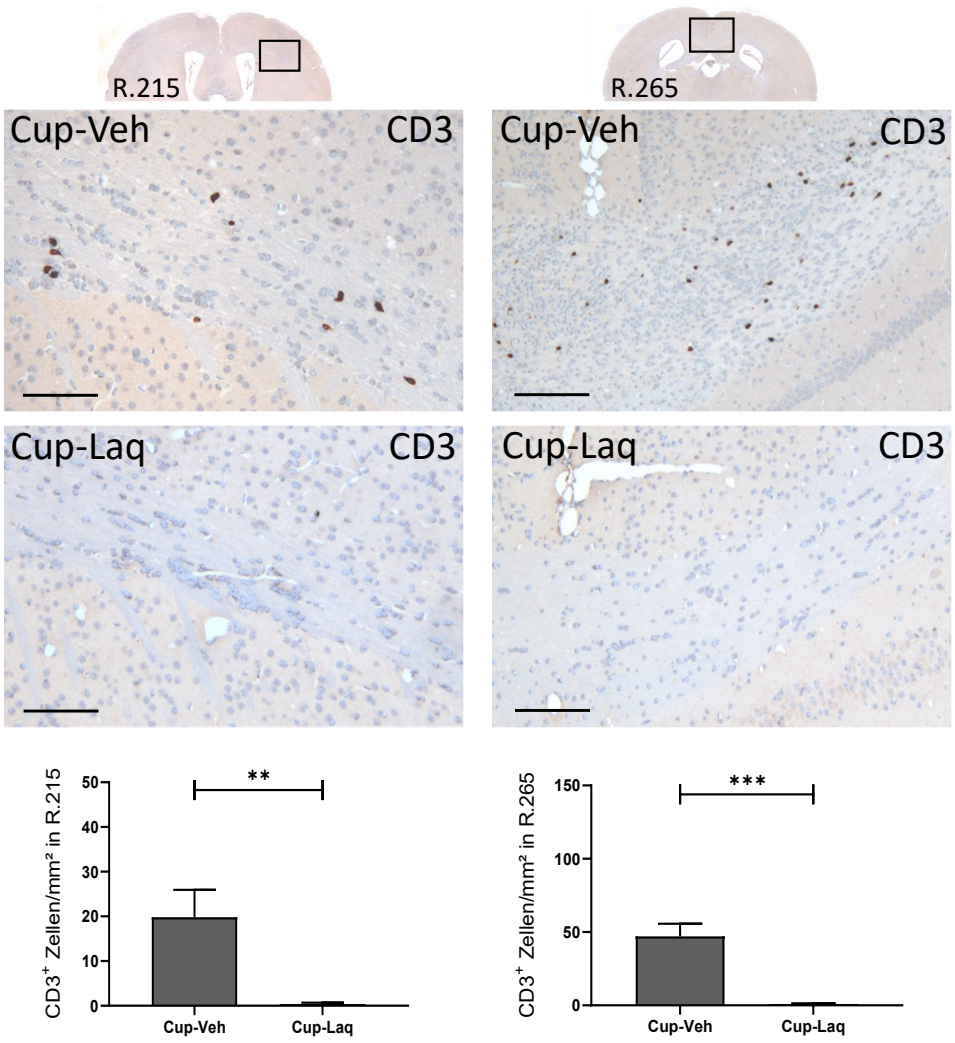


Abbildung 30: Laquinimod reduziert die Rekrutierung von T-Zellen im Cuprizone-Modell

Repräsentative, immunhistochemisch anti-CD3-markierte Hirnschnitte von Cuprizone-intoxikierten Mäusen die entweder mit einer Vehikel-Lösung (Cup-Veh) oder Laquinimod (Cup-Laq) behandelt wurden. Im oberen Bildabschnitt sind Übersichtsaufnahmen der Hirnregion 215 (R.215) und Hirnregion 265 (R.265) dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerungen stellen das laterale *Corpus callosum* (lcc, linke Bildreihe) aus R.215 und das mediale *Corpus callosum* (mcc, rechte Bildreihe) aus R.265 dar. Die Unterschiede zwischen Gruppe Cup-Veh und Gruppe Cup-Laq wurden für R.215 mit dem Mann-Whitney Test und für R.265 mit dem ungepaarten t-Test bestimmt. Alle Gruppen n=5. Maßstab linke Bildreihe: 80µm, rechte Bildreihe: 120µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

3.9 T-Zell-Infiltrate in *post mortem* MS-Gewebe

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob die Dichte, der vorherrschende Subtyp sowie der Aktivierungszustand nachgewiesener T-Zellen im Cuprizone-Modell mit den Befunden in humanpathogenem *post mortem* Hirngewebe von progressiven MS-Patienten vergleichbar ist. Um die Dichte der inflammatorischen Infiltrate zu untersuchen, wurden Hirnschnitte von sieben MS-Patienten (vgl. Tabelle 3) immunhistochemisch anti-CD3, anti-CD4 und anti-CD8 markiert. Eine repräsentative chronisch-aktive Läsion ist in Abbildung 31 A dargestellt. Die Intensität der anti-PLP Markierung ist im Zentrum der Läsion stark reduziert (die rot-gestrichelte Linie markiert das Zentrum der Läsion). Im aktiven Rand der Läsion ist eine hohe Dichte MHC-II/LN3-exprimierender Zellen auszumachen.
Die höchste Dichte $CD3^+$ T-Zellen fand sich im aktiven Rand der Läsionen (perivaskulär: 7,94 ± 1,33 Zellen/mm²; parenchymal: 13,41 ± 1,91 Zellen/mm²), gefolgt vom Zentrum (perivaskulär: 7,46 ± 2,74 Zellen/mm²; parenchymal: 7,81 ± 2,21 Zellen/mm²). Eine deutlich geringere Anzahl von T-Zellen fand sich in der normal-erscheinenden weißen Substanz (NAWM, engl. „normal-appearing white matter“, perivaskulär: 1,15 ± 0,36 Zellen/mm²; parenchymal: 3,17 ± 0,87 Zellen/mm²).
Ein ähnliches Verhältnis zeigte sich für $CD4^+$ Zellen:

- perivaskulär: Zentrum: 3,08 ± 1,13 Zellen/mm², Rand: 2,89 ± 0,63 Zellen/mm², NAWM: 0,61 ± 0,25 Zellen/mm²,
- parenchymal: Zentrum: 1,53 ± 0,30 Zellen/mm², Rand: 3,01 ± 0,77 Zellen/mm², NAWM: 0,89 ± 0,23 Zellen/mm²

und für $CD8^+$ Zellen:

- perivaskulär: Zentrum: 4,71 ± 1,49 Zellen/mm², Rand: 6,04 ± 0,91 Zellen/mm², NAWM: 0,91 ± 0,38 Zellen/mm²,
- parenchymal: Zentrum: 5,25 ± 1,27 Zellen/mm², Rand: 8,66 ± 1,47 Zellen/mm², NAWM: 1,68 ± 0,64 Zellen/mm², siehe Abbildung 31 B.

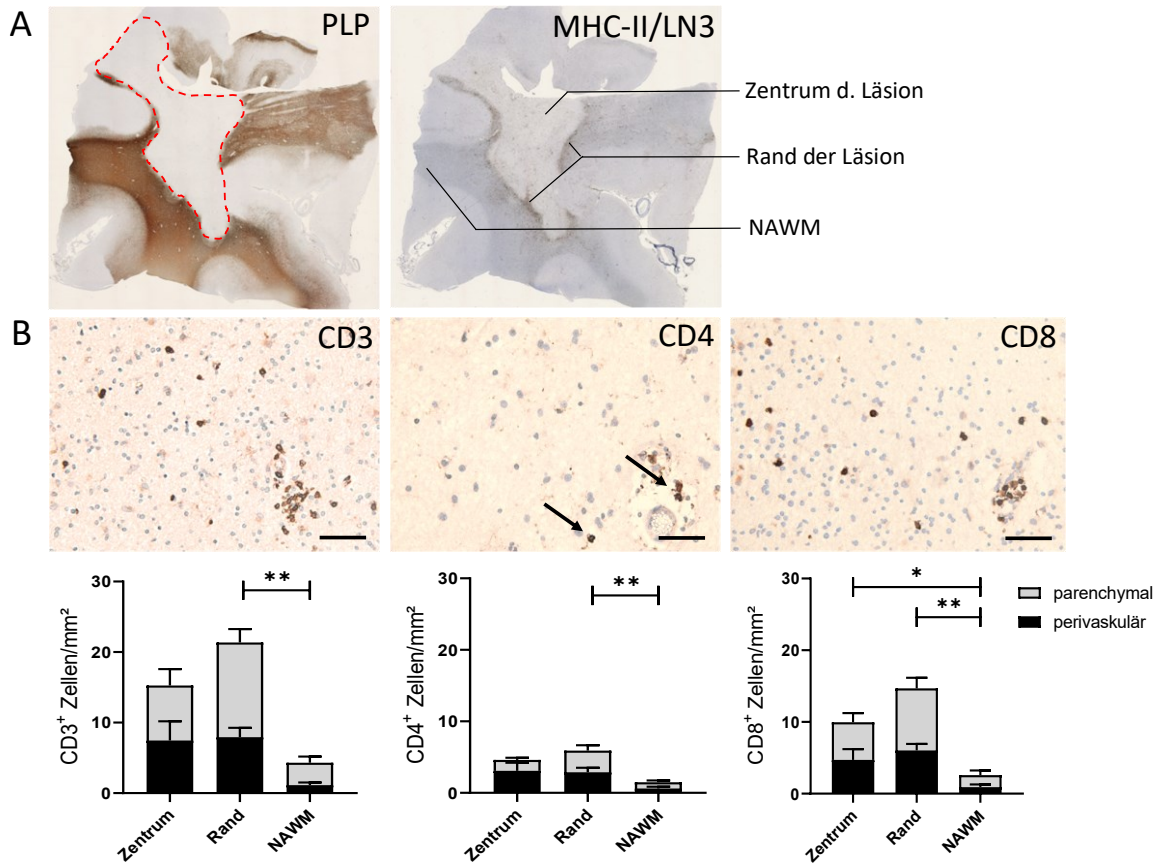


Abbildung 31: Dichte von T-Zellen in chronisch-aktiven MS-Läsionen

(**A**) Übersicht einer repräsentativen chronisch-aktiven MS-Läsion. Die rot-gestrichelte Linie markiert das Zentrum der Läsion in einem anti-Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) markierten Hirnschnitt. Ein konsekutiver, anti-Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC-II)/LN3 markierter Hirnschnitt stellt den aktiven Rand der Läsion dar. Die normal-erscheinende weiße Substanz (NAWM, engl. „normal-appearing white matter“) ist als weiße Substanz definiert, welche im Vergleich zu Kontrollen keine Veränderung in der anti-PLP Färbeintensität zeigt und darüber hinaus auf dem Hirnschnitt am weitesten von der Läsion entfernt ist. (**B**) Repräsentative immunhistochemisch anti-CD3, anti-CD4 (Pfeile) und anti-CD8 markierte konsekutive Hirnschnitte. Unterschiede zwischen den analysierten Hirnregionen wurden mit der Einweg-Varianzanalyse (engl. „one-way ANOVA“) gefolgt vom Tukey‘s Test für anti-CD3 und anti-CD8 und mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn’s Test für anti-CD4 ermittelt. Alle Gruppen n=7. Maßstab (**B**): 80µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

Im Einklang mit vorherigen Studien [30, 31] zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen einen hohen Anteil $CD8^+$ zytotoxischer T-Zellen am Gesamtanteil der rekrutierten T-Zellen. Deutlich mehr als die Hälfte der $CD3^+$ Zellen exprimierten zusätzlich CD8 (Zentrum: 72,41 ± 3,27 %, Rand: 76,64 ± 3,21 %, NAWM: 68,89 ± 2,89 %; Abbildung 32 A). Der Anteil der $CD3^+$ Zellen, welche zusätzlich den Aktivitätsmarker GZMB exprimierten, war im aktiven Rand und im Zentrum der Läsion signifikant höher als in der NAWM (Zentrum: 67,14 ± 2,67 %, Rand: 75,22 ± 2,21 %, NAWM: 41,88 ± 3,36 %; Abbildung 32 B).

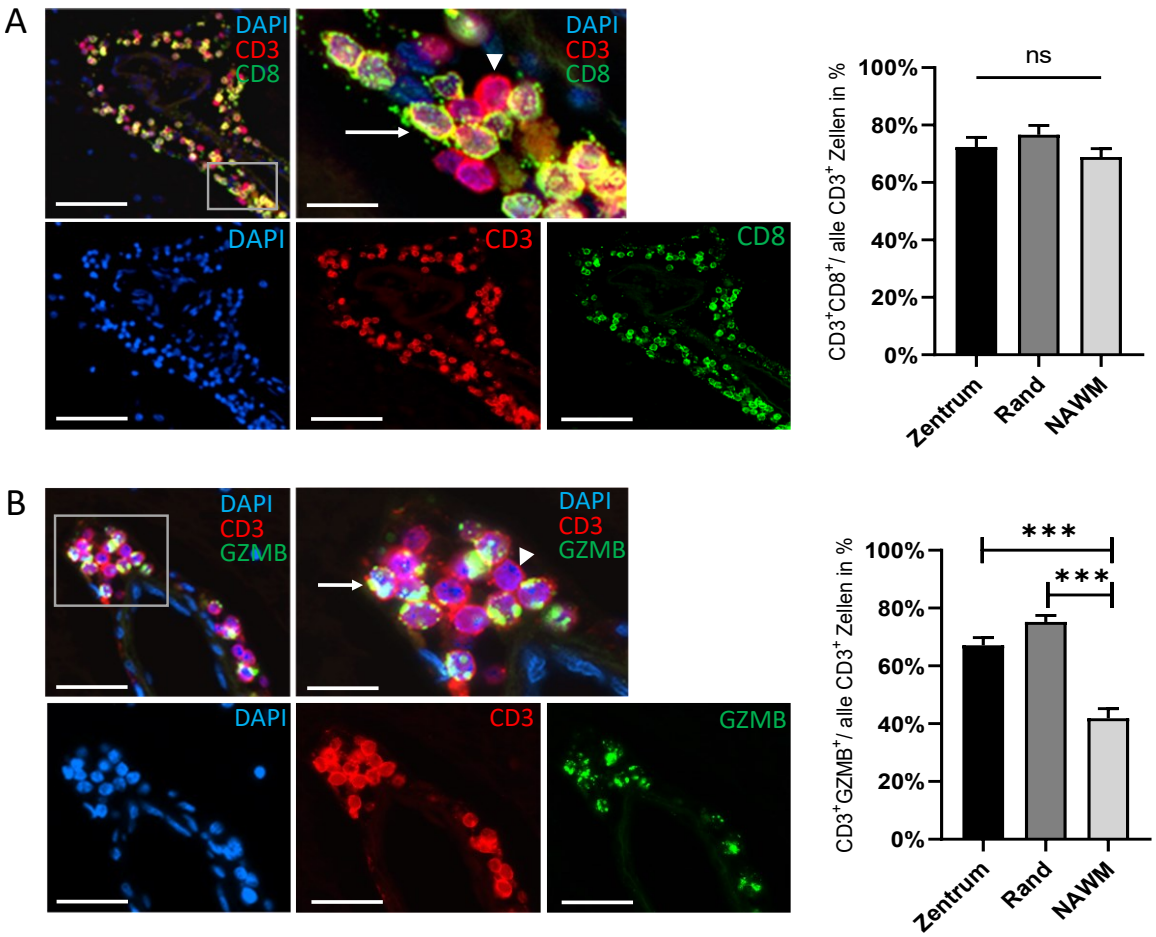


Abbildung 32: CD8⁺ und Granzym B⁺ T-Zellen in *post mortem* MS-Gewebe

(**A**) Repräsentative Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit anti-CD3 (rot) und anti-CD8 (grün), nukleär mit 4′,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, blau) markiert. In der Ausschnittsvergrößerung sind $CD3^+CD8^-$ (Pfeilkopf) sowie $CD3^+CD8^+$ Zellen (Pfeil) dargestellt. Unterschiede zwischen den analysierten Hirnregionen wurden mit der Einweg-Varianzanalyse (engl. „one-way ANOVA“) gefolgt vom Tukey‘s Test ermittelt. (**B**) Repräsentative Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit anti-CD3 (rot) und anti-Granzym B (GZMB, grün), nukleär markiert mit DAPI (blau). In der Ausschnittsvergrößerung sind $CD3^+GZMB^-$ (Pfeilkopf) sowie $CD3^+GZMB^+$ Zellen (Pfeil) dargestellt. Unterschiede zwischen den analysierten Hirnregionen wurden mit der Einweg-Varianzanalyse (engl. „one-way ANOVA“) gefolgt vom Tukey‘s Test ermittelt. Alle Gruppen n=7. Maßstab: (**A**, **B**): 50µm, Ausschnittsvergrößerung (**A**, **B**): 15µm. Abbildung modifiziert, mit Genehmigung von John Wiley and Sons; Lizenznummer: 5050240200746.

Die Dichte der rekrutierten $CD3^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen war in Hirnschnitten von progressiven MS-Patienten und Cuprizone-intoxikierten Mäusen vergleichbar (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 19 sowie Abbildung 20).

4. Diskussion

In Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass:

- T-Zellen in das ZNS von Cuprizone-intoxikierten Mäusen einwandern,
- der Großteil der T-Zell-Infiltrate aus $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen besteht,
- eine Reduktion der Cuprizone-induzierten Pathologie durch die Behandlung mit Laquinimod die Rekrutierung peripherer Immunzellen signifikant reduziert,
- Dichte, vorherrschender Subtyp und Aktivitätszustand der rekrutierten T-Zellen im Cuprizone-Modell vergleichbar mit Befunden aus progressiven MS-Läsionen sind.

In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Methoden diskutiert und die Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext eingeordnet.

4.1 Diskussion der Methoden und des verwendeten Tiermodells

Die MS ist eine multifaktorielle und komplexe neurologische Erkrankung, deren Therapie sich aktuell auf die Verzögerung der Schubfrequenz beziehungsweise das Abschwächen der akuten Symptome der betroffenen Patienten beschränkt. Eine Kausaltherapie existiert nicht, unter anderem aufgrund der noch immer unbekannten Ätiologie der MS. Die Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen, insbesondere während der progressiven Krankheitsphase, ist für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten von erheblicher klinischer Relevanz. In der experimentellen Grundlagenforschung werden hierzu häufig Tiermodelle verwendet, die ausgewählte Charakteristika der komplexen MS-Pathologie abbilden. Die Vor- und Nachteile sowie die Limitation der durchgeführten Nachweis- und Auswertungsmethoden und des in dieser Arbeit verwendeten Tiermodells werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.1.1 Immunhistochemie und Immunfluoreszenzmarkierung

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenzmarkierung sind indirekte Nachweismethoden, mit denen Antigene im untersuchten Gewebe gezielt dargestellt werden können.
Verschiedene Ursachen können dazu führen, dass es bei den verwendeten Methoden zu unspezifischen Signalen kommt, welche ungenaue Ergebnisse verursachen. Bei der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenzmarkierung sind die verwendeten

Primärantikörper eine potenzielle Quelle unspezifischer Signale, welche an andere Strukturen als die Zielantigene binden. Diesem Phänomen vorbeugend wurden die in Kapitel 2.7.2 besprochenen Schritte im Arbeitsprotokoll der immunhistochemischen Markierung durchgeführt und die in Kapitel 2.9 aufgeführten Negativkontrollen bei immunhistochemischen Markierungen und Immunfluoreszenzmarkierungen mitgeführt. Je nach Alter, Schnittdicke und Einbettung des zu untersuchenden Gewebes können sich die Ergebnisse der durchgeführten Methoden unterscheiden. Aus diesem Grund wurden alle Gewebe einer Versuchsreihe zur gleichen Zeit und nach demselben Arbeitsprotokoll immunhistochemisch markiert.

Die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenzmarkierung ermöglichen semi-quantitative Aussagen über die Dichte von markierten Zellen, Sphäroiden und Partikeln. Die Methode liefert darüber hinaus Aussagen hinsichtlich der genauen Lokalisation von markierten Proteinen im untersuchten Gewebe. Eine detaillierte und umfangreiche Charakterisierung von beispielsweise Immunzellen mit vielen verschieden Markern ist jedoch nicht möglich. Hierfür werden andere Methoden wie zum Beispiel die Durchflusszytometrie benötigt.

Die Quantifizierung von Zell- und Sphäroid-Dichten erfolgte in dieser Arbeit manuell durch den Experimentator. Um zu verhindern, dass die Erwartungshaltung des Experimentators in die Quantifizierung der Ergebnisse einfließt, wurden alle auszuwertenden Dateien von einem zweiten, unabhängigen Experimentator verblindet. Über den Verlauf der manuellen Quantifizierung einer immunhistochemischen Markierung wurden dieselben Zählkriterien angelegt. Die Quantifizierung der optischen Dichte erfolgte, gemäß Kapitel 2.10.2, automatisiert in Form einer Schwellenwertmessung mit dem Programm ImageJ. Die Auswahl des Schwellenwertes erfolgte hingegen manuell durch den Experimentator und stellt so eine mögliche Fehlerquelle dar. Miteinander zu vergleichende Versuchsreihen wurden aus diesem Grund mit demselben Schwellenwert quantifiziert, sodass der Einfluss bezüglich der Auswahl des Schwellenwerts einheitlich ausfiel.

4.1.2 MS-assoziierte Tiermodelle und ihre Limitationen

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches, zytodegeneratives Tiermodell. Wie in Kapitel 1.4.2 der Einleitung beschrieben, kommt es im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation zu einer Degeneration von adulten Oligodendrozyten und zu einer nachfolgenden Demyelinisierung. Die Pathologie des Cuprizone-Modells weist viele Gemeinsamkeiten mit den pathologischen Charakteristika der progressiven MS auf. Diese sind in nachfolgender Tabelle zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 18: Gemeinsamkeiten der Pathologie progressiver MS-Läsionen und Cuprizone-induzierter Läsionen

Pathologie progressiver MS-Formen	Referenz	Pathologie im Cuprizone-Modell	Referenz
Demyelinisierung kortikaler Strukturen	[19, 96]	Demyelinisierung in kortikalen und subkortikalen Strukturen	[97, 98]
Diffuse Demyelinisierung in der weißen Substanz	[19, 99]	Demyelinisierung von Fasertrakten der weißen Substanz	[97, 100]
Axonaler Schaden	[101–103]	Axonaler Schaden in demyelinisierten Bereichen	[68, 104]
Geschlossene beziehungsweise reparierte BHS	[105–107]	Geschlossene BHS	[69–72]
Oxidativer Stress	[108–110]	Oxidativer Stress in demyelinisierten Bereichen	[111, 112]

Modifiziert nach [113]

Neben den genannten Parallelen zur Pathologie progressiver MS Läsionen bietet das Cuprizone-Modell den Vorteil, eine reproduzierbare und zeitlich kontrollierbare Demyelinisierung im *Telencephalon* der intoxikierten Mäuse auszulösen [48]. Die Variabilität von Lokalisation und Intensität der Demyelinisierung ist innerhalb eines charakterisierten Mausstammes gering und somit gut mit anderen, analog durchgeführten Cuprizone-Experimenten vergleichbar.

Eine Unzulänglichkeit vieler Tiermodelle ist die oft eingeschränkte Übertragbarkeit erfolgsversprechender Therapieansätze auf den Menschen. Im MOG-EAE-Modell, einem sehr häufig verwendeten Tiermodell in der MS-Forschung, kommt es im ZNS zu einer autoimmun-vermittelten Demyelinisierung, ausgelöst durch autoreaktive $CD4^+$ T_H1- und T_H17-Zellen. Eine Depletion der $CD4^+$ T-Zellen führte in Tierexperimenten mit dem MOG-EAE-Modell zu abgeschwächten Krankheitsverläufen mit signifikant geringeren Symptomausprägungen [35]. Der Versuch, diese Erkenntnisse auf die humane MS-Situation zu übertragen und $CD4^+$ Zellen mit Antikörpern zu depletieren, blieb jedoch in klinischen Studien ohne signifikanten therapeutischen Nutzen [114, 115]. Eine mögliche Erklärung dieses Befunds besteht darin, dass im ZNS von MS-Patienten signifikant höhere Zelldichten $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden können als $CD4^+$ T-Zellen [30, 31, 116]. Das Ausmaß des axonalen Schadens in MS-Läsionen korreliert darüber hinaus positiv mit der Dichte von $CD8^+$ T-Zellen, nicht jedoch mit der Dichte von $CD4^+$ T-Zellen [117]. Ergebnisse vielversprechender Therapieansätze aus Tierexperimenten mit dem

Cuprizone-Modell konnten ebenfalls nur eingeschränkt auf die humane MS-Situation übertragen werden. Der Wirkstoff Laquinimod, welcher in behandelten Mäusen sehr erfolgreich die Cuprizone-induzierte Pathologie reduziert [95], konnte in klinischen Phase-III Studien lediglich moderate therapeutische Effekte in MS-Patienten erzielen [118].

Im klassischen MOG-EAE-Modell kommt es in Folge der aktiven Immunisierung mit MOG_{35-55} Peptiden und der Applikation von komplettem Freund-Adjuvans zu einer ausgeprägten Induktion von enzephalitogenen $CD4^+$ T-Zellen in C57BL/6 Mäusen [35, 36]. Diese autoreaktiven $CD4^+$ T-Zellen lösen eine sekundäre Demyelinisierung im ZNS der immunisierten Tiere aus, welche vor allem im Rückenmark der immunisierten Tiere von inflammatorischen Läsionen begleitet wird [40]. Diese Eigenschaft entspricht nicht der typischen Charakteristik der von $CD8^+$ T-Zellen dominierten humanen MS-Pathologie [30–32]. Die Kombination aus (i) der Immunisierung mit unterschiedlichen ZNS-spezifischen Antigenen sowie (ii) der Verwendung von verschiedenen Mausstämmen resultiert in einer Vielzahl verschiedener EAE-Modelle (Übersichtsartikel in [34]). Neben der aktiven Immunisierung mit ZNS-spezifischen Antigenen beziehungsweise Peptiden besteht die Möglichkeit, eine EAE passiv über den Transfer von *in vitro* stimulierten T-Zellen zu induzieren [119]. Eine Übersicht der Charakteristika und Limitationen ausgewählter EAE-Modelle ist in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Charakteristika und Limitationen etablierter EAE-Modelle

EAE-Modell	Charakteristika	Limitationen	Referenz
aktive MOG_{35-55}-EAE in C57BL/6 Mäusen	• Induktion autoreaktiver $CD4^+$ T_H1 und T_H17 -Zellen • Monophasischer Verlauf	• Modell begrenzt auf $CD4^+$ T-Zellen • Krankheitsverlauf und Ort der Läsionen unterscheiden sich stark von der MS	[120, 121]
aktive MOG_{35-55}-EAE in PL/J Mäusen	• Induktion autoreaktiver $CD4^+$ T-Zellen • Chronisch-schubförmiger Verlauf	• Modell begrenzt auf $CD4^+$ T-Zellen • Läsionen begrenzt auf Kleinhirn und Rückenmark	[122, 123]
aktive $PLP_{139-151}$-EAE in SJL Mäusen	• Induktion autoreaktiver $CD4^+$ T-Zellen • Schubförmig-remittierender Verlauf	• Modell begrenzt auf $CD4^+$ T-Zellen • Läsionen entstehen vor allem im Rückenmark	[124, 125]

aktive MP4-EAE in C57BL/6 Mäusen	• B-Zell und $CD4^+$ T_H1-Zell-abhängige Pathologie • Monophasischer Verlauf • Formation ektoper Lymphfollikel in den Meningen	• Krankheitsverlauf unabhängig von $CD8^+$ T-Zellen • Läsionen vor allem im Kleinhirn und Rückenmark	[126, 127]
passiver adoptiver Transfer Myelin-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen	• ZNS-Inflammation ausgelöst durch $CD8^+$ autoreaktive T-Zellen • Direkter zytotoxischer Effekt auf Oligodendrozyten beobachtet	• Hohe intra-experimentelle Variabilität • Wenige $CD8^+$ T-Zellen migrieren ins Hirnparenchym	[128–130]

Abkürzungen: experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE); Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG); Myelin-Proteolipid-Protein (PLP); Swiss Jim Lambert, Mausstamm (SJL); Fusionsprotein bestehend aus Basisches Myelinprotein (MBP) und PLP (MP4).

Wie die EAE-Modelle weist auch das Cuprizone-Modell verschiedene Nachteile hinsichtlich der Vergleichbarkeit zur MS und der laborexperimentellen Durchführung auf. Um in Mäusen eine Oligodendrozyten-Degeneration auszulösen, benötigt es die artifizielle Zugabe von Cuprizone zum Normalfutter der Tiere. Der grundlegende Auslöser der Pathologie ist in diesem Tiermodell bekannt und kann willkürlich induziert werden - im Gegensatz zur humanen MS-Pathogenese, in der sehr wahrscheinlich genetische Prädispositionen, Umwelteinflüsse und womöglich auch virale Infektionen eine Rolle spielen. Einige Autoren gehen von einem pathologischen Prozess im ZNS von MS-Patienten aus, der schon lange vor dem Auftreten erster klinischer Symptome beginnt und in der weißen Substanz des ZNS stattfindet [131]. Diese potenziellen, frühen Veränderungen im ZNS von Patienten können mit dem Cuprizone-Modell nicht abgebildet werden. Das Ausmaß der Cuprizone-induzierten Pathologie ist darüber hinaus abhängig von unterschiedlichen Variablen. Neben dem Geschlecht, dem Mausstamm und dem Alter der Tiere [132–134] beeinflusst auch das Gewicht der verwendeten Mäuse zu Beginn der Cuprizone-Intoxikation das Ausmaß der Oligodendrozyten-Degeneration und Demyelinisierung [135]. Dieser Umstand kann die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Cuprizone-Experimenten begrenzen, die von unterschiedlichen Arbeitsgruppen unter Verwendung von verschiedenen Mausstämmen erlangt wurden. Unter Berücksichtigung der bekannten Vor- und Nachteile des Tiermodells wurde für diese Arbeit das Cuprizone-Modell verwendet, da es, in Abwesenheit von autoimmunen Prozessen, die Untersuchung von zytodegenerativen Veränderungen im ZNS intoxikierter Mäuse ermöglicht, die insbesondere der Pathologie typischer Läsionen progressiver MS-Patienten ähneln.

4.2 Immunzellbeteiligung im Cuprizone-Modell

Aus pathologischen Befunden von *post mortem* Hirngewebe progressiver MS-Patienten geht hervor, dass die Dichte rekrutierter Immunzellen mit dem Ausmaß des axonalen Schadens korreliert [78]. Das Vorhandensein von peripheren Immunzellen, insbesondere zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen, in Läsionen von progressiven MS-Patienten ist unstrittig [29, 116]. Eine Beteiligung von Immunzellen in der Cuprizone-induzierten Pathologie ist hingegen umstritten. Einige Autoren beschreiben im Cuprizone-Modell das gänzliche Ausbleiben einer Rekrutierung von T-Zellen [76, 136–138], in anderen Studien wird eine Invasion von T-Zellen beiläufig und nicht als Hauptbeobachtung der Arbeit erwähnt [70, 139]. In Studien, in denen keine T-Zell-Rekrutierung beobachtet werden konnte, beziehen sich Theorien für das Ausbleiben einer T-Zell-Invasion häufig auf direkt oder indirekt immunsupprimierende Eigenschaften des Cuprizone. Im Rahmen der Cuprizone-Intoxikation lässt sich sowohl eine Atrophie primär lymphatischer Organe wie dem Thymus [140], als auch sekundär lymphatischer Organe wie der Milz [136] nachweisen. Eine MOG-EAE-Immunisierung (Kapitel 1.4.1) bei parallel durchgeführter Cuprizone-Intoxikation führt des Weiteren zu einer signifikant milderen Ausprägung der EAE-Symptomatik und zu einer geringeren Rekrutierung peripherer Immunzellen, was in der Studie von Maña *et al.* auf eine immunsupprimierende Wirkung des Cuprizone zurückgeführt wurde [141]. Wie einführend in Kapitel 1.4.2 erwähnt, hat die Cuprizone-Intoxikation einen starken Einfluss auf den Kupferhaushalt der intoxikierten Tiere. Kupfer ist wiederum ein wichtiger Kofaktor der Interleukin-2 Synthese [142]. In Signalwegen für T-Zell-Aktivierung und Proliferation stellt Interleukin-2 ein wichtiges Zytokin dar. Der Cuprizone-induzierte Kupfermangel könnte so zumindest partiell einen immunsupprimierenden Effekt auf den Organismus intoxikierter Tiere erklären [143]. Eine Rekrutierung von T-Zellen in das demyelinisierte ZNS konnte bisher nur in Studien beobachtet werden, in denen die Cuprizone-Intoxikation mit einer PTX-induzierten Schädigung der BHS [144] kombiniert wurde oder bei gleichzeitiger Applikation eines Immunstimulus wie der Injektion von komplettem Freund-Adjuvans [145].

Das Cuprizone-Modell kann nicht alle Aspekte der MS abbilden. Es eignet sich hingegen gut, um bestimmte Teile der fulminanten MS-Pathologie, insbesondere der progressiven Krankheitsphase, zu untersuchen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Das Verständnis der Beziehung zwischen Inflammation und Neurodegeneration ist von entscheidender Bedeutung für zukünftige therapeutische Behandlungsansätze bei MS.
Obgleich in pathologischen Studien gezeigt werden konnte, dass in der progressiven MS der akute axonale Schaden positiv mit dem Ausmaß der Inflammation korreliert [78], bedeutet dies nicht unweigerlich, dass die Immunzellen eine axonale Schädigung auslösen. Denkbar ist auch, dass eine axonale Schädigung, verbunden mit der Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen, die Auslöser für eine sekundäre Rekrutierung von peripheren T-Zellen darstellen.
Weithin wird angenommen, dass in MS die Autoimmunität gegenüber Myelin-Antigenen zur Entwicklung von fokalen, entzündlichen Läsionen führt. Bis zum aktuellen Zeitpunkt konnten jedoch weder die Auslöser der autoimmunen Reaktionen noch die konkreten Antigene identifiziert werden. Therapieoptionen, welche häufig auf anti-inflammatorischen oder immunmodulierenden Wirkmechanismen beruhen, können das Progressionsrisiko der MS noch immer nicht zufriedenstellend senken.
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein primärer Untergang von Oligodendrozyten und die nachfolgende Demyelinisierung im ZNS der Cuprizone-intoxikierten Tiere zu einer sekundären Rekrutierung von peripheren Immunzellen führen. In einem direkten Vergleich der Cuprizone-induzierten Pathologie mit Läsionen progressiver MS-Patienten zeigten sich ähnliche Zelldichten $CD3^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen und, übereinstimmend mit humanpathologischen Befunden (Übersichtsartikel in [146]), zeigten viele der rekrutierten T-Zellen einen aktivierten Phänotyp. Die Prädominanz von $CD8^+$ Zellen gegenüber $CD4^+$ Zellen ist ebenfalls im Einklang mit Befunden aus humanpathologischen MS-Studien und bildet einen starken Gegensatz zu den meisten EAE-Modellen, in denen $CD4^+$ T-Helferzellen die inflammatorischen Infiltrate dominieren (vgl. Tabelle 19) [35, 36]. Die Komposition der rekrutierten T-Zellen im Cuprizone-Modell ähnelt somit mehr der progressiven MS-Pathologie als den Befunden der meisten von $CD4^+$ T-Zellen dominierten EAE-Modelle.
$CD8^+$ T-Zellen besitzen unterschiedliche Möglichkeiten, um in der Zielzelle die Apoptose zu induzieren. Die Expression von Fas-Ligand (FasL) auf der Zelloberfläche von $CD8^+$ T-Zellen kann nach Bindung des korrespondierenden Fas-Rezeptors (FasR) auf der Zielzelle die Apoptose einleiten [147]. Ein weiterer entscheidender Mechanismus in der $CD8^+$ T-Zell-vermittelten Zytotoxizität besteht in der Sekretion zytotoxischer Enzyme, wie der Serin-Protease Granzym B (GZMB), welche in der Zielzelle eine Caspase-abhängige Apoptose induziert [90]. Die Expression sowie die Polarisierung der GZMB beladenen Vesikel in $CD8^+$ Zellen repräsentiert somit das zytotoxische Potenzial dieser T-Zellen. Die Ergebnisse dieser

Arbeit legen nahe, dass ~40% der rekrutierten T-Zellen im Cuprizone-Modell einen aktivierten Phänotyp haben. Ob die GZMB$^+$ T-Zellen am Untergang neuronaler Strukturen [148, 149] oder am akuten axonalen Schaden [150–152] im Cuprizone-Modell beteiligt sind, ist nicht bekannt und muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Rekrutierte T-Zellen im demyelinisierten *Corpus callosum* zeigen darüber hinaus eine hohe intrazerebrale Proliferationsrate, was auf ein pro-inflammatorisches Milieu und einen erneuten Antigenkontakt im ZNS Cuprizone-intoxikierter Tiere hindeutet.

4.3.1 Die Rolle der T-Zellen in MS und im Cuprizone-Modell

Trotz der positiven Korrelation zwischen dem Ausmaß der Inflammation und dem akuten axonalen Schaden in MS [78] ist weiterhin nicht bekannt, ob die rekrutierten T-Zellen zur Progression der Pathologie in der progressiven Krankheitsphase der MS beitragen. Unabhängig von der MS-Verlaufsform konnte im ZNS von MS-Patienten in einer Vielzahl von Studien eine deutlich höhere Zelldichte CD8$^+$ zytotoxischer T-Zellen im Vergleich zu CD4$^+$ T-Zellen beobachtet werden [30, 31, 153, 154]. Die Expression von MHC-I, dem verantwortlichen Zelloberflächenprotein für die Präsentation von Antigenen an CD8$^+$ T-Zellen, ist im ZNS von MS-Patienten auf Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen im Vergleich zu Kontrollpatienten deutlich erhöht [155–158]. GZMB$^+$ zytotoxische T-Zellen wurden zudem in räumlicher Nähe zu demyelinisierten Axonen und Oligodendrozyten nachgewiesen (Übersichtsartikel in [146]). Die GZMB$^+$ Vesikel waren dabei in Richtung der geschädigten Axone polarisiert, was auf einen direkten und gezielten zytotoxischen Angriff von CD8$^+$ T-Zellen auf die Zielzellen schließen lässt. Diese Befunde implizieren, dass CD8$^+$ T-Zellen eine direkte zytotoxische Wirkung auf MHC-I-exprimierende Zellen im ZNS von MS-Patienten vermitteln und somit zur Progression der Pathologie beitragen können.
Neben den genannten pathogenen Eigenschaften werden CD8$^+$ T-Zellen auch protektive Funktionen zugeschrieben. Insbesondere für die CD8$^+$ regulatorischen T-Zellen, eine kleine Subpopulation der CD8$^+$ T-Zellen, konnten protektive und anti-inflammatorische Eigenschaften aufgezeigt werden. Chou *et al.* konnten nachweisen, dass CD8$^+$ regulatorische T-Zellen *in vitro* autoreaktive CD4$^+$ T-Zellen, die spezifisch gegen das Basische Myelinprotein (MBP) gerichtet sind, inhibieren und somit inflammatorische Prozesse abschwächen können [159]. Der komplexe Wirkmechanismus des Glatirameracetat, ein für die Behandlung von RRMS-Patienten zugelassener Immunmodulator, ist zudem teilweise auf die Induktion von CD8$^+$ regulatorischen T-Zellen und der damit verbundenen Eindämmung pro-inflammatorischer Signalkaskaden zurückzuführen [160]. Die genaue Rolle der CD8$^+$ T-Zellen an der Krankheitsprogression in der progressiven MS ist weiterhin unbekannt.

In MS-Tiermodellen konnten sowohl T-Zellen mit schädigenden als auch protektiven Eigenschaften nachgewiesen werden. Viele Studien schreiben einer potenziellen T-Zell-Rekrutierung im Cuprizone-Modell lediglich eine untergeordnete Rolle an der Entstehung und Progression der Pathologie zu. In Studien mit Recombination activating gene 1 defizienten ($RAG1^{-/-}$) Mäusen, welche weder potenziell protektive noch schädigende T-Zellen besitzen, konnte gezeigt werden, dass $RAG^{-/-}$ Mäuse gegenüber der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung in gleichem Umfang vulnerabel waren, wie Wildtyp (*wt*) Tiere. Es wurde daraus geschlussfolgert, dass T-Zellen im Cuprizone-Modell keine übergeordnete Rolle für die Demyelinisierung und Remyelinisierung spielen [76, 161, 162]. In anderen Arbeiten konnte im Cuprizone-Modell eine signifikante Rekrutierung von fluoreszenzmarkierten Knochenmarkzellen in das ZNS nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich hauptsächlich um rekrutierte Lymphozyten und Monozyten. Nach einer Transplantation von C-C chemokine receptor type 2 defizienten ($CCR2^{-/-}$) Knochenmarkzellen blieb eine Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten in das demyelinisierte *Corpus callosum* aus, ohne das Ausmaß der Demyelinisierung positiv oder negativ zu beeinflussen [163]. Ein möglicher Einfluss von Immunzellen auf die Cuprizone-vermittelte Pathologie erscheint auch in dieser Studie untergeordnet. Dass T-Zellen funktionell nicht in den Vorgang der Demyelinisierung im Cuprizone-Modell involviert sind, geht auch aus anderen Studien hervor, in denen die Cuprizone-Intoxikation gleichzeitig mit einem PTX- und Freund-Adjuvans-induzierten Immunstimulus durchgeführt wurde [145]. Caprariello *et al.* konnten zeigen, dass eine signifikante Rekrutierung von T-Zellen nur dann beobachtet werden kann, wenn zusätzlich zu der Intoxikation mit Cuprizone eine parallele Immunstimulation durchgeführt wird. T-Zellen scheinen demnach in Mäusen, die keinen zusätzlichen Immunstimulus zur Cuprizone-Intoxikation erhielten, keinen wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß der Cuprizone-induzierten Pathologie zu haben.

Einige Autoren beschreiben eine T-Zell-vermittelte Unterstützung von Remyelinisierungsprozessen [161, 164], in anderen Studien wird hingegen von einer Verzögerung der Remyelinisierung durch T-Zellen ausgegangen [79, 165, 166]. Dombrowski *et al.* konnten auf der einen Seite zeigen, dass regulatorische T-Zellen (T_{reg}) die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu adulten myelinisierenden Oligodendrozyten beschleunigen und Remyelinisierungsprozesse unterstützen, indem sie den pathologischen Eigenschaften von T_H1- und T_H17-Zellen entgegenwirken [164]. Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen potenzielle protektive Eigenschaften von T-Zellen im ZNS Cuprizone-intoxikierter Tiere. Kang *et al.* identifizierten auf der anderen Seite Interleukin-17 abhängige Signalkaskaden als entscheidend für die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung [167]. Als eine wesentliche Quelle von Interleukin-17 im ZNS beschreiben die Autoren T-Zellen. Eine mögliche pathogene Rolle von T-Zellen im Cuprizone-Modell ist

somit nicht auszuschließen. Ob den in dieser Arbeit beschriebenen, rekrutierten Lymphozyten im Cuprizone-Modell pathogene oder regenerative Eigenschaften zuteilwerden, oder ob die gefundenen T-Zellen ein Epiphänomen ohne signifikante funktionelle Relevanz sind, muss in weiteren Studien untersucht werden. Stereologische Analysen nach der „Nearest-Neighbor"-Methode [168] könnten beispielsweise Aufschlüsse darüber geben, welche T-Zell-Subpopulationen akuten axonalen Schaden im Cuprizone-Modell induzieren oder am Untergang neuronaler Strukturen beteiligt sind.

4.3.2 Potenzielle Mediatoren der T-Zell-Rekrutierung im Cuprizone-Modell

Ob T-Zellen in der progressiven Phase der MS primär oder getrieben von Hirn-intrinsischen Prozessen sekundär in das ZNS einwandern, ist weiterhin strittig. Eine Reihe von Zelltypen im ZNS kommen als Auslöser der Immunzellrekrutierung in der progressiven MS und im Cuprizone-Modell in Frage. Im folgenden Abschnitt werden Astrozyten, Mikrogliazellen und Oligodendrozyten als mögliche Mediatoren der T-Zell-Rekrutierung diskutiert.

In der Studie von Kang *et al.* wurden die pathologischen Effekte von Interleukin-17 maßgeblich über den Act1-Signalweg in Astrozyten vermittelt [167]. In MS-Läsionen konnte zudem gezeigt werden, dass das von Astrozyten gebildete Interleukin-15 eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Erhaltung von $CD8^+$ T-Zellen im ZNS übernimmt [169]. Andere Autoren beschreiben hingegen vorwiegend anti-inflammatorische Eigenschaften von Astrozyten. Bechmann *et al.* konnten zeigen, dass Astrozyten über die Expression von FasL die Apoptose in T-Zellen induzieren und so inflammatorische Prozesse im ZNS eindämmen [170]. In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach 11 Wochen Cuprizone-Intoxikation (chronische Demyelinisierung) das Ausmaß der reaktiven Astrogliose noch immer signifikant gegenüber Kontrollen erhöht war, das Ausmaß der Mikrogliose hingegen fast auf ein Kontrollniveau zurückkehrte (vgl. Abbildung 24). Diese Befunde implizieren, dass Astrozyten entscheidende Regulatoren der T-Zell-Rekrutierung im Cuprizone-Modell darstellen. Es sind weitere Studien zur Überprüfung der Hypothese erforderlich, dass eine mögliche Astrozyten-vermittelte T-Zell-Rekrutierung und -Aktivierung im Cuprizone-Modell eine übergeordnete Rolle einnimmt.

Mikrogliazellen, die residenten Immunzellen des ZNS, werden häufig mit der Entstehung von neuen Läsionen und der Rekrutierung von Immunzellen in MS in Verbindung gebracht [171, 172]. Mikrogliazellen können sowohl Zytokine sezernieren [173] als auch Antigene über MHC-II präsentieren [174] und somit die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen beeinflussen. In der NAWM von MS-Patienten zeigen Mikrogliazellen, im Vergleich zu Kontrollpatienten, einen bereits aktivierten Phänotyp [175]. Es ist somit denkbar, dass Mikrogliazellen an der Entstehung neuer inflammatorischer Läsionen und an der

Rekrutierung von T-Zellen in das ZNS beteiligt sind. Im Cuprizone-Modell konnten im Rahmen der Demyelinisierung sowohl pathologische [176, 177] als auch protektive Eigenschaften [66] von Mikrogliazellen beobachtet werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Mikrogliose positiv mit der Dichte rekrutierter T-Zellen korreliert (vgl. Abbildung 29). Eine potenzielle Rolle der Mikrogliazellen an der Rekrutierung von Immunzellen im Cuprizone-Modell ist somit ebenfalls denkbar. Aus Monozyten heranreifende periphere Makrophagen sind in ähnlicher Weise wie Mikrogliazellen dazu fähig, Antigene über den MHC-II Komplex zu präsentieren und Zytokine zu sezernieren [178]. Rekrutierte periphere Makrophagen konnten zudem sowohl in MS-Läsionen [179] als auch in geringer Dichte im Cuprizone-Modell nachgewiesen werden [70, 139]. Die Unterscheidung von Mikrogliazellen und peripheren Makrophagen anhand zellspezifischer Marker ist aufgrund der sehr ähnlichen embryologischen Entwicklung nicht trivial (Übersichtsartikel in [180]). Das Protein IBA1 wird beispielsweise sowohl von Mikrogliazellen als auch von peripheren Makrophagen und Monozyten exprimiert [181]. Für die Abgrenzung von Mikrogliazellen gegenüber Monozyten und peripheren Makrophagen werden das Transmembranprotein 119 (TMEM119) [182, 183] und der purinerge Rezeptor P2Y12 [184] als spezifische Mikroglia-Zellmarker diskutiert. In weiterführenden Studien muss gezeigt werden, ob TMEM119 und P2Y12 als eindeutig spezifische Marker für Mikrogliazellen etabliert werden können und somit eine Differenzierung der Zelltypen zuverlässig möglich wird. Eine Unterscheidung von Mikrogliazellen und peripheren Makrophagen ist erforderlich, um den Mechanismus und die treibenden Faktoren der Immunzellrekrutierung in progressiven MS-Phasen und im Cuprizone-Modell genauer untersuchen zu können.

Im aktuellen Fokus der Pathologie des Cuprizone-Modells steht der Ferroptose-abhängige Untergang von adulten Oligodendrozyten [65]. Im Verlauf von endogenen Remyelinisierungsprozessen kommt es zu einer Rekrutierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen an den Ort der Demyelinisierung [185]. Im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nicht nur Antigen-präsentierende Eigenschaften besitzen, sondern auch Zytokin-Rezeptoren wie zum Beispiel den Interleukin-17-Rezeptor exprimieren [186]. Sie gelten somit in besonderem Umfang als vulnerabel gegenüber der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Diese Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen unterstreichen eine mögliche Rolle von Oligodendrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen als Mediatoren im Rahmen der Immunzellrekrutierung. Fortführende funktionelle und *ex vivo* Untersuchungen sind nötig, um den Stellenwert der Oligodendrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen an der Immunzellrekrutierung in der MS und im Cuprizone-Modell genauer bewerten zu können.

Ob die im Cuprizone-Modell beobachtete sekundäre Rekrutierung von T-Zellen auf einen einzelnen der oben genannten Zelltypen zurückzuführen ist oder vielmehr ein Zusammenspiel verschiedener Zellen und ein daraus resultierendes pro-inflammatorisches Milieu im ZNS der Cuprizone-intoxikierten Mäuse für die Immunzellrekrutierung verantwortlich ist, muss in weiterführenden Studien gezeigt werden.

4.3.3 Fazit

Die Frage, ob T-Zellen kontinuierlich in das ZNS von progressiven MS-Patienten rekrutiert werden, ist unbeantwortet. Mehrere Autoren gehen davon aus, dass inflammatorische Vorgänge während der progressiven MS „gefangen“ hinter der geschlossenen beziehungsweise reparierten BHS stattfinden und die begleitende Astro- und Mikrogliose [187] das Voranschreiten der Neurodegeneration bedingen. Dieses Konzept könnte erklären, warum anti-inflammatorische Therapien zum Beispiel mit Interferon Beta [5] oder Fingolimod [188] während der progressiven MS wenig effektiv sind. Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit implizieren jedoch, dass T-Zellen, insbesondere $CD8^+$ Zellen, kontinuierlich in das ZNS Cuprizone-intoxikierter Tiere rekrutiert werden können, angelockt von Hirn-intrinsischen zytodegenerativen Prozessen. Die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung ist, ohne eine zusätzliche Stimulierung des Immunsystems oder der Induktion von autoreaktiven T-Zellen, ein potenter Trigger für die Rekrutierung von $CD3^+$ Zellen. Gegenüber Kontrolltieren signifikant erhöhte T-Zell-Dichten fanden sich nicht nur nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation (akute Demyelinisierung), sondern auch nach 11 Wochen (chronische Demyelinisierung) beziehungsweise nach einer zweiwöchigen Remyelinisierungsphase. Es ist also davon auszugehen, dass die Rekrutierung von T-Zellen im Cuprizone-Modell einen langanhaltenden Prozess darstellt oder die T-Zellen im ZNS Cuprizone-intoxikierter Tiere über einen längeren Zeitraum persistieren und proliferieren. Ob die primäre Degeneration von Oligodendrozyten der übergeordnete Auslöser der T-Zell-Rekrutierung ist, oder vielmehr die Induktion von pro-inflammatorischen Signalkaskaden als Konsequenz der Oligodendrozyten-Degeneration und der nachfolgenden Demyelinisierung, Mikro- und Astrogliose und dem akuten axonalen Schaden als Trigger der sekundären Rekrutierung von Immunzellen im Mittelpunkt stehen, muss in zukünftigen Studien gezeigt werden.

Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass die primäre, metabolische Oligodendrozyten-Degeneration und die nachfolgende Demyelinisierung im ZNS Cuprizone-intoxikierter Tiere ein pro-inflammatorisches Mikromilieu induzieren, welches sekundär die Rekrutierung von peripheren Immunzellen bedingt. Die rekrutierten T-Zellen sind zudem in Qualität ($CD8^+$ >

$CD4^+$ T-Zellen) und Quantität (Dichte der rekrutierten T-Zellen) vergleichbar mit inflammatorischen Infiltraten in progressiven MS-Läsionen.
Eine genauere Untersuchung der treibenden Faktoren und auslösenden Mechanismen der T-Zell-Rekrutierung ist von entscheidender Bedeutung für ein besseres Verständnis der der MS zugrundeliegenden Pathomechanismen.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Hypothese dieser Arbeit basiert auf der grundlegenden Annahme, dass die progressive Multiple Sklerose eine primär neurodegenerative Erkrankung ist, in der es sekundär zu einer Einwanderung von T-Zellen kommt („Inside-Out-Theorie“). Im verwendeten Tiermodell, dem Cuprizone-Modell, kommt es ohne induzierte Autoimmunität zu einer Degeneration von Oligodendrozyten und einer nachfolgenden Demyelinisierung.

Hypothese: Eine primäre, metabolische Oligodendrozyten-Degeneration und Demyelinisierung im Hirn Cuprizone-intoxikierter Tiere ist ein Auslöser für die sekundäre Rekrutierung von peripheren Immunzellen zum Ort der Läsion.

Methoden: Immunhistochemische Markierungen wurden an Hirnen Cuprizone-intoxikierter Tiere sowie an *post mortem* Hirnmaterial von progressiven Multiple Sklerose-Patienten durchgeführt, um die Dichte, Zusammensetzung und den Aktivitätszustand von rekrutierten T-Zellen zu untersuchen.

Ergebnisse: Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine überwiegende Rekrutierung von $CD8^+$ T-Zellen in das *Corpus callosum* Cuprizone-intoxikierter Tiere. Rekrutierte T-Zellen weisen hohe Raten von Zellproliferation und anteilig einen aktivierten Phänotyp auf, was auf pro-inflammatorische Verhältnisse im Zentralnervensystem Cuprizone-intoxikierter Tiere schließen lässt. Dichte und Zusammensetzung rekrutierter T-Zellen im Cuprizone-Modell sind zudem vergleichbar mit inflammatorischen Infiltraten in *post mortem* Gewebe von progressiven Multiple Sklerose-Patienten. Eine Reduktion der Cuprizone-induzierten Pathologie mit Laquinimod führt zu einer signifikant geringeren Ausprägung der T-Zell-Rekrutierung.

Ausblick: In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cuprizone-induzierte Pathologie einen Auslöser für die sekundäre Rekrutierung von T-Zellen an den Ort der Demyelinisierung darstellt. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus und zu den auslösenden Faktoren der T-Zell-Rekrutierung können ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge in progressiven MS Krankheitsphasen und gegebenenfalls neue Therapieansätze ermöglichen.

6. Thesen

1. Im Cuprizone-Modell kommt es ohne die Induktion von autoimmunen Prozessen zu einer Demyelinisierung mit begleitender Mikro- und Astrogliose sowie akutem axonalen Schaden im Zentralnervensystem intoxikierter Mäuse.

2. In Cuprizone-intoxikierten Mäusen werden T-Zellen an den Ort der Demyelinisierung rekrutiert. Der Grad der Myelinisierung korreliert negativ mit der Dichte der T-Zellen.

3. Nach einer zweiwöchigen Remyelinisierungsphase ist die Dichte der T-Zellen im *Corpus callosum* von Cuprizone-intoxikierten Mäusen gegenüber Kontrolltieren signifikant erhöht.

4. In das *Corpus callosum* Cuprizone-intoxikierter Tiere werden überwiegend $CD8^+$ T-Zellen rekrutiert.

5. Rekrutierte T-Zellen im Cuprizone-Modell zeigen intrazerebral hohe Raten von Zellproliferation.

6. In rekrutierten T-Zellen im Cuprizone-Modell ist eine Polarisierung zytotoxischer Vesikel zu einem Zellpol zu beobachten und deutet als Ausdruck der Lymphozyten-vermittelten Zytotoxizität auf einen aktivierten Phänotyp rekrutierter T-Zellen hin.

7. Die Dichte rekrutierter T-Zellen im Cuprizone-Modell korreliert positiv mit der Dichte von Mikrogliazellen & Makrophagen und mit dem Ausmaß des axonalen Schadens.

8. Im Vergleich zu Kontrolltieren finden sich im Rahmen der chronischen Demyelinisierung nach 11 Wochen Cuprizone-Intoxikation signifikant erhöhte T-Zell-Dichten im *Corpus callosum*.

9. Eine Reduktion der Cuprizone-induzierten Pathologie mit Laquinimod führt zu einer signifikant geringeren Ausprägung der T-Zell-Rekrutierung.

10. Dichte, Zusammensetzung und Aktivitätszustand rekrutierter T-Zellen im Cuprizone-Modell sind vergleichbar mit inflammatorischen Infiltraten in *post mortem* Gewebe von progressiven Multiple Sklerose-Patienten.

7. Literaturverzeichnis

1. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, Carra A, Elovaara I, Fazekas F, Hartung HP, Hillert J, King J, Komoly S, Lubetzki C, Montalban X, Myhr KM, Ravnborg M, Rieckmann P, Wynn D, Young C, Filippi M (2009) **Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** The Lancet 374(9700):1503–1511. doi:10.1016/S0140-6736(09)61259-9
2. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O (2012) **Clinically isolated syndromes.** The Lancet Neurology 11(2):157–169. doi:10.1016/S1474-4422(11)70274-5
3. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA (2018) **Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria.** The Lancet Neurology 17(2):162–173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
4. Solari A, Giovannetti AM, Giordano A et al (2019) **Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis: Patient Awareness and Needs. Results From an Online Survey in Italy and Germany.** Front Neurol 10. doi:10.3389/fneur.2019.00916
5. La Mantia L, Vacchi L, Di Pietrantonj C, Ebers G, Rovaris M, Fredrikson S, Filippini G (2012) **Interferon beta for secondary progressive multiple sclerosis.** Cochrane Database Syst Rev 1:CD005181. doi:10.1002/14651858.CD005181.pub3
6. Lorscheider J, Jokubaitis VG, Spelman T, Izquierdo G, Lugaresi A, Havrdova E, Horakova D, Trojano M, Duquette P, Girard M, Prat A, Grand'Maison F, Grammond P, Pucci E, Boz C, Sola P, Ferraro D, Spitaleri D, Lechner-Scott J, Terzi M, van Pesch V, Iuliano G, Bergamaschi R, Ramo-Tello C, Granella F, Oreja-Guevara C, Butzkueven H, Kalincik T (2017) **Anti-inflammatory disease-modifying treatment and short-term disability progression in SPMS.** Neurology 89(10):1050–1059. doi:10.1212/WNL.0000000000004330
7. Miller DH, Molyneux PD, Barker GJ, MacManus DG, Moseley IF, Wagner K (1999) **Effect of interferon-?1b on magnetic resonance imaging outcomes in secondary progressive multiple sclerosis: Results of a European multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** Ann Neurol. 46(6):850–859. doi:10.1002/1531-8249(199912)46:6<850::AID-ANA7>3.0.CO;2-Q
8. Molyneux PD, Kappos L, Polman C, Pozzilli C, Barkhof F, Filippi M, Yousry T, Hahn D, Wagner K, Ghazi M, Beckmann K, Dahlke F, Losseff N, Barker GJ, Thompson AJ, Miller DH (2000) **The effect of interferon beta-1b treatment on MRI measures of cerebral atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. European Study Group on Interferon beta-1b in secondary progressive multiple sclerosis.** Brain 123 (Pt 11):2256–2263. doi:10.1093/brain/123.11.2256
9. Coles AJ, Wing MG, Molyneux P, Paolillo A, Davie CM, Hale G, Miller D, Waldmann H, Compston A (1999) **Monoclonal antibody treatment exposes three**

mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. Ann Neurol. 46(3):296–304. doi:10.1002/1531-8249(199909)46:3<296::aid-ana4>3.0.co;2-#

10. Runmarker B, Andersen O (1993) **Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up.** Brain 116 (Pt 1):117–134. doi:10.1093/brain/116.1.117
11. Antel J, Antel S, Caramanos Z, Arnold DL, Kuhlmann T (2012) **Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity?** Acta Neuropathol 123(5):627–638. doi:10.1007/s00401-012-0953-0
12. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, Cree BCA, Begovich AB, Villoslada P, Montalban X, Uccelli A, Savettieri G, Lincoln RR, DeLoa C, Haines JL, Pericak-Vance MA, Compston A, Hauser SL, Oksenberg JR (2006) **Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis.** Hum Mol Genet 15(18):2813–2824. doi:10.1093/hmg/ddl223
13. Epplen C, Jäckel S, Santos EJ, D'Souza M, Poehlau D, Dotzauer B, Sindern E, Haupts M, Rüde KP, Weber F, Stöver J, Poser S, Gehler W, Malin JP, Przuntek H, Epplen JT (1997) **Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting.** Ann Neurol. 41(3):341–352. doi:10.1002/ana.410410309
14. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I (2015) **Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses.** The Lancet Neurology 14(3):263–273. doi:10.1016/S1474-4422(14)70267-4
15. Freedman DM, Dosemeci M, Alavanja MC (2000) **Mortality from multiple sclerosis and exposure to residential and occupational solar radiation: a case-control study based on death certificates.** Occup Environ Med 57(6):418–421. doi:10.1136/oem.57.6.418
16. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006) **Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis.** JAMA 296(23):2832–2838. doi:10.1001/jama.296.23.2832
17. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (1999) **A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases.** Brain 122 (Pt 12):2279–2295. doi:10.1093/brain/122.12.2279
18. Ponath G, Ramanan S, Mubarak M, Housley W, Lee S, Sahinkaya FR, Vortmeyer A, Raine CS, Pitt D (2017) **Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology.** Brain 140(2):399–413. doi:10.1093/brain/aww298
19. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005) **Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis.** Brain 128(Pt 11):2705–2712. doi:10.1093/brain/awh641
20. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) **Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.** Ann Neurol 47(6):707–717
21. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJG (2012) **Will the real multiple sclerosis please stand up?** Nat Rev Neurosci 13(7):507–514. doi:10.1038/nrn3275
22. Hauser SL, Oksenberg JR (2006) **The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration.** Neuron 52(1):61–76. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.011

23. Trapp BD, Nave K-A (2008) **Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?** Annu Rev Neurosci 31:247–269. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313
24. Ludowyk PA, Willenborg DO, Parish CR (1992) **Selective localisation of neuro-specific T lymphocytes in the central nervous system.** J Neuroimmunol 37(3):237–250. doi:10.1016/0165-5728(92)90008-9
25. Hickey WF (2001) **Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system.** Glia 36(2):118–124. doi:10.1002/glia.1101
26. Mohammad MG, Tsai VWW, Ruitenberg MJ, Hassanpour M, Li H, Hart PH, Breit SN, Sawchenko PE, Brown DA (2014) **Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance.** J Clin Invest 124(3):1228–1241. doi:10.1172/JCI71544
27. Owens T, Bechmann I, Engelhardt B (2008) **Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation.** J Neuropathol Exp Neurol 67(12):1113–1121. doi:10.1097/NEN.0b013e31818f9ca8
28. Janeway C (2001) **Immunobiology.** The immune system in health and disease ; [animated CD-ROM inside, 5. Aufl. Garland Publ, New York, NY
29. 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
30. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K (2000) **Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction.** J Exp Med 192(3):393–404. doi:10.1084/jem.192.3.393
31. Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM (1997) **The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion.** Brain 120 (Pt 8):1461–1483. doi:10.1093/brain/120.8.1461
32. van Nierop GP, van Luijn MM, Michels SS, Melief M-J, Janssen M, Langerak AW, Ouwendijk WJD, Hintzen RQ, Verjans GMGM (2017) **Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients.** Acta Neuropathol 134(3):383–401. doi:10.1007/s00401-017-1744-4
33. Kipp M, van der Star B, Vogel DYS, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S (2012) **Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond.** Mult Scler Relat Disord 1(1):15–28. doi:10.1016/j.msard.2011.09.002
34. Glatigny S, Bettelli E (2018) **Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS).** Cold Spring Harb Perspect Med 8(11). doi:10.1101/cshperspect.a028977
35. Duarte J, Carrié N, Oliveira VG, Almeida C, Agua-Doce A, Rodrigues L, Simas JP, 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

36. Soulika AM, Lee E, McCauley E, Miers L, Bannerman P, Pleasure D (2009) **Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis.** J. Neurosci. 29(47):14965–14979. doi:10.1523/jneurosci.3794-09.2009
37. Massacesi L, Genain CP, Lee-Parritz D, Letvin NL, Canfield D, Hauser SL (1995) **Active and passively induced experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets: a new model for multiple sclerosis.** Ann Neurol. 37(4):519–530. doi:10.1002/ana.410370415
38. Linington C, Lassmann H (1987) **Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG).** J Neuroimmunol 17(1):61–69. doi:10.1016/0165-5728(87)90031-2
39. Lassmann H, Bradl M (2017) **Multiple sclerosis: experimental models and reality.** Acta Neuropathol 133(2):223–244. doi:10.1007/s00401-016-1631-4
40. 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
41. 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
42. 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
43. Dale RC (2003) **Acute disseminated encephalomyelitis.** Semin Pediatr Infect Dis 14(2):90–95. doi:10.1053/spid.2003.127225
44. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009) **The cuprizone animal model: new insights into an old story.** Acta Neuropathol 118(6):723–736. doi:10.1007/s00401-009-0591-3
45. 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
46. Carlton WW (1967) **Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity.** Life Sciences 6(1):11–19. doi:10.1016/0024-3205(67)90356-6
47. 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
48. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting J-Y, 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

49. Blakemore WF (1973) **Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone.** J Neurol Sci 20(1):63–72. doi:10.1016/0022-510X(73)90118-4
50. Gudi V, Moharregh-Khiabani D, Skripuletz T, Koutsoudaki PN, Kotsiari A, Skuljec J, Trebst C, Stangel M (2009) **Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination.** Brain Res 1283:127–138. doi:10.1016/j.brainres.2009.06.005
51. Skripuletz T, Bussmann J-H, Gudi V, Koutsoudaki PN, Pul R, Moharregh-Khiabani D, Lindner M, Stangel M (2010) **Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model.** Brain Pathol 20(2):301–312. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00271.x
52. Hoffmann K, Lindner M, Gröticke I, Stangel M, Löscher W (2008) **Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice.** Exp Neurol 210(2):308–321. doi:10.1016/j.expneurol.2007.11.005
53. Fischbach F, Nedelcu J, Leopold P, Zhan J, Clarner T, Nellessen L, Beißel C, van Heuvel Y, Goswami A, Weis J, Denecke B, Schmitz C, Hochstrasser T, Nyamoya S, Victor M, Beyer C, Kipp M (2018) **Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3.** Glia. doi:10.1002/glia.23538
54. Mason JL, Jones JJ, Taniike M, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK (2000) **Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination.** J. Neurosci. Res. 61(3):251–262. doi:10.1002/1097-4547(20000801)61:3<251::AID-JNR3>3.0.CO;2-W
55. Blakemore WF (1973) **Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone.** J Neurol Sci 20(1):73–83. doi:10.1016/0022-510X(73)90119-6
56. Harsan L-A, Steibel J, Zaremba A, Agin A, Sapin R, Poulet P, Guignard B, Parizel N, Grucker D, Boehm N, Miller RH, Ghandour MS (2008) **Recovery from chronic demyelination by thyroid hormone therapy: myelinogenesis induction and assessment by diffusion tensor magnetic resonance imaging.** J Neurosci 28(52):14189–14201. doi:10.1523/JNEUROSCI.4453-08.2008
57. Venturini G (1973) **Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo.** J Neurochem 21(5):1147–1151. doi:10.1111/j.1471-4159.1973.tb07569.x
58. Benetti F, Ventura M, Salmini B, Ceola S, Carbonera D, Mammi S, Zitolo A, D'Angelo P, Urso E, Maffia M, Salvato B, Spisni E (2010) **Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration.** Neurotoxicology 31(5):509–517. doi:10.1016/j.neuro.2010.05.008
59. Harris ED (2013) **Copper, Biological Functions.** In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permiakov EA (Hrsg) Encyclopedia of metalloproteins. Springer Reference, New York, S 718–723
60. Komoly S, Jeyasingham MD, Pratt OE, Lantos PL (1987) **Decrease in oligodendrocyte carbonic anhydrase activity preceding myelin degeneration in cuprizone induced demyelination.** J Neurol Sci 79(1-2):141–148. doi:10.1016/0022-510x(87)90268-1

61. Hemm RD, Carlton WW, Welser JR (1971) **Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice.** Toxicology and Applied Pharmacology 18(4):869–882. doi:10.1016/0041-008X(71)90235-3
62. 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
63. McTigue DM, Tripathi RB (2008) **The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS.** J Neurochem 107(1):1–19. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05570.x
64. Yang WS, Stockwell BR (2016) **Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation.** Trends Cell Biol 26(3):165–176. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.014
65. Jhelum P, Santos-Nogueira E, Teo W, Haumont A, Lenoël I, Stys PK, David S (2020) **Ferroptosis mediates cuprizone-induced loss of oligodendrocytes and demyelination.** J. Neurosci. doi:10.1523/JNEUROSCI.1749-20.2020
66. 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
67. 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
68. 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
69. Bakker DA, Ludwin SK (1987) **Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases.** J Neurol Sci 78(2):125–137
70. McMahon EJ, Suzuki K, Matsushima GK (2002) **Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier.** J Neuroimmunol 130(1-2):32–45
71. Merkler D, Boretius S, Stadelmann C, Ernsting T, Michaelis T, Frahm J, Brück W (2005) **Multicontrast MRI of remyelination in the central nervous system.** NMR Biomed 18(6):395–403. doi:10.1002/nbm.972
72. 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(1):94. doi:10.1186/s40478-017-0497-6
73. Tezuka T, Tamura M, Kondo MA, Sakaue M, Okada K, Takemoto K, Fukunari A, Miwa K, Ohzeki H, Kano S, Yasumatsu H, Sawa A, Kajii Y (2013) **Cuprizone short-term exposure: astrocytic IL-6 activation and behavioral changes relevant to psychosis.** Neurobiol Dis 59:63–68. doi:10.1016/j.nbd.2013.07.003
74. Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Uña AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF (2007) **The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the**

presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. Neurochem Res 32(2):279–292. doi:10.1007/s11064-006-9165-0

75. Clarner T, Janssen K, Nellessen L, Stangel M, Skripuletz T, Krauspe B, Hess F-M, Denecke B, Beutner C, Linnartz-Gerlach B, Neumann H, Vallières L, Amor S, Ohl K, Tenbrock K, Beyer C, Kipp M (2015) **CXCL10 triggers early microglial activation in the cuprizone model.** J Immunol 194(7):3400–3413. doi:10.4049/jimmunol.1401459
76. Hiremath MM, Chen VS, Suzuki K, Ting JPY, Matsushima GK (2008) **MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells.** J Neuroimmunol 203(1):23–32. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.06.034
77. Fitzner D, Simons M (2010) **Chronic progressive multiple sclerosis - pathogenesis of neurodegeneration and therapeutic strategies.** Curr Neuropharmacol 8(3):305–315. doi:10.2174/157015910792246218
78. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009) **The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains.** Brain 132(5):1175–1189. doi:10.1093/brain/awp070
79. Baxi EG, DeBruin J, Tosi DM, Grishkan IV, Smith MD, Kirby LA, Strasburger HJ, Fairchild AN, Calabresi PA, Gocke AR (2015) **Transfer of myelin-reactive th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice.** J. Neurosci. 35(22):8626–8639. doi:10.1523/JNEUROSCI.3817-14.2015
80. Boretius S, Escher A, Dallenga T, Wrzos C, Tammer R, Brück W, Nessler S, Frahm J, Stadelmann C (2012) **Assessment of lesion pathology in a new animal model of MS by multiparametric MRI and DTI.** Neuroimage 59(3):2678–2688. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.08.051
81. Rüther BJ, Scheld M, Dreymueller 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
82. Scheld M, Rüther BJ, Große-Veldmann R, Ohl K, Tenbrock K, Dreymüller 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
83. van der Valk P, Groot CJ de (2000) **Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS.** Neuropathol Appl Neurobiol 26(1):2–10. doi:10.1046/j.1365-2990.2000.00217.x
84. Clarner T, Diederichs F, Berger K, Denecke B, Gan L, van der Valk P, Beyer C, Amor S, Kipp M (2012) **Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions.** Glia 60(10):1468–1480. doi:10.1002/glia.22367
85. Carriel V, Campos A, Alaminos M, Raimondo S, Geuna S (2017) **Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System.** Methods Mol Biol 1560:207–218. doi:10.1007/978-1-4939-6788-9_15

86. Franklin KBJ, Paxinos G (2019) **Paxino's and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.** Compact 5th Edition, 5. Aufl. Elsevier Science & Technology, San Diego
87. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** Nat Methods 9(7):671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
88. 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 (2021) **Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment.** Glia 69(4):925–942. doi:10.1002/glia.23937
89. Aranami T, Yamamura T (2008) **Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS).** Allergol Int 57(2):115–120. doi:10.2332/allergolint.R-07-159
90. Nowacki TM, Kuerten S, Zhang W, Shive CL, Kreher CR, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M (2007) **Granzyme B production distinguishes recently activated CD8+ memory cells from resting memory cells.** Cell Immunol 247(1):36–48. doi:10.1016/j.cellimm.2007.07.004
91. Curtsinger JM, Lins DC, Johnson CM, Mescher MF (2005) **Signal 3 tolerant CD8 T cells degranulate in response to antigen but lack granzyme B to mediate cytolysis.** J Immunol 175(7):4392–4399. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4392
92. Medema JP, Toes RE, Scaffidi C, Zheng TS, Flavell RA, Melief CJ, Peter ME, Offringa R, Krammer PH (1997) **Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis.** Eur J Immunol 27(12):3492–3498. doi:10.1002/eji.1830271250
93. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren H-G, Long EO (2005) **Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells.** J Exp Med 202(7):1001–1012. doi:10.1084/jem.20051143
94. Mouchacca P, Schmitt-Verhulst A-M, Boyer C (2013) **Visualization of cytolytic T cell differentiation and granule exocytosis with T cells from mice expressing active fluorescent granzyme B.** PLoS ONE 8(6):e67239. doi:10.1371/journal.pone.0067239
95. Nedelcu J, Reinbach C, Riedler P, Brendel M, Rominger A, Kaye J, Behrangi N, Jiangshan Z, Schmitz C, Kipp M (2020) **Laquinimod ameliorates secondary brain inflammation.** Neurobiol Dis 134:104675. doi:10.1016/j.nbd.2019.104675
96. Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001) **Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions.** Ann Neurol. 50(3):389–400. doi:10.1002/ana.1123
97. Goldberg J, Clarner T, Beyer C, Kipp M (2015) **Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice.** J Mol Neurosci 57(2):166–175. doi:10.1007/s12031-015-0595-5
98. 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
99. Vrenken H, Seewann A, Knol DL, Polman CH, Barkhof F, Geurts JJG (2010) **Diffusely abnormal white matter in progressive multiple sclerosis: in vivo quantitative MR imaging characterization and comparison between disease types.** AJNR Am J Neuroradiol 31(3):541–548. doi:10.3174/ajnr.A1839

100. 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
101. Haines JD, Inglese M, Casaccia P (2011) **Axonal damage in multiple sclerosis.** Mt Sinai J Med 78(2):231–243. doi:10.1002/msj.20246
102. Singh S, Dallenga T, Winkler A, Roemer S, Maruschak B, Siebert H, Brück W, Stadelmann C (2017) **Relationship of acute axonal damage, Wallerian degeneration, and clinical disability in multiple sclerosis.** J Neuroinflammation 14(1):57. doi:10.1186/s12974-017-0831-8
103. Mews I, Bergmann M, Bunkowski S, Gullotta F, Brück W (1998) **Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions.** Mult Scler 4(2):55–62. doi:10.1177/135245859800400203
104. Ohno N, Chiang H, Mahad DJ, Kidd GJ, Liu L, Ransohoff RM, Sheng Z-H, Komuro H, Trapp BD (2014) **Mitochondrial immobilization mediated by syntaphilin facilitates survival of demyelinated axons.** Proc Natl Acad Sci U S A 111(27):9953–9958. doi:10.1073/pnas.1401155111
105. Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S (2003) **Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination.** J Pathol 201(2):319–327. doi:10.1002/path.1434
106. Leech S, Kirk J, Plumb J, McQuaid S (2007) **Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis.** Neuropathol Appl Neurobiol 33(1):86–98. doi:10.1111/j.1365-2990.2006.00781.x
107. Plumb J, McQuaid S, Mirakhur M, Kirk J (2002) **Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis.** Brain Pathol 12(2):154–169. doi:10.1111/j.1750-3639.2002.tb00430.x
108. Campbell GR, Ziabreva I, Reeve AK, Krishnan KJ, Reynolds R, Howell O, Lassmann H, Turnbull DM, Mahad DJ (2011) **Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis.** Ann Neurol. 69(3):481–492. doi:10.1002/ana.22109
109. Lee D-H, Gold R, Linker RA (2012) **Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and neurodegenerative diseases: therapeutic modulation via fumaric acid esters.** Int J Mol Sci 13(9):11783–11803. doi:10.3390/ijms130911783
110. Ohl K, Tenbrock K, Kipp M (2016) **Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action.** Exp Neurol 277:58–67. doi:10.1016/j.expneurol.2015.11.010
111. Draheim T, Liessem A, Scheld M, Wilms F, Weißflog M, Denecke B, Kensler TW, Zendedel A, Beyer C, Kipp M, Wruck CJ, Fragoulis A, Clarner T (2016) **Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model.** Glia 64(12):2219–2230. doi:10.1002/glia.23058
112. Kashani IR, Chavoshi H, Pasbakhsh P, Hassani M, Omidi A, Mahmoudi R, Beyer C, Zendedel A (2017) **Protective effects of erythropoietin against cuprizone-induced**

oxidative stress and demyelination in the mouse corpus callosum. Iran J Basic Med Sci 20(8):886–893. doi:10.22038/IJBMS.2017.9110

113. Zhan J, Mann T, Joost S, Behrangi N, Frank M, Kipp M (2020) **The Cuprizone Model: Dos and Do Nots.** Cells 9(4). doi:10.3390/cells9040843
114. van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F, Miller DH, Moseley IF, Thompson AJ, Rudge P, McDougall A, McLeod JG, Adèr HJ, Polman CH (1997) **Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial.** Neurology 49(2):351–357. doi:10.1212/wnl.49.2.351
115. Lindsey JW, Hodgkinson S, Mehta R, Siegel RC, Mitchell DJ, Lim M, Piercy C, Tram T, Dorfman L, Enzmann D (1994) **Phase 1 clinical trial of chimeric monoclonal anti-CD4 antibody in multiple sclerosis.** Neurology 44(3 Pt 1):413–419. doi:10.1212/WNL.44.3_Part_1.413
116. Friese MA, Fugger L (2009) **Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis.** Ann Neurol 66(2):132–141. doi:10.1002/ana.21744
117. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W (2000) **Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation.** Brain 123 (Pt 6):1174–1183. doi:10.1093/brain/123.6.1174
118. Vollmer TL, Sorensen PS, Selmaj K, Zipp F, Havrdova E, Cohen JA, Sasson N, Gilgun-Sherki Y, Arnold DL (2014) **A randomized placebo-controlled phase III trial of oral laquinimod for multiple sclerosis.** J Neurol 261(4):773–783. doi:10.1007/s00415-014-7264-4
119. PATERSON PY (1960) **Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells.** J Exp Med 111:119–136. doi:10.1084/jem.111.1.119
120. 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
121. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, 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
122. Amor S, O'Neill JK, Morris MM, Smith RM, Wraith DC, Groome N, Travers PJ, Baker D (1996) **Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein, proteolipid protein, myelin oligodendrocyte glycoprotein for experimental allergic encephalomyelitis induction in Biozzi ABH (H-2Ag7) mice share an amino acid motif.** J Immunol 156(8):3000–3008
123. Kerlero de Rosbo N, Mendel I, Ben-Nun A (1995) **Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes.** Eur J Immunol 25(4):985–993. doi:10.1002/eji.1830250419
124. Bebo BF, Vandenbark AA, Offner H (1996) **Male SJL mice do not relapse after induction of EAE with PLP 139-151.** J. Neurosci. Res. 45(6):680–689. doi:10.1002/(sici)1097-4547(19960915)45:6<680::aid-jnr4>3.0.co;2-4

125. Mattner F, Staykova M, Berghofer P, Wong HJ, Fordham S, Callaghan P, Jackson T, Pham T, Gregoire M-C, Zahra D, Rahardjo G, Linares D, Katsifis A (2013) **Central nervous system expression and PET imaging of the translocator protein in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis.** J Nucl Med 54(2):291–298. doi:10.2967/jnumed.112.108894
126. Kuerten S, Lichtenegger FS, Faas S, Angelov DN, Tary-Lehmann M, Lehmann PV (2006) **MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice.** J Neuroimmunol 177(1-2):99–111. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.03.021
127. Kuerten S, Schickel A, Kerkloh C, Recks MS, Addicks K, Ruddle NH, Lehmann PV (2012) **Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response.** Acta Neuropathol 124(6):861–873. doi:10.1007/s00401-012-1023-3
128. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman J (2001) **A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis.** J Exp Med 194(5):669–676. doi:10.1084/jem.194.5.669
129. Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, Raine CS (2001) **Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice.** J Immunol 166(12):7579–7587. doi:10.4049/jimmunol.166.12.7579
130. Saxena A, Bauer J, Scheikl T, Zappulla J, Audebert M, Desbois S, Waisman A, Lassmann H, Liblau RS, Mars LT (2008) **Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes.** The Journal of Immunology 181(3):1617–1621. doi:10.4049/jimmunol.181.3.1617
131. van der Valk P, Amor S (2009) **Preactive lesions in multiple sclerosis.** Curr Opin Neurol 22(3):207–213. doi:10.1097/WCO.0b013e32832b4c76
132. Irvine K-A, Blakemore WF (2006) **Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice.** J Neuroimmunol 175(1-2):69–76. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.03.002
133. Valeiras B, Rosato Siri MV, Codagnone M, Reinés A, Pasquini JM (2014) **Gender influence on schizophrenia-relevant abnormalities in a cuprizone demyelination model.** Glia 62(10):1629–1644. doi:10.1002/glia.22704
134. Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK (2009) **SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination.** Brain Pathol 19(3):467–479. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00230.x
135. Leopold P, Schmitz C, Kipp M (2019) **Animal Weight Is an Important Variable for Reliable Cuprizone-Induced Demyelination.** J Mol Neurosci 68(4):522–528. doi:10.1007/s12031-019-01312-0
136. Sen MK, Almuslehi MSM, 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
137. 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

138. Wergeland S, Torkildsen Ø, Myhr K-M, Mørk SJ, Bø L (2012) **The cuprizone model: regional heterogeneity of pathology.** APMIS 120(8):648–657. doi:10.1111/j.1600-0463.2012.02882.x
139. 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
140. Solti I, Kvell K, Talaber G, Veto S, Acs P, Gallyas F, Illes Z, Fekete K, Zalan P, Szanto A, Bognar 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
141. Maña P, Fordham SA, Staykova MA, Correcha M, Silva D, Willenborg DO, Liñares D (2009) **Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation.** J Neuroimmunol 210(1-2):13–21. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.02.013
142. 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
143. Matsushima GK, Morell P (2001) **The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system.** Brain Pathol 11(1):107–116. doi:10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x
144. Almuslehi MSM, Sen MK, Shortland PJ, Mahns DA, Coorssen JR (2020) **CD8 T-cell Recruitment Into the Central Nervous System of Cuprizone-Fed Mice: Relevance to Modeling the Etiology of Multiple Sclerosis.** Front Cell Neurosci 14:43. doi:10.3389/fncel.2020.00043
145. 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
146. Neumann H (2002) **Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases.** Trends in Neurosciences 25(6):313–319. doi:10.1016/S0166-2236(02)02154-9
147. Choi C, Benveniste EN (2004) **Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses.** Brain Res Rev 44(1):65–81. doi:10.1016/j.brainresrev.2003.08.007
148. Chaitanya GV, Eeka P, Munker R, Alexander JS, Babu PP (2011) **Role of cytotoxic protease granzyme-b in neuronal degeneration during human stroke.** Brain Pathol 21(1):16–30. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00426.x
149. Giuliani F, Goodyer CG, Antel JP, Yong VW (2003) **Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity.** J Immunol 171(1):368–379. doi:10.4049/jimmunol.171.1.368
150. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H (2001) **Transection of Major Histocompatibility Complex Class I-Induced Neurites by Cytotoxic T Lymphocytes.** Am J Pathol 159(3):809–815. doi:10.1016/S0002-9440(10)61755-5
151. Sauer BM, Schmalstieg WF, Howe CL (2013) **Axons are injured by antigen-specific CD8(+) T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism.** Neurobiol Dis 59:194–205. doi:10.1016/j.nbd.2013.07.010

152. Deb C, Lafrance-Corey RG, Schmalstieg WF, Sauer BM, Wang H, German CL, Windebank AJ, Rodriguez M, Howe CL (2010) **CD8+ T cells cause disability and axon loss in a mouse model of multiple sclerosis.** PLoS ONE 5(8):e12478. doi:10.1371/journal.pone.0012478
153. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS (1983) **Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions.** Science 219(4582):308–310. doi:10.1126/science.6217550
154. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY (1983) **Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis.** J Neurol Sci 62(1-3):219–232. doi:10.1016/0022-510X(83)90201-0
155. Neumann H, Cavalié A, Jenne DE, Wekerle H (1995) **Induction of MHC class I genes in neurons.** Science 269(5223):549–552. doi:10.1126/science.7624779
156. Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW (1984) **Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells.** Nature 310(5979):688–691. doi:10.1038/310688a0
157. Neumann H, Schmidt H, Cavalié A, Jenne D, Wekerle H (1997) **Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha.** J Exp Med 185(2):305–316. doi:10.1084/jem.185.2.305
158. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS (1983) **Multiple sclerosis☆Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages.** J Neuroimmunol 4(3):201–221. doi:10.1016/0165-5728(83)90036-X
159. Chou YK, Henderikx P, Jones RE, Kotzin B, Hashim GA, Offner H, Vandenbark AA (1992) **Human CD8+ T cell clone regulates autologous CD4+ myelin basic protein specific T cells.** Autoimmunity 14(2):111–119. doi:10.3109/08916939209083129
160. Tennakoon DK, Mehta RS, Ortega SB, Bhoj V, Racke MK, Karandikar NJ (2006) **Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis.** J Immunol 176(11):7119–7129. doi:10.4049/jimmunol.176.11.7119
161. Bieber AJ, Kerr S, Rodriguez M (2003) **Efficient central nervous system remyelination requires T cells.** Ann Neurol. 53(5):680–684. doi:10.1002/ana.10578
162. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001) **TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination.** Nat Neurosci 4(11):1116–1122. doi:10.1038/nn738
163. Lampron A, Larochelle A, Laflamme N, Préfontaine P, Plante M-M, Sánchez MG, Yong VW, Stys PK, Tremblay M-È, Rivest S (2015) **Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes.** J Exp Med 212(4):481–495. doi:10.1084/jem.20141656
164. Dombrowski Y, O'Hagan T, Dittmer M, Penalva R, Mayoral SR, Bankhead P, Fleville S, Eleftheriadis G, Zhao C, Naughton M, Hassan R, Moffat J, Falconer J, Boyd A, Hamilton P, Allen IV, Kissenpfennig A, Moynagh PN, Evergren E, Perbal B, Williams AC, Ingram RJ, Chan JR, Franklin RJM, Fitzgerald DC (2017) **Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system.** Nat Neurosci 20(5):674–680. doi:10.1038/nn.4528

165. Wang T, Lee M-H, Johnson T, Allie R, Hu L, Calabresi PA, Nath A (2010) **Activated T-cells inhibit neurogenesis by releasing granzyme B: rescue by Kv1.3 blockers.** J. Neurosci. 30(14):5020–5027. doi:10.1523/jneurosci.0311-10.2010
166. Wagner CA, Roqué PJ, Mileur TR, Liggitt D, Goverman JM (2020) **Myelin-specific CD8+ T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity.** J Clin Invest 130(1):203–213. doi:10.1172/JCI132531
167. Kang Z, Liu L, Spangler R, Spear C, Wang C, Gulen MF, Veenstra M, Ouyang W, Ransohoff RM, Li X (2012) **IL-17-induced Act1-mediated signaling is critical for cuprizone-induced demyelination.** J Neurosci 32(24):8284–8292. doi:10.1523/JNEUROSCI.0841-12.2012
168. Schmitz C, Grolms N, Hof PR, Boehringer R, Glaser J, Korr H (2002) **Altered spatial arrangement of layer V pyramidal cells in the mouse brain following prenatal low-dose X-irradiation. A stereological study using a novel three-dimensional analysis method to estimate the nearest neighbor distance distributions of cells in thick sections.** Cereb Cortex 12(9):954–960. doi:10.1093/cercor/12.9.954
169. Saikali P, Antel JP, Pittet CL, Newcombe J, Arbour N (2010) **Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis.** J Immunol 185(10):5693–5703. doi:10.4049/jimmunol.1002188
170. Bechmann I, Steiner B, Gimsa U, Mor G, Wolf S, Beyer M, Nitsch R, Zipp F (2002) **Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent.** J Neuroimmunol 132(1-2):60–65. doi:10.1016/s0165-5728(02)00311-9
171. van Horssen J, Singh S, van der Pol S, Kipp M, Lim JL, Peferoen L, Gerritsen W, Kooi E-J, Witte ME, Geurts JJG, Vries HE de, Peferoen-Baert R, van den Elsen PJ, van der Valk P, Amor S (2012) **Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation.** J Neuroinflammation 9:156. doi:10.1186/1742-2094-9-156
172. Hendriks JJA, Teunissen CE, Vries HE de, Dijkstra CD (2005) **Macrophages and neurodegeneration.** Brain Res Brain Res Rev 48(2):185–195. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.12.008
173. Chao CC, Hu S, Ehrlich L, Peterson PK (1995) **Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors.** Brain Behav Immun 9(4):355–365. doi:10.1006/brbi.1995.1033
174. Hayes GM, Woodroofe MN, Cuzner ML (1987) **Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter.** J Neurol Sci 80(1):25–37. doi:10.1016/0022-510X(87)90218-8
175. Melief J, Schuurman KG, van de Garde MDB, Smolders J, van Eijk M, Hamann J, Huitinga I (2013) **Microglia in normal appearing white matter of multiple sclerosis are alerted but immunosuppressed.** Glia 61(11):1848–1861. doi:10.1002/glia.22562
176. Skripuletz T, Miller E, Moharregh-Khiabani D, Blank A, Pul R, Gudi V, Trebst C, Stangel M (2010) **Beneficial effects of minocycline on cuprizone induced cortical demyelination.** Neurochem Res 35(9):1422–1433. doi:10.1007/s11064-010-0202-7
177. Tahmasebi F, Pasbakhsh P, Mortezaee K, Madadi S, Barati S, Kashani IR (2019) **Effect of the CSF1R inhibitor PLX3397 on remyelination of corpus callosum in a cuprizone-induced demyelination mouse model.** J Cell Biochem 120(6):10576–10586. doi:10.1002/jcb.28344

178. Vogel DYS, Vereyken EJF, Glim JE, Heijnen PDAM, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J, Dijkstra CD (2013) **Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status.** J Neuroinflammation 10:35. doi:10.1186/1742-2094-10-35
179. Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW (2009) **Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions.** Ann Neurol. 66(6):739–753. doi:10.1002/ana.21800
180. Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, Giuliano V, Bazinet RP (2018) **Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review.** Mol Psychiatry 23(2):177–198. doi:10.1038/mp.2017.246
181. Karlen SJ, Miller EB, Wang X, Levine ES, Zawadzki RJ, Burns ME (2018) **Monocyte infiltration rather than microglia proliferation dominates the early immune response to rapid photoreceptor degeneration.** J Neuroinflammation 15(1):344. doi:10.1186/s12974-018-1365-4
182. Bennett ML, Bennett FC, Liddelow SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA (2016) **New tools for studying microglia in the mouse and human CNS.** Proc Natl Acad Sci U S A 113(12):E1738-46. doi:10.1073/pnas.1525528113
183. Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y (2016) **TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain.** Neuropathology 36(1):39–49. doi:10.1111/neup.12235
184. Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J (2017) **P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases.** Glia 65(2):375–387. doi:10.1002/glia.23097
185. Islam MS, Tatsumi K, Okuda H, Shiosaka S, Wanaka A (2009) **Olig2-expressing progenitor cells preferentially differentiate into oligodendrocytes in cuprizone-induced demyelinated lesions.** Neurochem Int 54(3-4):192–198. doi:10.1016/j.neuint.2008.10.011
186. Kirby L, Jin J, Cardona JG, Smith MD, Martin KA, Wang J, Strasburger H, Herbst L, Alexis M, Karnell J, Davidson T, Dutta R, Goverman J, Bergles D, Calabresi PA (2019) **Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination.** Nat Commun 10(1):3887. doi:10.1038/s41467-019-11638-3
187. Faissner S, Plemel JR, Gold R, Yong VW (2019) **Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies.** Nat Rev Drug Discov 18(12):905–922. doi:10.1038/s41573-019-0035-2
188. Lublin F, Miller DH, Freedman MS, Cree BAC, Wolinsky JS, Weiner H, Lubetzki C, Hartung H-P, Montalban X, Uitdehaag BMJ, Merschhemke M, Li B, Putzki N, Liu FC, Häring DA, Kappos L (2016) **Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** The Lancet 387(10023):1075–1084. doi:10.1016/s0140-6736(15)01314-8

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der unterschiedlichen MS-Verlaufsformen 1

Abbildung 2: Modelle der MS-Pathogenese 2

Abbildung 3: Präsentation von Antigenen an T-Zellen 3

Abbildung 4: Sekretion zytotoxischer Effektormoleküle 4

Abbildung 5: Schematischer Ablauf einer MOG-EAE-Induktion 5

Abbildung 6: Strukturformel von Cuprizone 6

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Verlaufs der akuten und chronischen Demyelinisierung 7

Abbildung 8: LFB/PAS-Färbung mit optimalem Färbeergebnis 16

Abbildung 9: Nissl-Färbung 18

Abbildung 10: Schematische Darstellung der immunhistochemischen ABC-Methode 20

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenzmarkierung 26

Abbildung 12: Negativkontrollen und Kreuzkontrollen bei immunhistochemischen Markierungen und Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen 30

Abbildung 13: Untersuchte Hirnregionen 31

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Auswertung der Granzym B Vesikelverteilung innerhalb einzelner Zellen mit ImageJ 36

Abbildung 15: Cuprizone-induzierte Demyelinisierung 37

Abbildung 16: Reaktive Mikrogliose im *Corpus callosum* Cuprizone-intoxikierter Tiere 38

Abbildung 17: Akuter axonaler Schaden im *Corpus callosum* Cuprizone-intoxikierter Tiere 39

Abbildung 18: Immunhistochemische Markierung mit anti-B220 (CD45R) 40

Abbildung 19: Rekrutierung peripherer Immunzellen nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung in Region 215 41

Abbildung 20: Rekrutierung peripherer Immunzellen nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung in Region 265. 43

Abbildung 21: T-Zell-Dichten im Verlauf der endogenen Remyelinisierung 44

Abbildung 22: Selektive Demyelinisierung in unterschiedlichen Bereichen des *Corpus callosum* 45

Abbildung 23: Korrelation von Myelin- und T-Zell-Dichte 46

Abbildung 24: Dichte der T-Zellen nach chronischer Demyelinisierung 48

Abbildung 25: CD3-CD8 Verhältnis der rekrutierten T-Zellen im Cuprizone-Modell 50

Abbildung 26: Rekrutierte T-Zellen exprimieren Proliferationsmarker 51

Abbildung 27: Zunahme der Dichte Granzym B^+ Zellen im Verlauf der Cuprizone-Intoxikation 52

Abbildung 28: Granzym B Expression und Vesikelpolarisierung in rekrutierten T-Zellen 53

Abbildung 29: Korrelation von Mikrogliose, axonalem Schaden und T-Zell-Dichte 55

Abbildung 30: Laquinimod reduziert die Rekrutierung von T-Zellen im Cuprizone-Modell 56

Abbildung 31: Dichte von T-Zellen in chronisch-aktiven MS-Läsionen 58

Abbildung 32: $CD8^+$ und Granzym B^+ T-Zellen in *post mortem* MS-Gewebe 59

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Studie verwendete Experimentalgruppen 12

Tabelle 2: Manuelle Entwässerung und Einbettung 14

Tabelle 3: Klinische Details des in der Arbeit verwendeten Hirnmaterials der progressiven MS-Patienten 15

Tabelle 4: Arbeitsprotokoll der LFB/PAS-Färbung 16

Tabelle 5: Arbeitsprotokoll der Nissl-Färbung 18

Tabelle 6: Entparaffinierung mit Xylol & Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe 22

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper in immunhistochemischen Markierungen an murinem Gewebe 23

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper in immunhistochemischen Markierungen an humanem Gewebe 23

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper in immunhistochemischen Markierungen an murinem und humanem Gewebe 23

Tabelle 10: Dehydrierung mit aufsteigender Alkoholreihe 24

Tabelle 11: Arbeitsprotokoll der immunhistochemischen Markierung 25

Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper in Immunfluoreszenzmarkierungen an murinem Gewebe 27

Tabelle 13: Verwendete Primärantikörper in Immunfluoreszenzmarkierungen an humanem Gewebe 27

Tabelle 14: Verwendete Sekundärantikörper in Immunfluoreszenzmarkierungen 27

Tabelle 15: Arbeitsprotokoll der Immunfluoreszenzmarkierung 28

Tabelle 16: Verwendete Isotyp-Kontrollen 29

Tabelle 17: Arbeitsschritte bei der Messung der optischen Dichte mit ImageJ 33

Tabelle 18: Gemeinsamkeiten der Pathologie progressiver MS-Läsionen und Cuprizone-induzierter Läsionen 62

Tabelle 19: Charakteristika und Limitationen etablierter EAE-Modelle 63

Tabelle 20: Verwendete Chemikalien und Materialien XXIII

Tabelle 21: Verwendete Puffer und Lösungen XXIV

10. Abkürzungsverzeichnis

ac	*Commissura anterior*
ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
AK	Antikörper
APP	Amyloid Precursor Protein
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	Cluster of differentiation
cc	*Corpus callosum*
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
cg	*Cingulum*
Cup	Cuprizone
d	Tag/e
DAB	3,3′-Diaminobenzidin
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
engl.	englisch
et al.	*et alia*
Ex	Exzitation
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
fi	*Fimbria hippocampi*
f	*Fornix hippocampi*
g	Gramm
gem.	gemäß
GZMB	Granzym B
H-Färbung	Hämatoxylin-Färbung
HIER	Demaskierung (engl. „heat induced epitope retrieval”)
HLA	Humane Leukozytenantigene (engl. „human leukocyte antigen“)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. „horseradish peroxidase”)
IBA1	Ionized calcium binding adapter molecule-1
Ig	Immunglobulin
l	Liter

lcc	laterales *Corpus callosum*
LFB	Luxol-Fast-Blue
MBP	Basisches Myelinprotein (engl. „myelin basic protein")
mcc	mediales *Corpus callosum*
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. „major histocompatibility complex")
min	Minute
ml	Milliliter
MOG_{35-55}	Myelin-Oligodendrozyten-Protein 35-55
MP4	Fusionsprotein aus MBP und PLP
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
MS	Multiple Sklerose
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PBS	Phosphatpufferlösung (engl. „phosphate buffered saline")
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PMD	*Post mortem* Zeit
PPMS	pimär-progressive MS
PTX	Pertussis-Toxin
RAG	Recombination activating gene 1
ROI	region of interest
ROIs	regions of interest
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. „relapsing-remitting MS")
SEM	Standardfehler (engl. „Standard Error of the Mean")
SJL	Swiss Jim Lambert (Mausstamm)
SPMS	sekundär-progressive MS (engl. „secondary-progressive MS")
TMEM119	Transmembranprotein 119 (engl. „transmembrane protein 119")
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
vgl.	vergleiche
w	Wochen
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm

11. Anhang

11.1 Chemikalien und Materialien

Tabelle 20: Verwendete Chemikalien und Materialien

Chemikalie	Hersteller/Firma	Bestellnummer
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Chromogen	Dako	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Substrat	Dako	K3468
4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth	6335.1
Citronensäure-Monohydrat	Merck	5949-29-1
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	Alfa Aesar	A10628
Deckgläser (24x50mm)	Menzel-Gläser	19 00 02450
DePeX	Serva	18243.02
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth	T877.1
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	1.06580.1000
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth	X986.2
Elite ABC-Kit	VECTASTAIN	PK-6100
Eosin Y	Merck	1.15935.0025
Essigsäure (Eisessig)	J.T.Baker	6052
Ethanol 100%	Walter-CMP	WAL642 6025
Ethanol 50%, 70%, 90%, 96%	Walter-CMP	WAL641 6025
Formaldehydlösung 37%	Merck	1.03999. 1000
Formaldehydlösung 37%	Roth	7398.4
Futtermehl	Ssniff	V1530-000
Haltungsfutter	Ssniff	V1534-000
Immu-Mount™ – Shandon	Thermo Scientific	9990402
Kaliumchlorid	Roth	6781.3
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	P018.2
Ketamin 10%	HFW	Zul.-Nr. 27015.00.00
Kresylviolett (Acetat)	Sigma	C5042-10G
Lithiumcarbonat	Merck	1.05680.0250
Luxol Fast Blue	Sigma	S3382-25G
Mayers Hämalaunlösung	Merck	1.09249.0500
Natriumacetat, wasserfrei	Merck	1.06268.0250
Natriumchlorid	Roth	0962.2
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	1.06346.1000

Natronlauge (NaOH)	Merck	1.06469.1000
Normales Eselserum	Sigma Aldrich	D9663
Normales Ziegenserum	Vector	S-1000
Paraffin, 57-60°C	Merck	1.07158.9025
Periodsäure	Merck	1.00524.0100
Salzsäure (HCl), 37%	Merck	1.00317.1000
Schiff'sche Reagenz	Merck	1.09033.0500
Sudanschwarz B	Sigma	S0395
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific	J1800AMNZ
Tris (PUFFERAN®)	Roth	AE15.2
Wasserstoffperoxid 35% (H_2O_2)	Merck	1.08600.1000
Xylazin (Rompun® 2%)	Bayer	Zul.-Nr. 6293841.00.00
Xylol	J.T.Baker	8118.25

11.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 21: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Inhalt/Chemikalien
3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Färbelösung	Nach Herstellerangaben aus Liquid DAB+ Substrate Chromogen System 98% v/v DAB Substrate Buffer 2% v/v DAB Chromogen
4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) - Arbeitslösung	Destilliertes Wasser 5 µg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)
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 (Paraffinschnitte)	95% v/v PBS 5% v/v Normalserum (Spezies entspricht Wirtsspezies des Sekundärantikörpers)

Citrat-Puffer	11,5g Citronensäure-Monohydrat 5000ml destilliertes Wasser pH-Wert auf 6,0 eingestellt
Eosin-Lösung	0,5g Eosin Y 250ml destilliertes Wasser
Fixierlösung	90% v/v destilliertes Wasser 10% v/v Formaldehydlösung 37% 4,6 g/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 8 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Hämatoxylin-Farblösung	250ml Mayers Hämalaunlösung filtriert
HCl-Alkohol	70% v/v Ethanol 30% v/v destilliertes Wasser Angesäuert mit 3% v/v Salzsäure 37%
Luxol-Fast-Blue (LFB) - Farblösung	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
Natriumacetat-Puffer	1,088g Natriumacetat 200ml destilliertes Wasser
Nissl-Farblösung	0,5g Kresylviolett-Acetat 100ml Natriumacetat-Puffer
Phosphatpufferlösung (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
Periodsäure-Lösung	Destilliertes Wasser 5 g/l Periodsäure
Sudanschwarz-Lösung	0,5g Sudanschwarz 500ml 70% Ethanol
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) - Ethylendiamintetra-essigsäure (EDTA) - Puffer	6,05g Tris 1,85g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat 5000ml destilliertes Wasser pH-Wert auf 9,0 eingestellt

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp für die herausragende Betreuung und die vielen Anregungen im Rahmen dieser Arbeit. Sein Engagement und die großartige Förderung und Unterstützung waren mir eine große Motivation bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Ein ebenso großer Dank gilt Frau M. sc. Sarah Joost für die exzellente und unkomplizierte fachliche Betreuung, sowohl bei der Einarbeitung in die laborexperimentellen Methoden als auch bei der inhaltlichen Ausgestaltung dieser Arbeit.

Ein weiterer großer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Anatomie für die ausdauernde Hilfsbereitschaft und Geduld bei laborexperimentellen und praktischen Fragen. Für die umfangreiche Unterstützung danke ich Frau Susann Lehmann und Frau Frauke Winzer.

Ein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sandra Amor aus dem Institut für Neuropathologie in Amsterdam für die Möglichkeit, im Rahmen eines vierwöchigen Aufenthaltes in Ihrer Arbeitsgruppe humanes *post mortem* MS-Hirngewebe zu sampeln und im Kontext dieser Arbeit untersuchen zu können.

Für die sprachlichen Korrekturen dieser Arbeit und vor allem für die immerwährende und unbegrenzte Unterstützung während meines gesamten Studiums danke ich zudem meiner Familie und meinen Freunden.

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die 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.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock	12.07.2021	Hannes Kaddatz
	(Abgabedatum)	(Vollständige Unterschrift)

14. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Kaddatz, Hannes
Geburtsdatum	13.04.1997
Geburtsort	Wismar
Staatsangehörigkeit	deutsch

Akademischer Werdegang

07.10.2021	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.09.2017	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 01.10.2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
24.06.2015	Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,2) Gerhart-Hauptmann-Gymnasium, 23970 Wismar

Klinische Erfahrungen

Praktisches Jahr

11.2021 – 03.2022	Innere Medizin, Sana Hanse-Klinikum, Wismar
03.2021 – 06.2022	Neurologie, Universitätsmedizin Rostock
06.2021 – 10.2022	Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock

Famulaturen

02.2021	Allgemeinmedizin, Dipl.-Med. Anita Windhoefer, Wismar
09.2020 – 10.2020	Neurologie, Universitätsmedizin Rostock
08.2020	Allgemeinmedizin, MVZ Wismar GmbH Dr. med. Silvia Matzke
07.2018 – 08.2018	Radiologie/Nuklearmedizin, Nuklearmedizinische Praxis Rostock. Dipl.-Med. Thomas Muscheites
02.2018 – 03.2018	Innere Medizin, Kardiologie, Sana Hanse-Klinikum, Wismar

Wissenschaftliche Nebentätigkeiten

seit 01.10.2019	Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock

Wissenschaftliche Publikationen

Wittekindt M, **Kaddatz H**, Joost S, Staffeld A, Bitar Y, Kipp M, Frintrop L. Different Methods for Evaluating Microglial Activation Using Anti-Ionized Calcium-Binding Adaptor Protein-1 Immunohistochemistry in the Cuprizone Model. Cells. 2022; 11(11):1723. doi: 10.3390/cells11111723.

Vankriekelsvenne E, Chrzanowski U, Manzhula K, Greiner T, Wree A, Hawlitschka A, Llovera G, Zhan J, Joost S, Schmitz C, Ponsaerts P, Amor S, Nutma E, Kipp M, **Kaddatz H.** Transmembrane protein 119 is neither a specific nor a reliable marker for microglia. Glia. 2022 Jun;70(6):1170-1190. doi: 10.1002/glia.24164.

Zhan J, Kipp M, Han W, **Kaddatz H**. Ectopic lymphoid follicles in progressive multiple sclerosis: From patients to animal models. Immunology. 2021 Nov;164(3):450-466. doi: 10.1111/imm.13395.

Zhan J, Fegg FN, **Kaddatz H**, Rühling S, Frenz J, Denecke B, Amor S, Ponsaerts P, Hochstrasser T, Kipp M. Focal white matter lesions induce longlasting axonal degeneration, neuroinflammation and behavioral deficits. Neurobiology of disease. 2021 Apr. S. 105371. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105371.

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. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. Glia. 2021 Apr;69(4):925-942. doi: 10.1002/glia.23937.

Schröder N, Schaffrath A, Welter JA, Putzka T, Griep A, Ziegler P, Brandt E, Samer S, Heneka MT, **Kaddatz H**, Zhan J, Kipp E, Pufe T, Tauber SC, Kipp M, Brandenburg LO. Inhibition of formyl peptide receptors improves the outcome in a mouse model of Alzheimer disease. J Neuroinflammation. 2020 Apr 24;17(1):131. doi: 10.1186/s12974-020-01816-2.

Zhan J, Yakimov V, Rühling S, Fischbach F, Nikolova E, Joost S, **Kaddatz H**, Greiner T, Frenz J, Holzmann C, Kipp M. 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):1439. doi: 10.3390/cells8111439.

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. Posterpräsentation, Vortrag, 114. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, September 2019