

AUS DEM INSTITUT FÜR ANATOMIE

DIREKTOR: PROF. DR. DR. MARKUS KIPP

Die Expression von Annexin A1 in murinen Multiple Sklerose Tiermodellen

Dissertation zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Alina Ruf | geb. am 15.11.1994 in Basingstoke (GB)

aus Rostock | 2023

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004550



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

1. Gutachter: Prof. Dr. Lars-Ove Brandenburg, Institut für Anatomie Universität Rostock

2. Gutachter: PD Dr. med. Bernd Romeike, Studiendekanat Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter König, Institut für Anatomie Universität Lübeck

Datum der Einreichung: 13.04.2023

Datum der Verteidigung: 05.12.2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1	DIE MULTIPLE SKLEROSE	4
1.1.1	KLINISCHE ASPEKTE UND VERLAUFSFORMEN DER MULTIPLER SKLEROSE	4
1.1.2	ÄTIOLOGIE DER MULTIPLE SKLEROSE	6
1.1.3	PATHOGENESE DER MULTIPLER SKLEROSE	6
1.1.4	DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM UND DIE MULTIPLE SKLEROSE	7
1.2	DIE TIERMODELLE DER MULTIPLER SKLEROSE	8
1.2.1	DAS CUPRIZONE-MODELL	8
1.2.2	DIE EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENZEPHALOMYELITIS (EAE)	9
1.2.3	DIE KOMBINATION DES CUPRIZONE-MODELLS UND DER EXPERIMENTELLEN AUTOIMMUNEN ENZEPHALOMYELITIS	10
1.3	DER FORMYL-PEPTID-REZEPTOR	10
1.4	ANNEXIN A1	13
1.4.1	STRUKTUR UND AUFBAU VON ANNEXIN A1	13
1.4.2	DER FORMYL-PEPTID-REZEPTOR UND ANNEXIN A1	15
1.4.3	MULTIPLE SKLEROSE UND ANNEXIN A1	16
2.	HYPOTHESEN	17
3.	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	TIEREXPERIMENTE	18
3.2	VERSUCHSAUFBAU	18
3.3	DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE	19
3.4	TRANSKARDIALE PERFUSION	20
3.5	ENTWÄSSERUNG, EINBETTUNG UND SCHNITT	21
3.6	UNTERSUCHTE HIRNREGION	21
3.7	HÄMATOXYLIN-FÄRBUNG & EOSIN-FÄRBUNG	24
3.8	IMMUNHISTOCHEMIE	24

Einleitung

3.8.1	PRINZIP IMMUNHISTOCHEMISCHER MARKIERUNGEN.....	24
3.8.2	DURCHFÜHRUNG IMMUNHISTOCHEMISCHER MARKIERUNGEN	26
3.9	IMMUNFLUORESZENZ	30
3.9.1	PRINZIP VON IMMUNFLUORESZENZ-DOPPELMARKIERUNGEN.....	30
3.9.2	DURCHFÜHRUNG VON IMMUNFLUORESZENZ-DOPPELMARKIERUNGEN	31
3.10	AUSWERTUNG	33
3.10.1	QUANTIFIZIERUNG DER OPTISCHEN DICHTE.....	33
3.10.2	QUANTIFIZIERUNG DER ZELL- UND PARTIKELDICHTEN	35
3.10.3	IMMUNFLUORESZENZ-DOPPELMARKIERUNGEN	35
3.10.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND GRAPHISCHE DARSTELLUNG	36
4.	ERGEBNISSE.....	37
4.1	MYELINSCHÄDIGUNG IM CUPRIZONE- UND CUP/EAE-MODELL.....	37
4.2	MIKROGLIAZELLDICHTE IM CUPRIZONE- UND CUP/EAE-MODELL.....	39
4.3	EXPRESSION VON ANNEXIN A1 IM CUP UND CUP/EAE HIRN REGION 265	41
4.4	EXPRESSION VON ANNEXIN A1 IN EAE RÜCKENMARK	44
4.5	NACHWEIS VON ANNEXIN A1 DURCH IMMUNFLUORESZENZ DOPPELMARKIERUNGEN....	46
4.5.1	EXPRESSION VON ANNEXIN A1 IN ZELLEN DER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT.....	46
4.5.2	ANNEXIN A1-EXPRESSION IN ZELLEN DER ANGEBORENEN IMMUNANTWORT	50
5.	DISKUSSION.....	59
5.1.	DIE VERWENDETEN TIERMODELLE	59
5.1.1.	DIE EXPERIMENTELLE AUTOIMMUN ENZEPHALITIS.....	59
5.1.2.	DAS CUPRIZONE-MODELL	60
5.1.3.	DAS CUPRIZONE/EAE-MODELL.....	61
5.1.4.	DIE LIMITATION DER TIERMODELLE	61
5.2.	IMMUNHISTOCHEMIE, IMMUNFLUORESZENZ UND HISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN.....	62
5.3.	DIE QUANTIFIZIERUNG VON ZELLDICHTE UND OPTISCHER DICHTEN.....	62
5.4.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	63
6.	ZUSAMMENFASSUNG	71

7.	THESEN	72
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
9.	TABELLENVERZEICHNIS	76
10.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
11.	ANHANG	80
11.1.	CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN.....	80
11.2.	PUFFER UND LÖSUNGEN	81
12.	LITERATUR	83
13.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	96
14.	DANKSAGUNG.....	97
15.	WISSENSCHAFTLICHER LEBENSLAUF	98

1. EINLEITUNG

1.1 DIE MULTIPLE SKLEROSE

1.1.1 KLINISCHE ASPEKTE UND VERLAUFSFORMEN DER MULTIPLER SKLEROSE

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine erworbene, chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die häufig im jungen Erwachsenenalter diagnostiziert wird [1]. Das Verhältnis an MS erkrankter Frauen zu erkrankten Männern liegt bei 3:1 [2]. Häufige erste Symptome sind sensorische und visuelle Störungen, motorische Beeinträchtigungen, aber auch Fatigue und kognitive Defizite können zu den Erstsymptomen gehören. Die Diagnosestellung erfolgt anhand mehrerer diagnostischer Kriterien. Zu diesen Kriterien zählen klinische Symptome, Laborbefunde und der Nachweis von T2-hyperintensiven Läsionen im Hirn und Rückenmark mithilfe der Magnetresonanztomografie (MRT) [3]. In der MRT-Bildgebung zeigen sich herdförmige Läsionen in der weißen und seltener auch in der grauen Substanz des ZNS [4]. Klinisch lassen sich zudem unterschiedliche Krankheitsphasen der MS-Erkrankung unterscheiden. Die häufig erste Erkrankungsphase, die schubförmig remittierende MS (RRMS) ist gekennzeichnet durch neurologische Funktionsstörungen, gefolgt von Remissionen, in denen sich die klinischen Symptome teilweise oder vollständig zurückbilden [5–7]. In der zweiten Phase, der sekundär progressiven MS (SPMS), die in 80 % der MS-Erkrankungen etwa 10-15 Jahre [8] nach Diagnosestellung der RRMS einsetzt, schreitet die klinische Beeinträchtigung der Patienten progredient voran und Remissionen bleiben aus [6]. Eine Sonderform der MS ist die primär progrediente MS (PPMS). Sie ist gekennzeichnet durch das Fortschreiten der klinischen Behinderungen ab dem Beginn der Erkrankung. Schübe können auftreten, Remissionen bleiben jedoch aus [9].

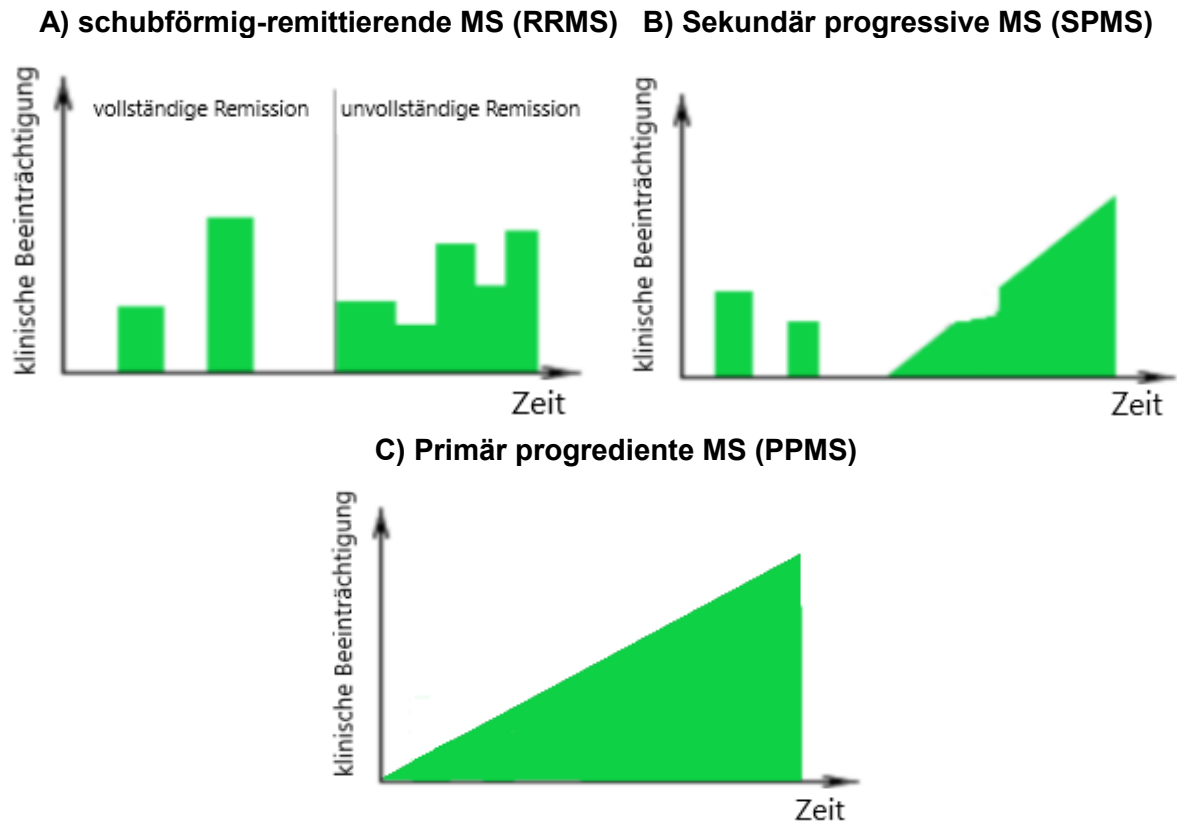


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (MS)

(A) zeigt den schematischen Verlauf der schubförmig-remittierenden MS (RRMS). Dargestellt sind zunächst vollständig remittierende Schübe. Im weiteren Zeitverlauf sind unvollständige Remissionen dargestellt.

(B) zeigt den Übergang der RRMS in die sekundär progressive MS (SPMS). Es kommt zu einer progredienten Verschlechterung ohne Remissionen nach zunächst schubförmigem Verlauf.

Graph (C) stellt die primär progrediente MS ohne Remissionen dar.

Die Therapie der MS umfasst zum aktuellen Zeitpunkt drei wesentliche Behandlungsschwerpunkte. Schübe werden für drei bis fünf Tage mit hoch dosierten Glukokortikoiden therapiert. Bei therapierefraktärer Symptomatik kann eine Steigerung der Glukokortikoid-Dosis erfolgen. Bei weiterer Symptompersistenz kann eine Plasmaseparation oder eine Immunadsorption erwogen werden. Das Ziel der Schubtherapie ist eine schnelle und möglichst vollständige Symptomrückbildung. Nach erfolgter Schubbehandlung kommen in der RRMS Immunmodulatoren und Immunsuppressiva in der Verlaufstherapie zum Einsatz. Diese Therapie strebt die Reduktion der Schubfrequenz, sowie Verzögerung der Krankheitsprogression an. Gleichzeitig wird eine begleitende symptomatische Therapie in Form von Physio-, Ergo-, Psychotherapie, Logopädie und medikamentöser symptomatischer Therapie angestrebt.

1.1.2 ÄTIOLOGIE DER MULTIPLE SKLEROSE

Bislang ist die Ursache der MS ungeklärt. Die Ursachenklärung wird durch die komplexe und multizelluläre Pathophysiologie erschwert. Es werden sowohl genetische als auch Umweltfaktoren als Ursachen und mögliche Auslöser diskutiert. Genetische Risikokonstellationen sind bekannt, die MS wird jedoch nicht durch einen einzelnen Gendefekt hervorgerufen [1]. Das erhöhte Erkrankungsrisiko ergibt sich durch das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Risikoallele. Zu den genetischen Risikofaktoren an MS zu erkranken wird die Expression der Human-Leukozyt-Antigen(HLA)-Klasse-II-Allele DRB1*1501, DRB1*0301 und DRB1*1303 auf Zellen des angeborenen Immunsystems eingestuft. HLA-Klasse-II- und Klasse-I-Moleküle sind für die Antigenpräsentation gegenüber CD4⁺ bzw. CD8⁺T-Lymphozyten unerlässlich [1]. Als umweltbedingte prädisponierende Faktoren wird ein Vitamin-D-Mangel, Nikotinkonsum, Fettleibigkeit und die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) diskutiert [2–4]. Hoen et al. vermuten einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von MS-Schüben in der RRMS und dem Eindringen von EBV-transformierten B-Zellen in das ZNS bei einer chronischen/rezidivierenden EBV-Infektion [5]. Diese Ergebnisse unterstreichen eine mögliche Rolle einer durchgemachten bzw. latenten EBV-Infektion an der MS-Krankheitsentstehung.

1.1.3 PATHOGENESE DER MULTIPLER SKLEROSE

Histopathologische Befunde lassen darauf schließen, dass es sich um eine immunvermittelte Erkrankung handelt, bei der neben der zellulären Immunantwort auch das humorale Immunsystem beteiligt ist [6, 7]. Im ZNS der MS-Erkrankten befinden sich herdförmige, demyelinisierende Läsionen. Diese Demyelinisierung wird durch eine Apoptose von Oligodendrozyten und den dadurch bedingten Untergang von Myelinscheiden begleitet [8]. Damit einhergehend kommt es zu einer Inflammation, einer neuroaxonalen Degeneration [6], einer Infiltration peripherer Immunzellen [9, 10], sowie einer Gliose. Eine Gliose ist eine pathologisch vermehrte Ansammlung und chronische Aktivierung von Gliazellen (Mikroglia und Astrozyten) [11]. Neben den Läsionen im ZNS, lässt sich in der RRMS eine stark geschädigte Blut-Hirn-Schranke (BHS) beobachten [12]. Inwieweit die BHS-Schädigung unterstützend oder ursächlich für die Lymphozytenrekrutierung und die Progression der MS ist, ist bisher unklar. Zwei komplementäre Hypothesen, die „Outside-in“- und die „Inside-out“-Theorie, bestimmen die Diskussion um die Entstehung von MS [13]. Die „Outside-in“-Theorie postuliert einen peripher ausgelösten Autoimmunangriff gegen Myelin als Ursache der MS, während die „Inside-out“-Theorie einen primären zytodegenerativen Prozess im ZNS unterstellt, der sekundäre Autoimmunreaktionen

gegen Myelinreste auslöst [14]. Während vor allem T-Zellen und deren Rekrutierung durch die BHS in das ZNS [15] bei der Entstehungstheorie der MS im Vordergrund standen, wird seit einigen Jahren auch die Rolle des angeborenen Immunsystems diskutiert [16].

1.1.4 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM UND DIE MULTIPLE SKLEROSE

Das Immunsystem ist ein interaktives Netzwerk aus lymphoiden Organen, Zellen, löslichen (humoralen) Faktoren und Botenstoffen (Zytokinen) und lässt sich in ein angeborenes (unspezifisches) und ein adaptives (spezifisches) Immunsystem unterteilen [17, 18]. Das angeborene Immunsystem umfasst Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, das Komplementsystem, Zytokine und Akute-Phase-Proteine [17]. Das adaptive Immunsystem besteht aus T- und B-Lymphozyten und besitzt eine hohe Erregerspezifität, die Fähigkeit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses und die Möglichkeit der Unterscheidung in körpereigene und körperfremde Antigene. Beide Systeme stehen miteinander in enger Verbindung.

Das angeborene Immunsystem reagiert schnell und unspezifisch auf Erreger. Auslöser der angeborenen Immunreaktion ist die Erkennung von pathogen- oder gefahren-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs/DAMPs) durch Musterwiedererkennungsrezeptoren (PRR), wie den G-Protein-gekoppelten Formyl-Peptid-Rezeptoren (FPR) oder den Toll-like-Rezeptoren [19, 20]. Es besteht die Annahme, dass die PRRs auch in Zusammenhang mit MS bei der Entstehung und dem Fortschreiten aktiver Läsionen eine wichtige Rolle spielen [21–23]. Die Rezeptoren werden unter anderem von Mikrogliazellen, den Gliazellen der angeborenen Immunantwort im ZNS exprimiert [24]. Mikrogliazellen aber auch Astrozyten nehmen wichtige Aufgaben in der angeborenen Immunabwehr des ZNS ein, darunter unter anderem schützende und regenerative Funktionen [25]. Durch die Erkennung und Bindung der Krankheitserreger an PRR (auch Formyl-peptid-Rezeptor 2) erfolgt die Rekrutierung und Aktivierung von Mikrogliazellen [26]. Diese Aktivierung führt zu einer Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen und der Rekrutierung von Immunzellen der adaptiven Immunantwort (mononukleäre Phagozyten) aus der Peripherie [27, 28]. Astrozyten können in aktiviertem Zustand sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Effekte bewirken [29] und sind zudem am Aufbau der BHS beteiligt. Neben diesen Funktionen kann ein überaktiver Zustand der Gliazellen durch die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies und Entzündungsmolekülen zu Neurotoxizität führen. Der verursachte Gewebeschaden führt wiederum zu einer weiteren Rekrutierung und Aktivierung von Gliazellen [30, 31]. Die Effekte von Astrozyten und Mikrogliazellen in der Pathophysiologie der MS sind komplex und bis heute nicht hinreichend verstanden [21]. Ein weiterer

Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind Granulozyten. Es wird davon ausgegangen, dass periphere Immunzellen eine wesentliche Rolle an den inflammatorischen Prozessen im Rahmen der MS-Pathogenese einnehmen [32]. Es konnten Einflüsse von Granulozyten auf autoimmune Prozesse beobachtet werden. Sogenannte Neutrophile extrazelluläre Fallen (engl.: neutrophil extracellular traps, NETs) sind faserige Netzwerke, die aus den Membranen aktivierter neutrophiler Granulozyten herausragen. Erhöhte Dichten von NETs konnten bereits mit komplexen Pathogenesen von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematodes, Psoriasis und Gicht in Verbindung gebracht werden [33]. Diese Feststellungen erhärten den Verdacht, dass NETs, als ein Teil neutrophiler Granulozyten und somit der angeborenen Immunantwort, für der Pathogenese der MS von Bedeutung sein könnten. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass ein vermehrtes Vorhandensein von NETs zur Aktivierung von T_H17 -Zellen führt [34]. Hierbei handelt es sich um eine Subgruppe von $CD4^+$ -T-Zellen, welchen ein pathologischer Einfluss im Rahmen vieler autoimmuner Erkrankungen und auch MS zugeschrieben wird.

1.2 DIE TIERMODELLE DER MULTIPLLEN SKLEROSE

Es existieren verschiedene experimentelle Tiermodelle, die unterschiedliche pathologische Aspekte der menschlichen MS nachahmen [35]. Häufig verwendete Modelle sind unter anderem das Cuprizone- und das experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis(EAE)-Modell.

1.2.1 DAS CUPRIZONE-MODELL

Das Cuprizone-Modell ist ein Toxin-induziertes Modell. Die Intoxikation führt bei Mäusen zu einer Demyelinisierung [36] der weißen und grauen Substanz [37]. Es wurde 1967 erstmals von William W. Carlton beschrieben [38]. Da sich Parallelen im Hinblick auf demyelinisierende Erkrankungen zeigen, findet das Modell viel Verwendung in der Erforschung der MS. Außerdem finden sich im Cuprizone-Modell neurodegenerative pathologische Komponenten, welche sich auch in progredienten MS-Verlaufsformen finden. Die zwei Hauptmerkmale des Tiermodells sowie Parallelen zur Pathologie einer MS-Erkrankung sind die De- und Remyelinisierung [36, 39–41], sowie die Myelin- und Axondegeneration [36, 42]. Die Intoxikation erfolgt durch die orale Gabe des Kupferchelators Cuprizone (Bis-Cyclohexanon-Oxaldihydrazon) [40, 42], der mit dem normalen Haltungsfutter der Tiere vermischt wird. Faktoren, die einen Einfluss auf das Modell haben, sind zum einen der verwendete Mausstamm, das Alter und Geschlecht [43], sowie das Gewicht der Tiere [44]. Den 8 Wochen alten männlichen Tieren wird eine

0,25%ige Konzentration Cuprizone gefüttert [45, 46]. Für eine akute und vollständige Demyelinisierung erfolgt die Intoxikation über die Dauer von 5 Wochen [45]. Erste Veränderungen zeigen sich bereits nach zwei Tagen in Form von einer Oligodendrozytenapoptose im *Corpus callosum* [47]. Darauf folgt eine gesteigerte Rekrutierung von Mikrogliazellen und die Phagozytose von geschädigtem Myelin [46]. Nach 5 Wochen weitet sich die Demyelinisierung auf das *Corpus callosum*, den *Kortex* und den *Hippocampus* aus [39]. Erfolgt nach 5 Wochen das Absetzen des Cuprizone-Futtergemisches kann eine Remyelinisierung nach weiteren 2-5 Wochen beobachtet werden [45]. Es handelt sich in diesem Tiermodell um eine nicht-autoimmunvermittelte Demyelinisierung, gefolgt von einer spontanen Remyelinisierung [48]. Als Grund für die Demyelinisierung und die vorangehende Oligodendrozyten-Apoptose wird eine Hemmung der Mitochondrienfunktion angenommen [49]. Der Kupferchelator Cuprizone führt demnach zu einer Herunterregulierung von Untereinheiten des Atmungskettenkomplexes und induziert oxidativen Stress [50, 51]. Infolgedessen kommt es zu einer primären Oligodendrozyten-Apoptose [21]. Oxidativer Stress steht im Verdacht, auch in neurodegenerativen Erkrankungen entscheidend zu der Pathogenese beizutragen [51]. Die Einwanderung peripherer Immunzellen spielt im Cup-Modell keine übergeordnete Rolle und erfolgt sekundär nach vorangegangener vollständiger Demyelinisierung [52].

1.2.2 DIE EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENZEPHALOMYELITIS (EAE)

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist das am häufigsten verwendete Tiermodell für die MS [53–55] und wurde erstmals 1933 beschrieben [56, 57]. Mithilfe des Modells lassen sich autoimmun-entzündliche Vorgänge im ZNS untersuchen [54, 58]. Das EAE-Modell lieferte bereits wichtige Erkenntnisse in der Erforschung von Mechanismen von heute eingesetzten MS-Medikamenten [59]. Es existieren verschiedene Modelle und Methoden um eine EAE zu induzieren. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell erhalten C57BL/6J-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen eine Immunisierung mit einem Gemisch bestehend aus Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Peptid (MOG₍₃₅₋₅₅₎) und H37R *Mycobacterium tuberculosis* zusammen mit einem starken Adjuvans [39, 60–62]. In den Adjuvantien (Freunds-Adjuvant und Pertussis-Toxin (PTX)) sind bakterielle Komponenten enthalten, die unter anderem zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen [63]. Nach der Immunisierung erfolgen die Phagozytose der ZNS-Antigene und die anschließende Antigen-Präsentation, durch die Einwanderung Antigen-präsentierender Zellen (APZ) in lokale Lymphknoten oder in die Milz. Es kommt in diesem EAE-Modell insbesondere zur Bildung von autoreaktiven T_H(T-Helferzelle) 1 und T_H17-Zellen. Diese T-Zellen sind enzephalitogen und dringen über die

BHS, welche insbesondere durch die Verwendung von PTX geschädigt ist, in Hirn und Rückenmark ein [39]. Im ZNS erkennen die T-Zellen das MOG₃₅₋₅₅ Antigen wieder und verursachen, vor allem im Rückenmark [39] und der weißen Substanz, eine Inflammation und Gewebeschädigung. Die Phagozytose dieser Gewebeschädigung erfolgt durch Mikroglia im ZNS, aber auch durch einwandernde periphere Makrophagen. Erste Erscheinungen in Form von motorischen Ausfällen zeigen sich bei den Mäusen nach etwa 14 Tagen [60]. Es handelt sich um ein sehr heterogenes Tiermodell, das vielen Einflussfaktoren unterliegt [53]. Aus diesem Grund wurden verschiedene Versuchsprotokolle zur Induktion einer EAE erstellt und bekannte Auswirkungen auf den Symptomverlauf, wie die Kombination des verwendeten Myelin-Peptids, der Mäusestamm, der genetische Hintergrund, sowie das Alter der Tiere beachtet [39, 54].

1.2.3 DIE KOMBINATION DES CUPRIZONE-MODELLS UND DER EXPERIMENTELLEN AUTOIMMUNEN ENZEPHALOMYELITIS

Die Kombination des autoimmunen EAE-Modells und des zytodegenerativen Cuprizone-Modells hat das Ziel, die primäre Zytodegeneration und Demyelinisierung (Cuprizone-Modell) sowie die autoimmune Komponente mit überschießender Einwanderung von Lymphozyten in das ZNS (EAE-Modell) zu kombinieren. Nach Cuprizone-Intoxikation kommt es zu einer primären Oligodendrozyten-Apoptose und Zytodegeneration. Die darauffolgende PTX-Induktion führt zu einer erhöhten Permeabilität der BHS und einer Migration von peripheren enzephalitogenen Immunzellen, welche durch die periphere Injektion von MOG₃₅₋₅₅ Antigenen generiert wurden [64]. Im Cup/EAE-Modell befinden sich, im Gegensatz zum bekannten akuten EAE-Modell neben Läsionen im Rückenmark und Kleinhirn zusätzlich Läsionen vermehrt in verschiedenen Bereichen des Telencephalon wie dem Corpus callosum, dem Cortex und verschiedenen subkortikalen Strukturen. Hirnbildgebungen von Cup/EAE-Tieren und aktiven Läsionen von MS-Patienten weisen Parallelen auf [65–67]. Die Prädilektionsstellen der MS-Läsionen sind das juxtakortikale und periventrikuläre Marklager, der Hirnstamm, das Kleinhirn und das Rückenmark [68].

1.3 DER FORMYL-PEPTID-REZEPTOR

Der FPR ist ein Transmembranprotein und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Nach seiner Erstbeschreibung auf phagozytotischen Leukozyten im Jahr 1975 durch

Schiffman et al. [69], wird heute immer deutlicher, welche Vielzahl an Funktionen der Rezeptorfamilie zugeschrieben werden kann [31]. Der Rezeptor findet sich in einer Reihe von Zellen und Geweben im gesamten menschlichen Körper, so auch in neuronalen Geweben [20, 24, 31, 70]. Wie für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor typisch, setzt sich der FPR aus 7 Transmembrandomänen zusammen [20, 71, 72] und besitzt einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus. Er ist Teil der Rhodopsinrezeptorfamilie [73]. Im Menschen werden drei Rezeptorformen unterschieden: der Formyl-Peptid-Rezeptor 1 (FPR1), der Formyl-Peptid-Rezeptor 2 (FPR2) und der Formyl-Peptid-Rezeptor 3 (FPR3) [31, 74, 75]. FPR1 und FPR2 sind in der Plasmamembran lokalisiert und aktivieren eine Reihe von Signaltransduktionswegen. Rabiet et al. gehen davon aus, dass der FPR3 nicht an der Übertragung von Signalen beteiligt ist. Die Funktion des FPR3 bleibt weiterhin unklar [31, 76]. Der FPR3 weist eine hohe Sequenzidentität auf, aber ist nicht in der Lage Formylpeptide zu binden [72]. In der Maus konnten bisher sieben FPR identifiziert werden. Darunter befinden sich drei murine FPR, die den humanen FPR sehr ähneln. Diese murinen Rezeptoren besitzen immunmodulatorische Eigenschaften, Agonistenpräferenzen und jene Bindungseigenschaften der menschlichen Rezeptoren [75, 77, 78].

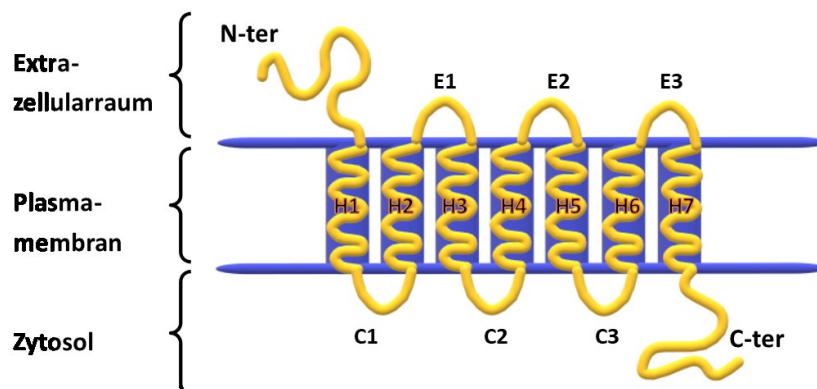


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des FPR.

Dargestellt sind sieben Transmembrandomänen (H1-H7) die durch extrazelluläre (E1-E3) und zytoplasmaische (C1-C3) Schleifen verbunden sind. Der FPR besitzt neben einem extrazellulären N-Terminus (N-ter) auch ein zytoplasmaisches C-Terminus (C-ter) (modifiziert nach Boulay et al 1990 [79]).

(Abkürzungen: FPR = Formyl-Peptid-Rezeptor, H = Transmembrandomän, E = extrazelluläre Schleife, C = zytoplasmaische Schleife, N-ter = N-Terminus, C-ter = C-Terminus)

Die FPR zeigen einen voreingenommenen Agonismus, eine Homo- und Hetero-Oligomerisierung (auch die Oligomerisierung von nicht-G-Protein-gekoppelten Oberflächenrezeptoren ist möglich). Dadurch entstehen vielfältige Rezeptorpopulationen und Signaltransduktionen [80]. Eine der charakteristischen Eigenschaften des FPR ist seine Promiskuität [31]. Der Rezeptor ist in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden zu binden [31, 80]. Dies führt, abhängig

von dem Liganden, zu spezifischen intrazellulären Reaktionen [81]. In Tabelle 1 sind verschiedene Liganden nach pro- oder anti-inflammatorischer Wirkung eingeteilt. Da auch die Liganden untereinander sehr unterschiedlich in ihrer Struktur sind, werden die FPR auch zu den PRR gezählt und sind somit Teil der angeborenen Immunantwort [71, 82]. Im Cuprizone-Mausmodell konnte eine gesteigerte Expression des FPR1 im Verlauf der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung festgestellt werden [21]. Die Ergebnisse von Bihler et al. deuten daraufhin, dass der FPR1 ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort im Verlauf der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung ist [21]. Die Rolle des FPR in der Pathogenese der MS wird aktuell diskutiert.

Tabelle 1: Einteilung der Liganden des Formyl-Peptid-Rezeptors

Anti-inflammatorische Liganden	Pro-inflammatorische Liganden
<ul style="list-style-type: none"> • Annexin A1 (ANXA1) • Resolvin D1 (RvD1) • Lipoxin A4 (LXA4) • PAXAP27/VIP 	<ul style="list-style-type: none"> • Serum amyloid A (SAA) • N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLF) • Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPAR) • β-Amyloidpeptid (Aβ42) • Prionproteinfragment PrP106-126

FPR wirken als Vermittler von Chemotaxis-Signalen bei Entzündungen und Immunreaktionen [71]. Weitere Funktionen wie Aggregation, Phagozytose, Bildung zytotoxischer Superoxidationen, Synthese bioaktiver Arachidonmetabolite und Freisetzung proteolytischer Enzyme sind bekannt [83]. Der FPR1 ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort [21] und vermittelt häufig pro-inflammatorische Signaltransduktionsprozesse. Der FPR2 wird wahrscheinlich überwiegend von endogenen Liganden aktiviert. Endogene Liganden werden während der pro-resolvierenden Phase einer Entzündung freigesetzt und aktivieren über den FPR2 eine anti-inflammatorische Signaltransduktion. Dies führt zu einer Phosphorylierung von Proteinen. Es kommt zur Aktivierung der Nicotinamidadeninukleotidphosphat-Oxidase und dadurch zur Regulierung von Entzündungsabläufen [84]. Ein bekannter endogener Ligand des FPR2 ist Annexin A1 (ANXA1) [73].

Durch die immunmodulatorischen Eigenschaften des FPR und seiner Liganden könnte die Rezeptorfamilie eine interessante therapeutische Ansatzstelle für unter anderem autoimmune oder immunvermittelte Erkrankungen darstellen [81].

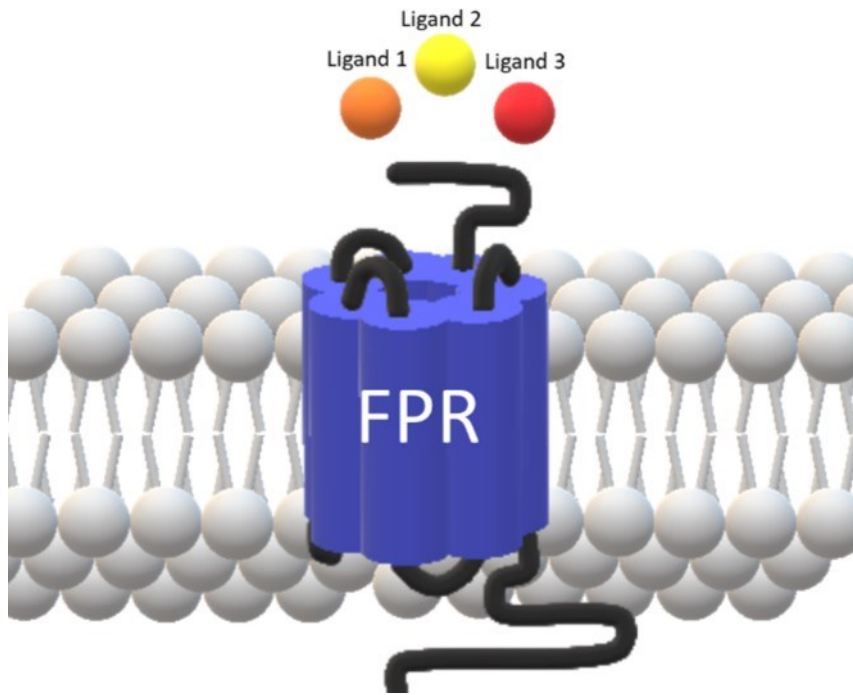


Abbildung 3: Schematische Abbildung der Ligandenbindung

In der Abbildung ist der Aufbau des FPR mit seinen 7 Transmembrandomänen dargestellt. Der Formyl-Peptid-Rezeptor ist in der Lage, eine Vielzahl von Liganden zu binden und ligandenabhängige Signaltransduktionen zu aktivieren (modifiziert nach Raabe et al. [73])

1.4 ANNEXIN A1

1.4.1 STRUKTUR UND AUFBAU VON ANNEXIN A1

ANXA1 ist ein Glukokortikoid-reguliertes, zytosolisches Protein, das zur Familie der Annexine gehört [85, 86]. Dieses wird in zwölf Subtypen gegliedert (ANXA1-ANXA11, ANXA13) [87]. ANXA1 hat eine Masse von 37kDa [73, 82, 85] und besteht aus 346 Aminosäuren, welche in vier sich wiederholenden Sequenzen in Donutform [85] um eine Proteinkerndomäne angeordnet sind, in der sich Kalzium- und Phospholipid-Bindungsstellen befinden [86, 88]. ANXA1 besitzt zusätzlich eine zweite Hauptdomäne und unterscheidet sich dadurch in seinen ANXA1-Eigenschaften von denen anderer Annexine [89].

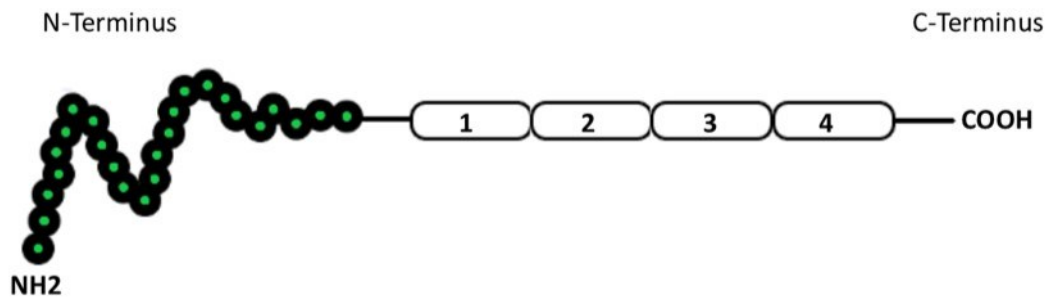


Abbildung 4: Die Struktur von Annexin A1.

Die graphische Darstellung zeigt den strukturellen Aufbau von ANXA1. ANXA1 hat eine Kernregion, die aus vier sich wiederholenden Motiven besteht, die Kalziumbindungs-domänen und eine N-terminale Domäne (modifiziert nach Kelly et al. [90])

Zentrale biochemische Aufgaben der meisten Annexine sind die Regulation der Membranzorganisation, des Membranverkehrs, die Regulation von Ionenströmen (vor allem Kalzium) über Membranen und die Aufrechterhaltung der intrazellulären Kalzium-Konzentration [89]. Die meisten Annexine besitzen keine Signalsequenzen für die Sekretion und sind intrazellulär lokalisiert. Dennoch konnten verschiedenen Subtypen, so auch ANXA1, extrazellulär nachgewiesen werden [89]. ANXA1 wird unter Entzündungsbedingungen durch bisher unbekannte Mechanismen externalisiert [73].

ANXA1 ist ein endogener Ligand des FPR [82] und vermittelt durch die extrazelluläre Bindung an den Rezeptor überwiegend anti-inflammatorische Effekte [87]. Die anti-inflammatorischen Signalkaskaden begrenzen Entzündungsreaktionen [85]. ANXA1 hat modulierenden Einfluss auf den Aktivitätszustand verschiedener Zelltypen, darunter auch neutrophile Granulozyten [91].

Verschiedene durch ANXA1 vermittelte anti-inflammatorische Effekte sind bekannt:

- Durch die Bindung von ANXA1 an den FPR kommt es zu einer L-Selektin-Abspaltung. Die Ablösung der Leukozyten vom Endothel wird induziert und somit die Transmigration gehemmt. Es resultiert eine verminderte Einwanderung von Leukozyten [15, 81, 85, 92–96].
- Die Monozytenadhäsion und –migration wird ANXA1-vermittelt reduziert [88].
- ANXA1, als ein steroidreguliertes Protein, unterstützt die anti-inflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden durch Hemmung proinflammatorischer Enzyme (Phospholipase A2) [88].
- ANXA1 übernimmt die Rolle eines „Signalverstärkers“, indem es die Freisetzung von sekundären Botenstoffen induziert und somit die Zellproliferation und –migration beeinflusst [88].

Neben den anti-inflammatorischen sind auch einige pro-inflammatorische Effekte des ANXA1 Liganden bekannt:

- Das Spaltprodukt von ANXA1 fördert die neutrophile Transmigration [97].
- Durch ein Peptid des N-Terminus wird die Chemotaxis von Leukozyten über Mitglieder der FPR-Familie gefördert [98].
- Die Freisetzung von ANXA1 durch Synovialfibroblasten bei rheumatoider Arthritis (RASf) führt zu der Sekretion der pro-inflammatorischen RASf-Matrix-Metalloproteinase-1 [99].

Die anti-inflammatorische Bedeutung von ANXA1 zeigt sich in der Abwesenheit von ANXA1. So konnte bei Mäusen ohne funktionelles ANXA1-Gen (ANXA1^{-/-} Mäuse) eine erhöhte Leukozytentransmigration [100], sowie eine erhöhte Konzentration von Entzündungsmediatoren beobachtet werden [101]. ANXA1^{-/-} Mäuse reagieren zudem nicht auf Glukokortikoidbehandlungen [73]. Diese Beobachtung lässt sich auf die steroidregulierte Wirkung von ANXA1 zurückführen.

In einem Schlaganfallmodell, mit ANXA1^{-/-} Mäusen, kam es zu erhöhten neurologischen Defiziten [102]. Heilungsprozesse verzögerten sich [103], Entzündungsreaktionen wurden verstärkt [104] und insgesamt stieg die Sterblichkeit bei lebensbedrohlichen und entzündungsassoziierten Erkrankungen [101]. Ebenso fanden sich erhöhte Werte an Cyclooxygenase 2 und zytoplasmatischer Phospholipase A2. Beide Enzyme finden sich vermehrt in geschädigtem Gewebe und führen zu einer Verstärkung beziehungsweise Aufrechterhaltung der Inflammation [105, 106]. Die Beobachtungen lassen anti-inflammatorische Effekte des Proteins ANXA1 erwarten.

1.4.2 DER FORMYL-PEPTID-REZEPTOR UND ANNEXIN A1

ANXA1 ist ein vorwiegend anti-inflammatorischer Agonist des FPR2 [107]. Der ANXA1/FPR2-Signalweg nimmt eine wichtige Rolle bei der Begrenzung unter anderem zerebraler Entzündungen ein [85]. Während in FPR1^{-/-} Mäusen nur ein teilweiser Verlust der entzündungshemmenden Wirkung von ANXA1 beobachtet werden konnte, war die ANXA1-vermittelte anti-inflammatorische Wirkung in FPR2^{-/-} Mäusen vollständig aufgehoben [104]. Zwar wird die Bindung von ANXA1 an andere FPRs beobachtet, die anti-inflammatorische Wirkung wird aber vorwiegend durch den ANXA1/FPR2-Signalweg bewirkt. Cattaneo et al. konnten durch die Effekte, welche von der ANXA1/FPR2-Achse vermittelt werden, zudem eine neuroprotektive Wirkung im Mäusehirn nachweisen [24]. Eine Dysregulation der Liganden-Rezeptor-Einheit

wird mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [104]. Der ANXA1/FPR2-Signalweg erfüllt Funktionen des angeborenen Immunsystems wie Chemotaxis, Transmigration und die Freisetzung endogener bakterizider Mediatoren [108, 109]. Das von ANXA1 abgeleitete pharmakomimetische Peptid Ac2-26 ist in der Lage, mit allen drei menschlichen FPR zu interagieren [73, 82] und besitzt ebenfalls die entzündungshemmende Wirkung von ANXA1 [73]. In der Studie von Li et al. konnte gezeigt werden, dass entzündungshemmende Eigenschaften von Ac2-26 unter anderem in einem Mausmodell nachgewiesen werden können [110].

1.4.3 MULTIPLE SKLEROSE UND ANNEXIN A1

Die akute Inflammation ist ein wichtiger Prozess der Wirtsabwehr als Reaktion auf Infektionen oder Verletzungen. Dauer und Schweregrad einer Entzündung bedürfen einer feinen Abstimmung pro- und anti-inflammatorischer Prozesse. Bei der immunvermittelten MS liegt eine nicht abklingende oder länger anhaltende und somit chronische Inflammation vor. Der Einfluss von Störungen auf endogene Regulationsmechanismen, die für Beginn, Aufrechterhaltung und Beendigung einer Entzündung im ZNS wichtig sind, spielt eine Rolle in der Pathogenese von MS [111, 112]. Als derzeitige Standardbehandlung des akuten MS-Schubes wird die Glukokortikoidgabe angewandt. Ziel der Therapie ist die anti-inflammatorische Wirkung der Glukokortikoide. Das Protein ANXA1 ist ein primär endogener Ligand und besitzt die anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Effekte von Glukokortikoiden [112, 113]. Über das ANXA1/FPR2-System werden anti-inflammatorische Signalkaskaden aktiviert [104]. Beispielsweise hemmt ANXA1, über die Bindung an der FPR2, die Phospholipase A2 und bewirkt dadurch eine Hemmung proinflammatorischer Effekte [88]. Das ANXA1/FPR2-System konnte in mehreren autoimmun-vermittelten Tiermodellen als Mediator von Entzündungsprozessen nachgewiesen werden [114, 115]. Aus humanpathologischen Befunden geht hervor, dass ANXA1 und das ANXA1/FPR2-System auch in pathologischen Prozessen der Multiplen Sklerose involviert sind [116]. Aus diesem Grund stellt ANXA1 und das ANXA1/FPR2-System einen interessanten Ansatz für die aktuelle MS-Forschung dar.

2. HYPOTHESEN

Es bedarf weiterer Untersuchungen der Einflussfaktoren auf inflammatorische Prozesse in MS. Insbesondere Kenntnisse über den Einfluss der adaptiven und angeborenen Immunreaktion sind von Bedeutung für das bessere Verständnis der Pathogenese und Pathophysiologie der MS. Dazu gehört auch ein besseres Verständnis der möglichen Rolle von ANXA1 auf immunmodulatorische Prozesse. Da aus Vorbefunden eine erhöhte zelluläre ANXA1-Expression in anti-inflammatorischen/autoimmunen Tiermodellen und in MS hervorgeht, lautet die erste Hypothese:

- 1. Es liegt eine erhöhte Zelldichte Annexin A1 exprimierender Zellen im Cuprizone-, Cup/EAE- und EAE-Modell vor.**

Vergleicht man die verwendeten Tiermodelle untereinander ergeben sich Unterschiede in der Pathophysiologie und damit auch in der zellulären Pathologie. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den verwendeten Tiermodellen ist die vermehrte Einwanderung von immunologischen Zellen in das ZNS im EAE- und Cup/EAE-Modell im Vergleich zum Cuprizone-Modell. Daher ergibt sich die folgende zweite Hypothese:

- 2. Annexin A1 wird von immunologischen Zellen exprimiert.**

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 TIEREXPERIMENTE

Im Tierexperiment der zugrunde liegenden Arbeit wurde mit 20-22g schweren, 10 Wochen alten, weiblichen Mäusen gearbeitet. Es handelte sich bei allen Mäusen um Tiere vom Stamm C57BL/6J von Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Die Tierhaltung erfolgte nach den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA). Die Tierhaltung fand in offenen Polycarbonat-Käfigen mit einer Mindestgrundfläche von 100cm² für maximal fünf Tiere statt. Die Käfigreinigung erfolgte einmal pro Woche. In den Käfigen fanden sich standardmäßig Einstreu, Nestbaumaterialien, Kauholz, Versteckmöglichkeiten, frisches Wasser sowie Standard-Haltungsfutter. Die Raumtemperatur lag bei standardisierten 22± 2°C und der Tag-Nacht-Rhythmus war auf 12 Stunden festgelegt.

Eine Genehmigung für die Durchführung des Tierexperimentes gemäß §8 Tierschutzgesetz lag von den Landesbehörden vor (Regierung Mecklenburg-Vorpommern, Tierversuchsnummer 7221.3-1-001/19). Für detaillierte Informationen zu den verwendeten Kohorten siehe Tabelle 2. Diese Tierexperimente wurden von verschiedenen Experimentatoren unabhängig betreut, aber nach demselben Protokoll durchgeführt.

Tabelle 2: Tierexperimente von denen Material in dieser Studie verwendet wurde.

Bezeichnung der Kohorte	Maus-Stamm	Alter	Ge-wicht	Geschlecht	Cuprizone Dosis	Experimentgruppen
Rostock	C57BL/6	10w	20-22g	♀	0,25%	- Kontrolle (n=5) - 5 Wochen Cup (n=5) - Cup/EAE (n=7)
Rostock	C57BL/6	10w	20-22g	♀	-	- EAE (n=7)

3.2 VERSUCHSAUFBAU

Ziel der Experimente war es, die Zelldichte ANXA1 exprimierender Zellen in akut demyelinisierten und inflammatorischen Läsionen in Mäusehirnen und Rückenmark immunhistochemisch zu untersuchen. In dieser Studie wurden drei murine MS-Tiermodelle verwendet. Die Tiere des Tierexperiments wurden daher in vier Versuchsgruppen eingeteilt (vgl. Tab. 3).

Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Kontrolle (5 Tiere)	5 Wochen Cuprizone (5wCup) - Intoxikation (5 Tiere)	Cuprizone- Intoxikation und EAE (7 Tiere)	EAE (7 Tiere)

3.3 DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

Die Tiere der Versuchsgruppe B und D erhielten eine Intoxikation mit Cuprizone. Gemahlenes Standardfutter (Futtermehl) wurde mit 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 zusätzlichem, manuellem Schwenken in der Küchenmaschine vermengt. Das Cuprizone-Futtermehl-Gemisch wurde anschließend auf zwei getrennte Petrischalen im Käfig aufgeteilt. Die Versuchsgruppen A und C bekamen über den ganzen Versuchszeitraum normales Haltungsfutter in gleicher Menge. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden zeitgleich mit den Tieren der anderen Versuchsgruppen finalisiert. Den Tieren der Gruppe C wurde das EAE induzierende MOG₃₅₋₅₅-Protein sowie PTX und Freund's-Adjuvant injiziert und die transkardiale Perfusion nach Erreichen des Höhepunktes der Ausfallerscheinungen durchgeführt. Die Tiere der Versuchsgruppe D erhielten die EAE auslösende Injektion nach dem sie für 3 Wochen mit Cuprizone intoxikiert und daraufhin für 2 Wochen mit normalem Haltungsfutter gefüttert wurden (siehe Abb. 5). Die Käfige aller Experimentgruppen wurden dreimal wöchentlich gewechselt. Die Abbruch-Kriterien für die im Versuch verwendeten Tiere waren starker Gewichtsverlust (>10% in 24h), starke Verhaltensänderungen (verringerte Bewegung, Krämpfe, Stupor) oder Infektionen. Während des gesamten Experimentes erreichte kein Tier die definierten Abbruchkriterien.

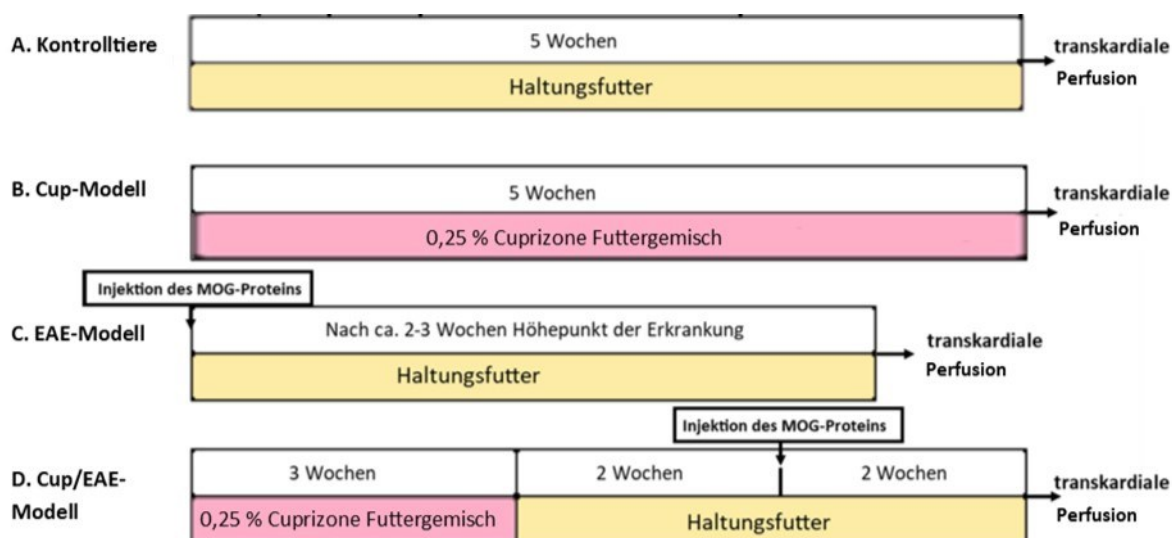


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen A-D

3.4 TRANSKARDIALE PERFUSION

Die Tiere wurden in eine terminale Narkose versetzt. Dazu wurde ein Ketamin/Xylazin-Gemisch (3 Volumenanteile Ketamin / 1 Volumenanteil Xylazin) intraperitoneal injiziert. Die Dosis betrug 0,1ml je 10g Körpergewicht. Nach Feststellung einer vollständigen Reflexlosigkeit, wurde das untere Abdomen mit einer scharfen Schere eröffnet, Haut und Peritoneum durchtrennt und das Zwerchfell freigelegt. Es erfolgte die Eröffnung des Zwerchfells und das Hochklappen des Brustkorbes. Das Zwerchfell wurde seitlich der Rippen abgetrennt. Nachdem die Freilegung des Herzens erfolgreich war, wurde durch einen kleinen Schnitt in den rechten Vorhof eine stumpfe Kanüle vorsichtig in den linken Ventrikel vorgeschoben und manuell zunächst 20 ml PBS und schließlich 30 ml Fixierlösung (3,7% Paraformaldehyd (PFA)) injiziert. Mithilfe einer Schlauchpumpe (IPC-4, IsmaTec, Wertheim, Deutschland) wurden weitere 7 Minuten mit einer Geschwindigkeit von etwa 22ml/min die Tiere perfundiert. Nach Abschluss dieses Schrittes wurde der Kopf mit einer scharfen Schere abgetrennt und der Schädel sagittal eröffnet. Die Fixierung des gesamten Kopfes mit eröffneter Kalotte fand über Nacht bei 4°C in PFA statt. Anschließend wurde das Hirn am Folgetag herauspräpariert und in eine Einbettkassette überführt.

3.5 ENTWÄSSERUNG, EINBETTUNG UND SCHNITT

Die Einbettkassetten wurden für mindestens 6 Stunden unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend unter stetigem Schütteln bei Raumtemperatur manuell dehydriert und in Paraffinblöcke eingebettet (vgl. Tab. 4). Zusätzlich wurde eine murine Milz mitgeführt und eingebettet. Die Einbettung erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

Tabelle 4: 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	2 Tage

Die Paraffinblöcke wurden vollständig auf einer Kühlplatte ausgehärtet und anschließend mithilfe eines Rotationsmikrotoms (RM 2255, Leica, Wetzlar, Deutschland) in 5µm dicke Paraffinschnitte zerlegt. Die Blöcke wurden bis zur definierten Hirnregion angeschnitten und unbrauchbares Material verworfen. Die Hirnregionen wurden aufgesucht und anschließend im warmen Wasserbad (43-45°C) jeweils zwei Hirnschnitte auf einen Objektträger aufgenommen und zum Trocknen über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C gelagert.

3.6 UNTERSUCHTE HIRNREGION

Für die Versuchsgruppe A, B und D wurde das *Corpus callosum* (CC) als ROI (engl. Region von Interesse) definiert. Um das Auffinden der definierten Hirnregionen zu erleichtern, erfolgte die

Orientierung am Maus-Hirn-Atlas von Sidman et al. (<http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>). Für die in der Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Regionen 215 (Zusammenschluss der *Commissura anterior*) und 265 (rostraler *Hippocampus*) definiert (siehe Abb. 6). Das CC wurde in einen medialen und zwei laterale Anteile unterteilt. Dazu wurde ein Lot vom höchsten Punkt des *Cingulum*s gefällt (siehe Abb. 7).

Für die Versuchsgruppe C wurde die weiße Substanz des Rückenmarks als ROI definiert (Abb. 8). In Rückenmarksschnitten wurden graue Substanz von der weißen Substanz abgegrenzt.

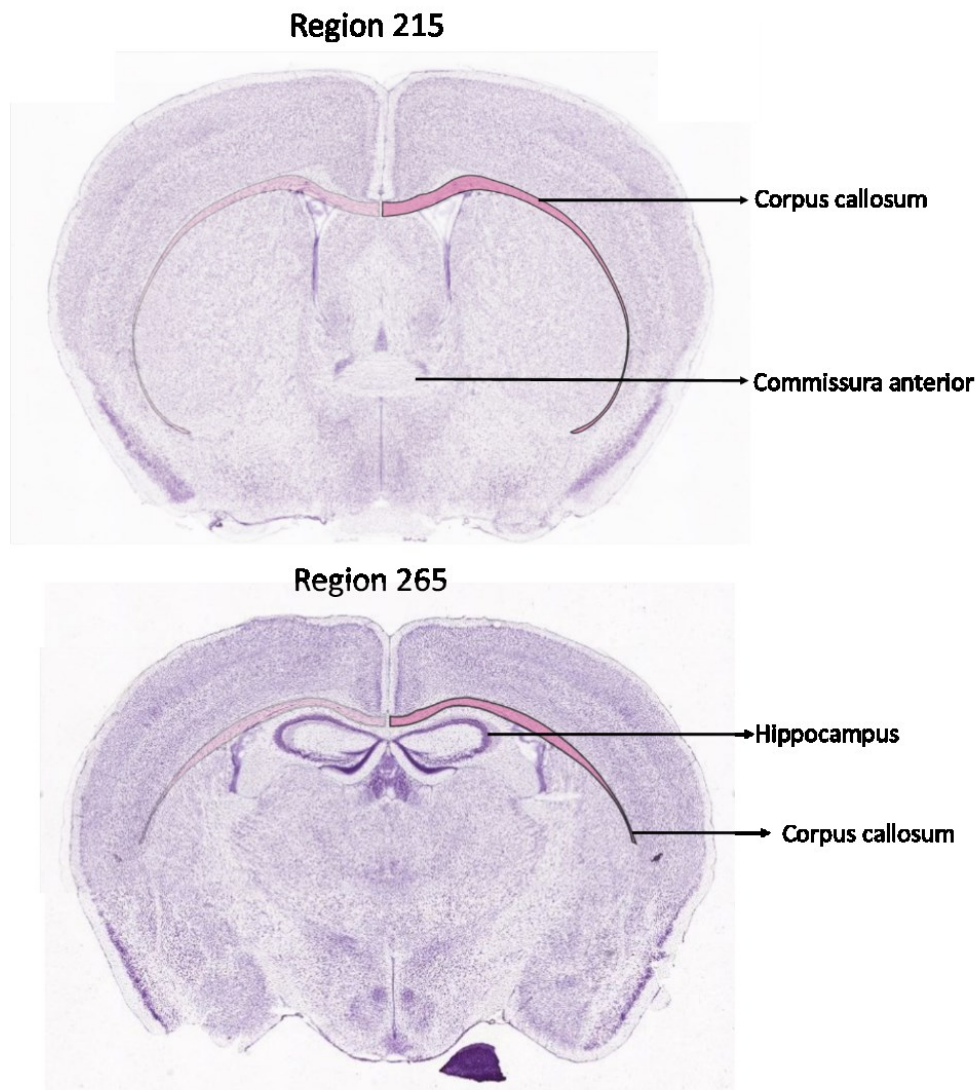


Abbildung 6: Darstellung der untersuchten Hirnregionen.

Die Region 215 wird gekennzeichnet durch den Zusammenschluss der *Commissura anterior*. Region 265 findet sich auf Höhe des rostralen Endes des *Hippocampus*.

Abbildung modifiziert nach Maushirn-Atlas von Sidman et al (<http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>).

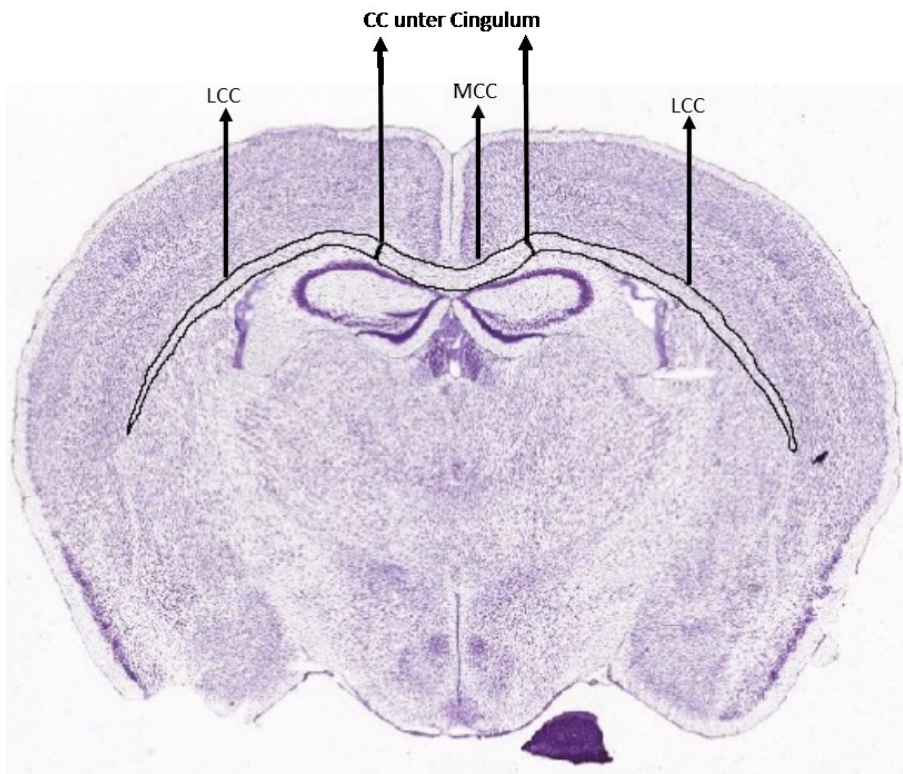


Abbildung 7: Darstellung der in der Immunfluoreszenz untersuchten Region von Interesse auf Höhe des rostralen Hippocampus, Region 265.

(Abkürzungen: ICC= laterales Corpus callosum, CC= Corpus callosum, mCC= mediales Corpus callosum.
Quelle des Hirnschnittes: modifiziert nach Allen Hirn-Atlas.

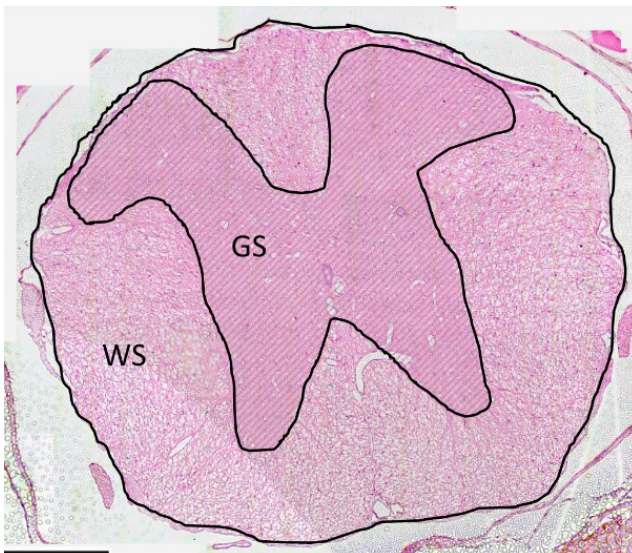


Abbildung 8: Darstellung der immunhistochemisch untersuchten Region von Interesse im Rückenmark.

Als ROI wird die weiße Substanz (WS) definiert. Um die Fläche der ROI zu ermitteln, wird zunächst die Fläche des gesamten Rückenmarks und der grauen Substanz (GS) ermittelt. Anschließend wird die Fläche der GS (schraffierte Fläche) von der Fläche des gesamten Rückenmarks abgezogen.

Rückenmark HE-Färbung eines Kontrolltieres.

(Abkürzungen: GS= graue Substanz, WS= weiße Substanz, ROI = Region von Interesse)

3.7 HÄMATOXYLIN-FÄRBUNG & EOSIN-FÄRBUNG

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine histologische Färbung und wurde in dieser Studie genutzt, um in immunhistochemisch markierten Rückenmarksschnitten die Abgrenzung der weißen von der grauen Substanz zu erleichtern. Hämatoxylin hilft bei der Erkennung basophiler Zellstrukturen wie Zellkernen und färbt diese Strukturen blau. Eosin färbt acidophile Zellstrukturen, wie Zytoplasma, rot. Die HE-Färbung half bei immunhistochemischen Markierungen bei der Identifizierung von Zellen (Zellkern vorhanden) und Artefakten beziehungsweise nicht-zellulären Strukturen (kein Zellkern vorhanden). Die Schritte der HE-Färbung sind im Arbeitsprotokoll der immunhistochemischen Markierung enthalten (siehe Tab. 9, Schritt 17.1 – 17.3). Im Anschluss an die HE-Färbung wurden die Schnitte entwässert und gemäß Tabelle 9 unter einem Deckglas mit DePex eingedeckt.

3.8 IMMUNHISTOCHEMIE

3.8.1 PRINZIP IMMUNHISTOCHEMISCHER MARKIERUNGEN

Die Immunhistochemische Markierung ist ein indirektes Nachweisverfahren und nutzt die spezifische Bindung von Antigen und Antikörper für den Nachweis von verschiedenen Proteinen oder Antigenen im Gewebe. In einem ersten Schritt bindet ein Primärantikörper spezifisch an ein gesuchtes Antigen im Gewebe. Daraufhin kann ein sekundärer Antikörper an den Primärantikörper spezifisch binden. Da in diesem Schritt eine mehrfache Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper möglich ist, resultiert eine Amplifikation des Signals. Der sekundäre Antikörper ist an Biotin gekoppelt. Dadurch kann im nächsten Schritt ein Avidin-Biotin-Enzym-Komplex, durch die hohe Affinität von Avidin zu Biotin, an den sekundären Antikörper binden. In dem Komplex ist außerdem Meerrettichperoxidase enthalten. Diese kann durch die Anwesenheit von H_2O_2 phenolisches DAB-Substrat in dessen unlösliche Form katalysieren. Resultat dieser Reaktion ist das Ausfallen eines bräunlichen Präzipitats. Das Signal wird umso stärker, je mehr Antigen im Gewebe vorhanden ist, an welches primäre Antikörper binden können. Desweiteren kann darauffolgend entsprechend mehr sekundärer Antikörper und daraufhin mehr Avidin-Biotin-Enzym-Komplex binden. Das Signal verstärkt sich somit in Abhängigkeit von vorhandenem Antigen im Gewebe.

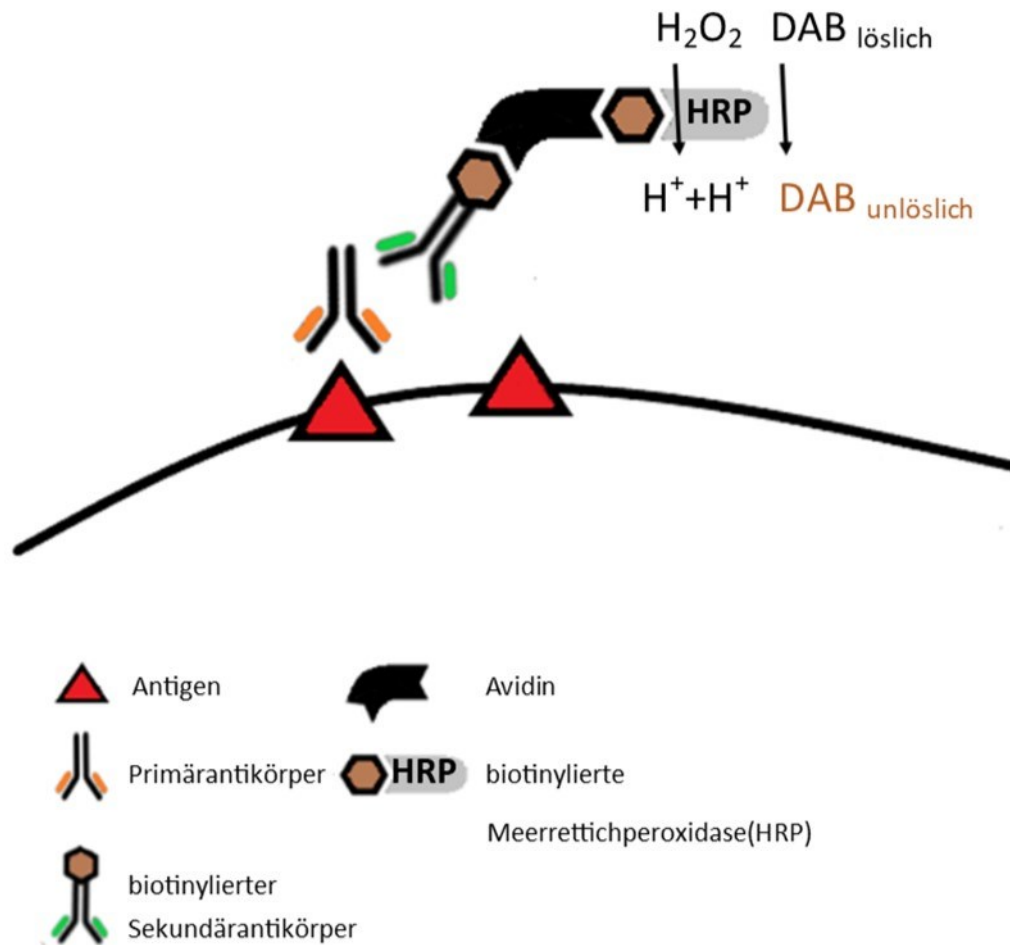


Abbildung 9: Prinzip einer immunhistochemischen Markierung nach der ABC-Methode

(Abkürzungen: H_2O_2 = Wasserstoffperoxid, HRP= biotinylierte Meerrettichperoxidase, H^+ = Wasserstoff, DAB= 3,3'-Diaminobenzidin)

Es existieren verschiedene Fehlerquellen bei einer immunhistochemischen Markierung. Grund für ein verfälschtes Markierungsmuster können unspezifische Bindungen sein. Unspezifische Bindungen können sowohl von primären als auch von sekundären Antikörpern eingegangen werden. Häufig handelt es sich um Immunglobulin(Ig)-ähnliche Proteine im Gewebe, die vom sekundären Antikörper gebunden werden und zu einem unspezifischen Signal führen. Um dem vorzubeugen, bedarf es einer Vorbehandlung der Schnitte. Dazu wird vor dem Auftragen des primären und sekundären Antikörpers ein Normalserum verwendet. Dieses entstammt der Spezies, aus der auch der sekundäre Antikörper gewonnen wurde. Dieser Schritt wird als „Blocken“ bezeichnet, da Bindungsstellen der Ig-ähnlichen Proteine so von Antikörpern des Normalserums vorzeitig maskiert werden und somit nicht mehr für Bindungen der verwendeten Antikörper zugänglich sind. Ein unspezifisches Signal kann so verringert werden. Zusätzlich zu diesem Schritt wird durch das Hinzufügen von Negativkontrollen das Vorliegen

von unspezifischen Bindungen untersucht. Negativkontrollen werden in die Markierungsreihe aufgenommen und durchlaufen alle Schritte mit der Ausnahme, dass auf die Zugabe von primärem Antikörper verzichtet wird. Ein weiterer Grund für unspezifische Signale ist eine endogene Peroxidaseaktivität im untersuchten Gewebe. Durch dieses intrinsische Enzym, welches im Gewebe in unterschiedlicher Dichte ubiquitär vorhanden ist, kann ebenfalls die Reaktion von löslichem DAB-Substrat zum unlöslichen, bräunlichen Präzipitat katalysiert werden. Das dadurch hervorgerufene unspezifische Signal führt zu einer starken Beeinträchtigung des Markierungsmusters. Durch die Inkubation der Schnitte unter minimalem Lichteinfall für 30 Minuten in 0,35% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird die endogene Peroxidase gesättigt, die Enzymaktivität gemindert und unspezifische Hintergrundsignale gesenkt.

3.8.2 DURCHFÜHRUNG IMMUNHISTOCHEMISCHER MARKIERUNGEN

Alle Objektträger der Markierungsreihe wurden nach demselben Arbeitsprotokoll und zur selben Zeit markiert, um einheitliche Ergebnisse zu gewährleisten. Der erste Schritt jeder Markierungsreihe beinhaltet die Entparaffinierung. Dazu wurden die Schnitte zunächst in Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (vgl. Tab. 5).

Tabelle 5: Entparaffinierung und Rehydrierung

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

Das Einbetten und Fixieren des Gewebes ruft Quervernetzungen, sogenannte Maskierungen, hervor, die freie Antigene binden können und das Markierungsergebnis so verschlechtern. Aus diesem Grund erfolgte bei einigen immunhistochemischen Markierungen nach der Deparaffinierung und Rehydrierung die Demaskierung mit Hilfe des „HIER“ (engl. „heat induced epitope retrieval“). Bindungsstellen der Antigene wurden somit wieder freigelegt. Die Schnitte wurden für 10 Minuten in einer handelsüblichen Mikrowelle in einer gefüllten Küvette mit Tris(hydroxy-

methyl)aminomethan/Ethylendiamintetraessigsäure (Tris/EDTA)-Puffer gekocht. Im Anschluss erfolgte die Abkühlung in einem kalten Wasserbad, bis die Pufferlösung Raumtemperatur erreichte. Die Schnitte wurden unter leichtem Schütteln in PBS (1x) in Glasküvetten gewaschen. Das Waschen wurde zwischen allen Inkubationsschritten, bis auf den Arbeitsschritt nach dem „Blocken“, wiederholt. Es wurde in allen Schritten 100 µl pro Objektträger aufgetragen.

Nach dem Waschen wurden alle Objektträger in eine feuchte Kammer überführt und Blockserum aufgetragen. Es folgt eine Inkubationszeit bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurde das Serum wieder entfernt und der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (vgl. Tab. 6) vorbereitet. Primärantikörper wurde verdünnt in Normalserum aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Ausnahme bildet die Negativkontrolle. Hier wurde das Blockserum auf den Schnitten belassen und kein Primärantikörper aufgetragen.

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper bei immunhistochemischen Markierungen

Antigen	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Demaskierung	Wirt
PLP	BioRad	MCA839G	1:5000	Keine	Maus
IBA-1	Wako	019-19741	1:5000	Tris/EDTA	Kaninchen
ANXA1	Abcam	ab33068	1:1000	Tris/EDTA	Kaninchen

Am Folgetag wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen und für 30 Minuten in 0,35% H₂O₂ inkubiert. Da es bei H₂O₂ schnell zu einem lichtinduzierten Zerfall kommt, geschah dieser Schritt unter möglichst geringer Lichtexposition und zusätzlichem gleichzeitigem Schütteln. Der Sekundärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung vorbereitet (vgl. Tab. 7) und auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper bei immunhistochemischen Markierungen

Antikörper	Kopplung	Wirt	Firma	Bestellnummer	Verdünnung
Ziege-Anti-Maus	Biotin	Ziege	Vector	BA 9200	1:250
Ziege-Anti-Kaninchen	Biotin	Ziege	Vector	BA 1000	1:250

Der Avidin-Biotin-Enzym-Komplexes wurde aus Reagenz A (Avidin) und Reagenz B (biotinylierte HRP) angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten, in welcher es zur Komplexbildung beider Reagenzien kommt, erfolgte das Pipettieren auf die Objektträger. Die Inkubationszeit betrug eine weitere Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Der DAB-Komplex wurde für 10 Minuten auf den Schnitten belassen und die Schnitte daraufhin für wenige Sekunden in Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte in einer Küvette mit destilliertem Wasser gesammelt und für weitere 5 Minuten dort belassen.

Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (vgl. Tab. 9) und in Xylol überführt. Das Eindecken erfolgte mit Depex und die Schnitte wurden über Nacht getrocknet.

Tabelle 8: Entwässerung

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

Tabelle 9: Arbeitsprotokoll einer immunhistochemischen Markierung

Schritt	Ablauf
1	Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (vgl. Tab. 5)
2	Demaskierung („HIER“): zehnmütiges Kochen der Schnitte in Tris/EDTA-Puffer
3	Abkühlung der Objektträger auf Raumtemperatur in einem kalten Wasserbad
4	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
5	„Blocken“ mit 5% Normalserum für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
6	Normalserum abkippen
7	Applikation des Primärantikörpers bzw. des Blockserum (1) und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
8	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
9	30 Minuten Inkubation in 0,35% H ₂ O ₂ unter leichtem Schütteln im Dunkeln
10	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
11	Applikation des Sekundärantikörpers und Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
12	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
13	Applikation des Avidin-Biotin-Enzym-Komplexes und Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
14	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
15	Applikation des DAB-Komplexes zur Visualisierung und Inkubation für 10 Minuten unter einem Abzug
16	10 Sekunden Spülen in Leitungswasser
17	5 Minuten Spülen in destilliertem Wasser
17.1	Je nach Hintergrundsignal: Hämatoxylin (H)-Färbung, 15 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung und anschließend fünf Sekunden in HCl-Alkohol eintauchen
17.2	5 Minuten unter fließendem Leitungswasser inkubieren („bläuen“)
18	Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (vgl. Tabelle 8)
19	Eindecken der Objektträger mit Depex und Deckgläsern unter dem Abzug
20	Trocknen der eingedeckten Schnitte unter dem Abzug

17.1-17.2 = fakultative Arbeitsschritte

3.9 IMMUNFLUORESCENZ

3.9.1 PRINZIP VON IMMUNFLUORESCENZ-DOPPELMARKIERUNGEN

Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung ist ebenfalls eine indirekte Nachweismethode und ähnelt der immunhistochemischen Markierung in vielen Schritten. Mithilfe dieser Methode kann mehr als ein Protein oder Antigen im Gewebe nachgewiesen werden. Es können verschieden Primärantikörper aus verschiedenen Spezies gleichzeitig spezifische Bindungen mit den gesuchten Antigenen eingehen. Fluoreszenzfarbstoffe sind an sekundäre Antikörper gekoppelt und binden spezifisch an die primären Antikörper. Die Zellkerne im untersuchten Gewebe wurden mit fluoreszierendem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) markiert. Mit einem Epifluoreszenzmikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden die Farbstoffe angeregt. Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat eine bestimmte Anregungswellenlänge. Somit kann eine spezifische Bindung des sekundären Antikörpers als Signal in Form von emittiertem Licht in der Emissionswellenlänge des Farbstoffes identifiziert werden. Demnach ist das Signal stärker, je mehr sekundärer Antikörper an primärem Antikörper gebunden wurde. Ebenso ist das Signal stärker, je mehr primärer Antikörper an Antigene binden kann und je mehr Antigene im Gewebe vorliegen. Das gesamte Prinzip ist in Abbildung 10 dargestellt.

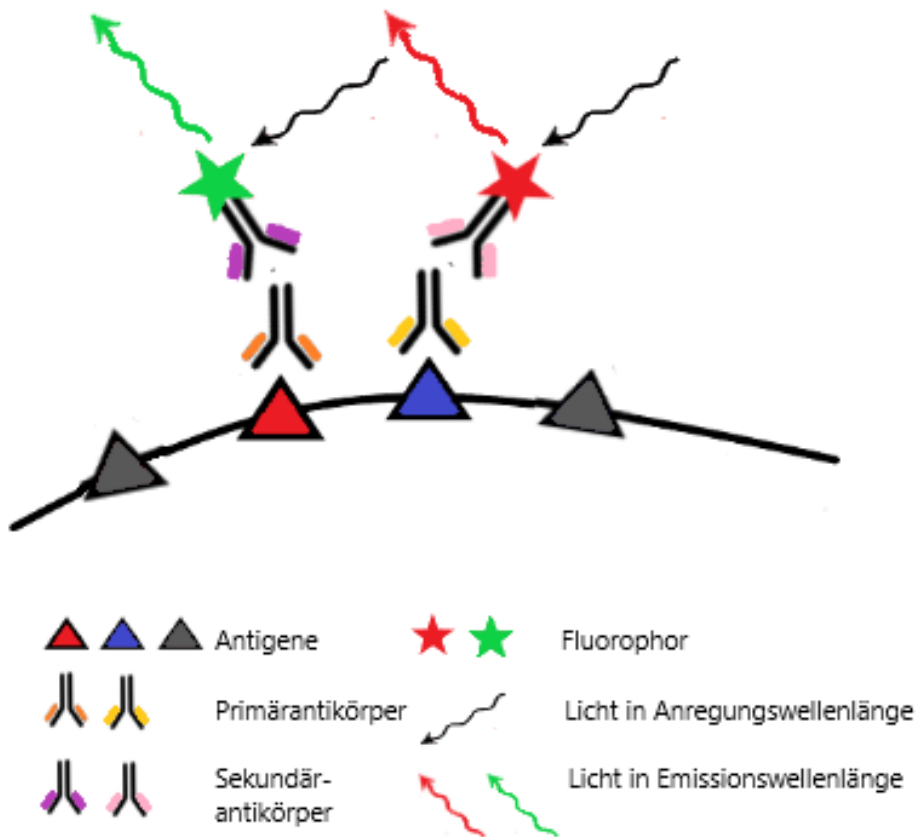


Abbildung 10: Prinzip einer immunfluoreszenz-Markierung

3.9.2 DURCHFÜHRUNG VON IMMUNFLUORESCENZ-DOPPELMARKIERUNGEN

Die ersten Schritte bis zur Zugabe des primären Antikörpers gleichen denen der immunhistochemischen Markierung (vgl. Tab. 9, Schritt 1-6). Für das „Blocken“ wurde ebenfalls das Normalserum der Spezies verwendet, der auch der sekundäre Antikörper entstammt. Nach dem Blockieren der Ig-ähnlichen Proteine wurden entsprechende Verdünnungen der primären Antikörper (vgl. Tab. 10) in Normalserum vorbereitet und auf die Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper bei Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Anti-gen	Firma	Bestellnum-mer	Verdünnung	Demaskie-rung	Wirt
ANXA1	Abcam	ab214486	1:200	Tris/EDTA	Maus
CD3	Millipore	MABN50	1:100	Tris/EDTA	Maus
CD45R	invitrogen	14-0452-82	1:400	Tris/EDTA	Ratte
PCNA	Abcam	ab29	1:10000	Tris/EDTA	Maus
IBA1	Sigma-Aldrich	SAB2500041-100UG	1:200	Tris/EDTA	Ziege
CD44	Thermo Fisher	MA4405	1:1000	Tris/EDTA	Ratte
Ly6G	biolegend	(B265459)	1:250	Tris/EDTA	Ratte

Der sekundäre Antikörper (vgl. Tab. 11) wurde in Blockserum verdünnt, auf die Objektträger aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper bei Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

Antikör-per	Kopplung	Wirt	Firma	Bestellnummer	Verdünnung
Esel-Anti-Maus	AlexaFluor 594	Esel	Invitrogen	A21203	1:250
Esel-Anti-Kaninchen	AlexaFluor 488	Esel	Abcam	ab150065	1:250
Esel-anti-Ratte	AlexaFluor 594	Esel	abcam	ab150156	1:250
Esel-Anti-Kaninchen	AlexaFluor 488	Esel	Abcam	ab150065	1:250
Esel-Anti-Ziege	Cy3	Esel	Dianova	705-165-147	1:250

Floureszierende Farbstoffe sind sehr lichtempfindlich. Licht hat ein Signalinderung des Fluorophors zur Folge. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Arbeitsschritte unter verminderter

Lichtexposition durchgeführt. Die Schnitte wurden wiederum in PBS (1x) in dreimaliger Wiederholung für jeweils 5 Minuten gewaschen und anschließend mit dem wässrigen Eindeckmedium Immu-Mount™ (mit DAPI-Arbeitslösung (5µg/ml) versetzt) eingedeckt. Durch die Arbeitslösung wurden zusätzlich die Zellkerne im Gewebe markiert. Anschließend wurden die Schnitte kühl (4°C) und dunkel gelagert um ein mögliches Ausbleichen zu verhindern. Die Auswertung erfolgte zeitnah um ein zeitabhängiges Ausbleichen zu verringern.

Tabelle 12: Arbeitsprotokoll einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

Schritt	Ablauf
1	Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (vgl. Tab. 5)
2	Demaskierung („HIER“): zehnmütiges Kochen der Schnitte in Tris/EDTA-Puffer
3	Abkühlung der Objektträger auf Raumtemperatur in einem kalten Wasserbad
4	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
5	„Blocken“ mit 5% Normalserum für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
6	Normalserum abkippen
7	Applikation der Primärantikörper und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
8	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
9	Applikation der Sekundärantikörper und Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
10	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
11	Applikation der DAPI Lösung (5µg/ml) und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
12	3x5 Minuten Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
13	1 Minute Spülen in destilliertem Wasser
14	Eindecken der Schnitte mit Immu-Mount™
15	Lagerung bei 4°C in dunkler Umgebung

■ = Arbeitsschritte unter minimalem Lichteinfall

3.10 AUSWERTUNG


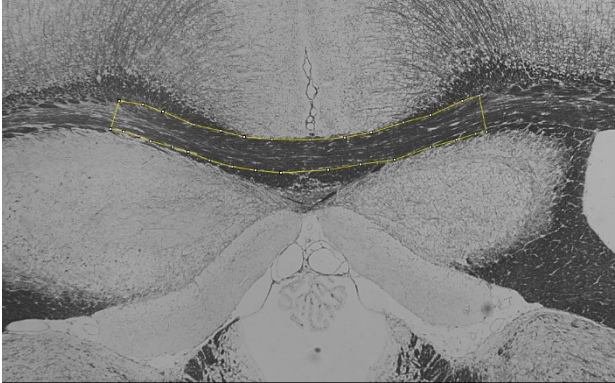
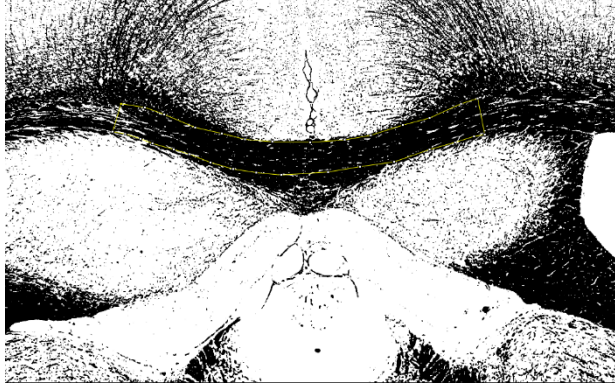
3.10.1 QUANTIFIZIERUNG DER OPTISCHEN DICHTEN

Die Schnitte wurden mit Hilfe eines am Mikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) installierten Kamerasystem (DMC 6200, Leica, Wetzlar, Deutschland) in Region 215 und 265 fotografiert. Nach Optimierung aller Einstellungen für den ersten Schnitt, wurden diese Einstellungen für alle weiteren Schnitte übernommen und nicht mehr verändert. Auf diese Weise kann die Vergleichbarkeit gewährleistet werden.

Durch die Software „ImageJ“ (Version 1.52n für Windows, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte. Nach Importierung der Bilder wurde zunächst die definierte ROI durch die „polygonale Auswahl“ exakt definiert. Farbige Bilder wurden in ein Grau-Format umgewandelt. Dies erfolgte durch die Umwandlung des Bildtyps in „8-bit-greyscale“ (8-Bit-Graustufen).

Um die densitometrische Messung für alle Bilder zu vereinheitlichen, wurde im Vorfeld ein Grenzwert bestimmt, der klar definiert, welcher Grauton eines Pixels während der optischen Dichtemessung als „schwarz“ oder „weiß“ dargestellt wird. Dieser Grenzwert, auch als „Threshold“ bezeichnet, wurde im Vorfeld ausgesucht und für alle Schnitte einer Markierungsreihe festgelegt. Bei der anti-PLP-Markierung wurde der Threshold „MaxEntropy“ und bei der anti-IBA1-Markierung der Threshold „Default“ verwendet. Im Anschluss wurden die Bilder in ein Schwarz-Weiß-Format (binäres Format) umgewandelt und die relative Dichte, also die „Area fraction“ automatisch bestimmt. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Arbeitsschritte einer Dichtemessung mittels Image

ImageJ-Funktion	Abbildung	Beschreibung
„polygonale Auswahl“		<p>Die Eingrenzung der untersuchten Regio erfolgte bei jedem Schnitt manuell. (gelbe Umrandung)</p>
„Image“ „Type“ „8-bit“		<p>Es erfolgte die Umwandlung des Bildes in ein Grau-Format.</p>
„Image“ „Adjust“ „Threshold“		<p>Jedes Bild wurde in ein binäres Format umgewandelt und mithilfe des ausgewählten Thresholds die relative Dichte schwarzer Pixel der ROI gemessen. Die Angabe erfolgte in % der ROI.</p>

3.10.2 QUANTIFIZIERUNG DER ZELL- UND PARTIKELDICHTEN

Die histochemischen Markierungen, die ein zuverlässiges manuelles Auszählen von Zellen, Partikeln oder Sphäroiden ermöglichten, wurden quantifiziert. Von jedem Hirnschnitt wurden Fotos an einem manuellen Scanning-Mikroskop erstellt (Mikroskop: Nikon Eclipse E200, Kamera: Basler acA1920-40uc). Die ROI der Schnitte wurde am Mikroskop großzügig abgefahren. Mithilfe der Software „Manual-WS-Imaging 2019“ (Version 2019b) von Microvisioner wurden an einem Computer automatisch zusammenhängende Aufnahme erstellt. Die Bilder wurden immer unter denselben Einstellungen am Mikroskop erzeugt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Auszählung spezifisch markierter Zellen erfolgte mit dem Programm „ViewPoint“ (Version 1.0.0.9628) von PerciPoint. Die jeweiligen Aufnahmen wurden verblindet importiert, indem der Dateiname zu einer zufälligen Zahl geändert wurde. Nach Umrandung der exakten ROI unter Verwendung eines Markierungs-Werkzeugs, wurden alle spezifisch markierten Zellen, Partikel oder Sphäroide innerhalb der ROI manuell markiert. Im Anschluss wurde die Anzahl markierter Zellen festgestellt und die Fläche der ROI exportiert. Auf diese Weise konnte eine Zelldichte pro mm^2 ermittelt werden. Pro Objektträger wurden zwei Hirnschnitte desselben Tieres auf diese Weise verblindet ausgewertet. Nach Auflösung der Verblindung, wurden aus den Zelldichten beider Hirnschnitte eines Tieres der Mittelwert_{Tier} gebildet. Aus allen Mittelwerten_{Tier} einer Experimentgruppe wurde der Mittelwert_{Gruppe} errechnet und dieser mit anderen Mittelwerten_{Gruppe} verglichen.

3.10.3 IMMUNFLUORESCENZ-DOPPELMARKIERUNGEN

Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung kam in dieser Arbeit zum Einsatz, um mögliche Kollokalisationen von ANXA1⁺-Zellen aufzudecken. Für die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen wurden am Epifluoreszenzmikroskop von jedem Hirnschnitt in allen Kanälen (blau: DAPI, rot: CD3, IBA1, PCNA, CD45R, CD44 und Ly6G, grün: ANXA1) Aufnahmen der Region 265 angefertigt und gespeichert. Die Einstellungen aller Kanäle wurden vorerst am ersten verwendeten Hirnschnitt optimiert und für alle weiteren Schnitte beibehalten. Die Bilder von Hirnschnitten einer Markierungsreihe wurden an einem Tag aufgenommen, um so ein „Ausbleichen“ der Fluoreszenzfarbstoffe mit der Zeit zu verhindern und die Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten. Die Auswertung war für den Experimentator verblindet. Nach Einteilung der exakten ROI wurde die Anzahl der ANXA1⁺-Zellen bestimmt. Zunächst wurden dabei nur Signale im grünen und blauen Kanal betrachtet. Nur Zellen, die einen Zellkern im blauen Kanal und ein Signal im grünen Kanal aufwiesen, wurden als ANXA1⁺ gewertet. Im

Anschluss wurde im roten Kanal überprüft, ob Zellen Doppelmarkierungen aufwiesen. Als doppelmarkiert wurden Zellen gewertet, die sowohl im grünen als auch im roten Kanal ein entsprechendes Signal aufwiesen. Dieses Prinzip wurde für jede Markierungsreihe angewandt. Es folgte die Ermittlung des prozentualen Anteils der doppelmarkierten Zellen aus der Gesamtmenge ANXA1⁺-markierter Zellen. Grundsätzlich wurden pro Objektträger zwei Hirnschnitte ausgewertet und aus den jeweiligen Anteilen ein Mittelwert pro Tier berechnet. Aus diesen Mittelwerten eines Tieres wurde dann ein gesamter Gruppenmittelwert gebildet.

3.10.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG UND GRAPHISCHE DARSTELLUNG

Die statische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte durch die Software „GraphPad Prism“ (Version 8.0.2, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM, Standard Error of the Mean) angegeben. Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant). Die Daten wurden zunächst mithilfe des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Die angewandten statistischen Tests sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben.

4. ERGEBNISSE

4.1 MYELINSCHÄDIGUNG IM CUPRIZONE- UND CUP/EAE-MODELL

Hintergrund: MS ist gekennzeichnet durch demyelinisierende Läsionen im ZNS. In einem ersten Schritt wurde das Ausmaß der Demyelinisierung in den verwendeten Tiermodellen untersucht. Das Myelin-Proteolipid-Protein (PLP) bildet etwa die Hälfte des Gesamtproteins des Myelin im ZNS und eignet sich daher für den immunhistochemischen Nachweis von Myelin [117].

Arbeitshypothese: In den Tiermodellen „Cuprizone“ und „Cup/EAE“ kommt es zu einer Abnahme der Myelinisierung im CC.

Methode: Die immunhistochemische Markierung wurde an insgesamt 19 Objektträgern (OT) durchgeführt (fünf OT Ktrl, fünf OT 5wCup, acht OT Cup/EAE, eine Negativkontrolle (NK)). Die Schnitte wurden mit Anti-PLP markiert und im Anschluss densitometrisch analysiert.

Ergebnis: In den Kontrolltieren zeigt sich eine ausgeprägte Markierung des Myelins des gesamten CC. Die optische Dichte von PLP beträgt $92,51 \pm 2,24[\%]$ im medialen *Corpus callosum* (mCC). Im lateralen *Corpus callosum* (ICC) beträgt die optische Dichte der Gruppe der Kontrolltiere rechts $88,48 \pm 2,05[\%]$ und links $89,66 \pm 3,68[\%]$.

Nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation (5wCup) zeigt sich eine Demyelinisierung durch die Abnahme der optischen Dichte von PLP im mCC. Die optische Dichte von PLP liegt in der 5wCup Gruppe bei $13,28 \pm 10,50[\%]$. Im rechten ICC kann eine Pixeldichte von $70,52 \pm 5,02[\%]$ und im linken ICC von $71,73 \pm 7,41[\%]$ gemessen werden. Die Demyelinisierung ist in den lateralen Anteilen des CC der 5wCup Tiere weniger ausgeprägt, als in deren medialen Anteilen. Im Cup/EAE-Modell zeigen sich in anti-PLP-markierten Hirnschnitten sowohl im ICC (rechts: $77,28 \pm 7,9[\%]$, links: $80,11 \pm 8,15[\%]$) als auch im mCC ($72,21 \pm 10,19[\%]$) eine signifikante Abnahme der optischen Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusammenfassend zeigt sich sowohl im Cuprizone- als auch im Cup/EAE-Modell eine signifikante Abnahme der Myelindichte im medialen und lateralen CC. Die Immunhistochemische Markierung zeigt, dass insbesondere bei den Tieren der 5wCup Gruppe im mCC ein Myelinschaden, gekennzeichnet durch eine signifikante Abnahme der optischen Dichte auftritt (s. Abb. 11).

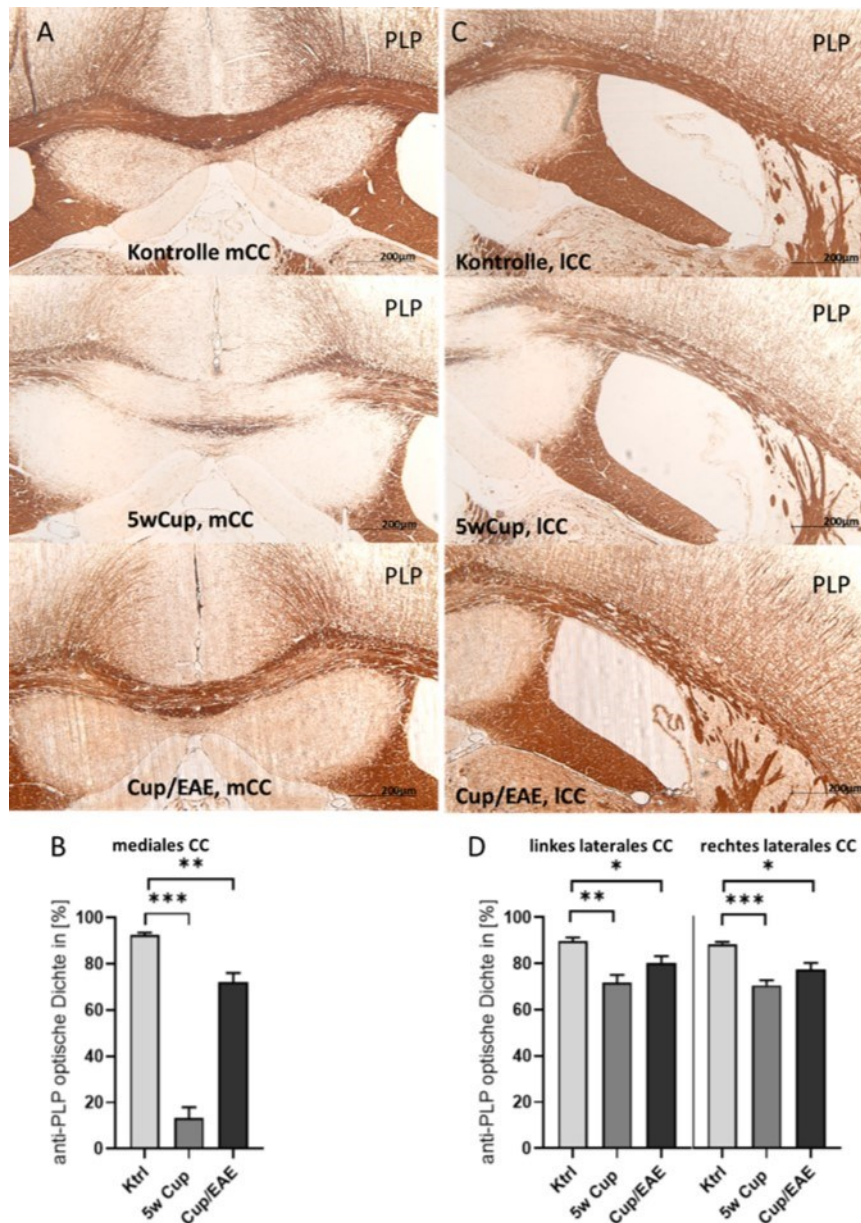


Abbildung 11: Darstellung des Ausmaßes der Demyelinisierung im Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus.

(A) stellt repräsentative Ausschnitte des mCC eines unbehandelten Kontrolltieres (oben), nach 5wCup-Intoxikation (Mitte) und im Cup/EAE-Modell (unten) dar. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der optischen Dichte nach 5wCup-Intoxikation im Vergleich zu Kontrolltieren. Auch in der Cup/EAE Gruppe liegt eine verminderte optische Dichte vor. In (B) ist die densitometrische Analyse des mCC graphisch dargestellt. (C) zeigt repräsentative Ausschnitte des ICC eines Kontrolltieres (oben), nach 5wCup-Intoxikation (mitte) sowie nach Cup/EAE (unten). Eine Abnahme der optischen Dichte bei 5wCup und Cup/EAE stellt sich dar. (D) zeigt die graphische Darstellung der densitometrischen Analyse des rechten und linken ICC. Unterschiede zwischen Kontroll- und Experimentgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. Kontrollgruppe und 5wCup n=5, Cup/EAE-Gruppe n=7. Maßstab: 200µm.

(Abkürzungen: CC=Corpus callosum, mCC= mediales Corpus callosum, ICC= laterales Corpus callosum, 5wCup= 5 Wochen, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenenzephalomyelitis, Ktrl= Kontrolltier)

4.2 MIKROGLIAZELLDICHTE IM CUPRIZONE- UND CUP/EAE-MODELL

Hintergrund: Die Mikrogliose stellt eine Dichtezunahme und Aktivierung von Mikrogliazellen im ZNS dar. Häufig findet sich eine Dichtezunahme aktivierter Mikrogliazellen angrenzend an MS-Läsionen [118, 119]. Gekennzeichnet wird diese Mikrogliazellaktivierung durch eine charakteristische Vergrößerung des Zellkörpers von Mikrogliazellen sowie den Rückzug von Zellfortsätzen [18]. Die verwendeten Tiermodelle wurden auf das Vorhandensein und auf das Ausmaß der Mikrogliose untersucht. Das ionisierte Kalzium-bindende Adaptermolekül 1 (IBA1) ist ein Mikroglia- und Makrophagen-spezifisches Kalzium-bindendes Protein, das an der Membranaufwirbelung und Phagozytose in aktivierten Mikroglia beteiligt ist und eine Visualisierung von Mikrogliazellen und Makrophagen in verschiedenen Spezies ermöglicht [120].

Arbeitshypothese: Bedingt durch die Cuprizone-Intoxikation und EAE Immunreaktion kommt es zu einer Dichtezunahme von Mikrogliazellen im *Corpus callosum* der Hirne in den verwendeten Tiermodelle (5wCup, Cup/EAE).

Methode: Hirnschnitte der Region 265 wurden mit anti-IBA1 immunhistochemisch markiert und anschließend ausgewertet (fünf OT Ktrl, fünf OT 5wCup, acht OT Cup/EAE, eine NK).

Ergebnis: In Kontrolltieren liegt die optische Dichte der IBA1⁺ im mCC im Mittel bei 6,19%. Die Dichte IBA1⁺ Zellen liegt im ICC rechts bei 6,74% und links bei 9,47%. Bei den 5wCup intoxikierten Mäusen war die optische Dichte signifikant erhöht. Die gemessene Dichte beträgt im mCC 62,86%, im ICC rechts 21,41% und links 19,86%. Im Cup/EAE kann dieser Anstieg der optischen Dichte von IBA1 auch im mCC auf 35,04% und im ICC rechts auf 32,67% und links auf 32,28% festgestellt werden. Zusammenfassend kann eine Zunahme der optischen Dichte im CC von 5wCup und Cup/EAE Mäusen beobachtet werden. Das Ergebnis der Markierung bestätigt die Hypothese.

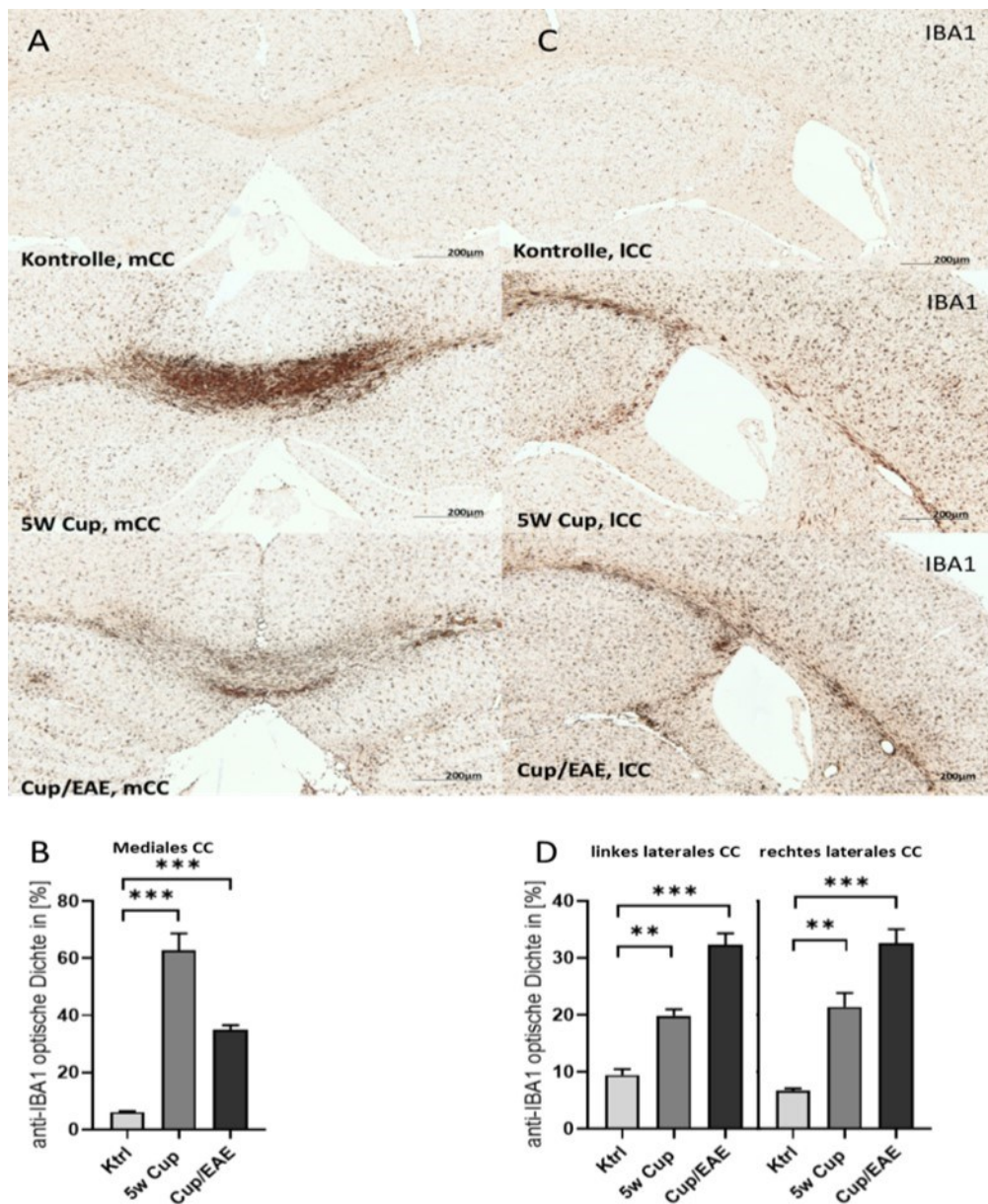


Abbildung 12: Darstellung des Ausmaßes der Mikrogliose im *Corpus callosum* auf Höhe des rostralen Hippocampus.

(A) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt des mCC eines Kontrolltiers (oben). In den Gruppen der 5wCup Tiere (Mitte) und des Cup/EAE (unten) Modells kommt es zu einem signifikanten Anstieg der optischen Dichte der anti-IBA1-Markierung. In (B) wird die densitometrische Analyse des mCC graphisch dargestellt. (C) zeigt das ICC eines Kontrolltieres (oben) und eine Zunahme der optischen Dichte der 5w- und Cup/EAE-Tiere. (D) zeigt die graphische Darstellung der densitometrischen Analyse des ICC. Im ICC kommt es zu einer signifikanten Zunahme der optischen Dichte bei den 5wCup und Cup/EAE Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren. Unterschiede zwischen Kontroll- und Experimentgruppen wurden mit der Einweg-Varianzanalyse (engl. „one-way ANOVA“) gefolgt vom Dunnett's Test ermittelt. Kontrollgruppe und 5wCup n=5, Cup/EAE-Gruppe n=7. Maßstab: 200µm. (Abkürzungen: CC= Corpus callosum, mCC= mediales Corpus callosum, ICC= laterales Corpus callosum, 5wCup= 5 Wochen Cuprizon, IBA1= ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül 1, Cup= Cuprizon, EAE= Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, Ktrl= Kontrolltier)

4.3 EXPRESSION VON ANNEXIN A1 IM CUP UND CUP/EAE HIRN REGION 265

Hintergrund: ANXA1 wurde bereits in neurodegenerativen Tiermodellen nachgewiesen [115]. Da bereits gesteigerte ANXA1 Expression im Zusammenhang mit Inflammationen nachgewiesen werden konnten [115], wird das Auftreten einer gesteigerten Expression von ANXA1 auch in neurodegenerativen und inflammatorischen Tiermodellen, wie dem Cup-, EAE- und dem Cup/EAE-Modell, erwartet.

Arbeitshypothese: In den verwendeten Tiermodellen liegen erhöhte ANXA1-Expressionen im Vergleich zu Kontrolltieren vor.

Methode: Zunächst wurden erste Anti-ANXA1-Testmarkierungen durchgeführt, um eine ANXA1 Expression in Hirn und Milz nachzuweisen. Nach erfolgreichem Nachweis eines zellulär/zytoplasmatischem Markierungsmuster wurden weitere immunhistochemische Markierungen durchgeführt (fünf OT Ktrl, fünf OT 5wCup, acht OT Cup/EAE, eine NK). Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung durch manuelle Zählung ANXA1-positiver Zellen und Analyse der Ergebnisse.

Ergebnis: In den Kontrolltieren zeigen sich nur wenige ANXA1⁺-Zellen (im gesamten *Corpus callosum* mit einem Mittelwert von $0,45 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2 \pm 0,63$, im medialen *Corpus callosum* mit $1,11 \pm 1,62 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2$ und im ICC mit $0,23 \pm 0,31 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2$). Die optische Dichte ANXA1⁺-Zellen ist in der Gruppe der 5wCup Tiere nicht signifikant erhöht. Der Mittelwert beträgt $1,45 \pm 1,34 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2$ im gesamten CC, $1,52 \pm 1,53 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2$ im mCC und $0,54 \pm 0,41 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2$ im ICC. Im Cup/EAE Modell kommt es zu einer signifikanten Zunahme der ANXA1⁺-Zellen. Der Mittelwert beträgt $30,50 \pm 18,73 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2$ im gesamten, $10,58 \pm 8,10 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2$ im mCC und $37,52 \pm 24,81 \text{ ANXA1}^+/\text{mm}^2$ im ICC. Auffällig ist ein sowohl zytoplasmatisches als auch kombiniert zytoplasmatisch und nukleäres Markierungsmuster. Eine vermehrte ANXA1-Expression zeigt sich in der Nähe von Gefäßanschnitten. Bei allen Tiergruppen zeigen sich ANXA1⁺-Zellen im Ependym des Ventrikels.

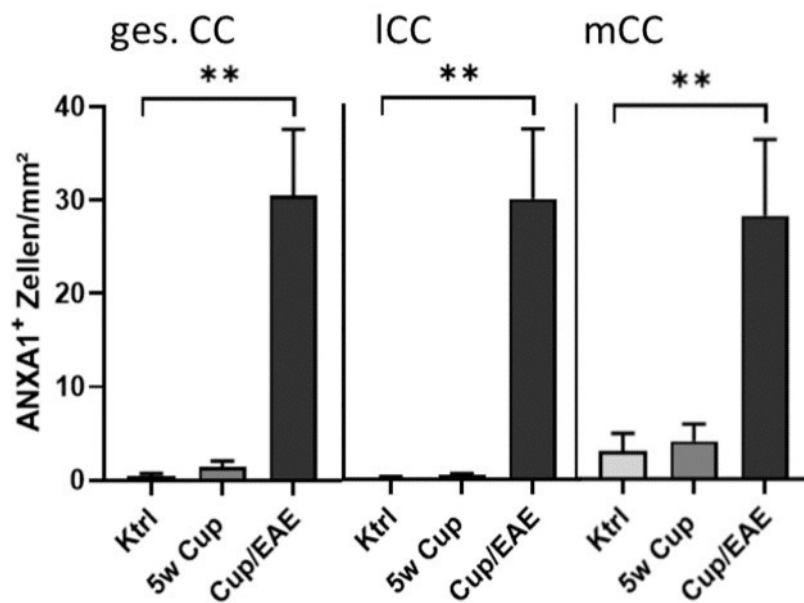


Abbildung 13: Quantifizierung der Annexin A1 exprimierenden Zellen unter Kontrollbedingungen, nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation und im Cup/EAE Modell

Darstellung der Anzahl ANXA1⁺-Zellen im gesamten CC, im ICC und mCC in Region 265. Die Graphik zeigt ein signifikant erhöhtes ANXA1-Signal bei Cup/EAE Tieren. Unterschiede zwischen Kontrollen und Experimentgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test ermittelt. Kontrollgruppe und 5wCup n=5, Cup/EAE-Gruppe n=7.

(Abkürzungen: ges. CC= gesamtes Corpus callosum; ICC = laterales CC; mCC = mediales CC; Ktrl= Kontrolltier, 5W = 5 Wochen, Cup= Cuprizone, EAE= Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis)

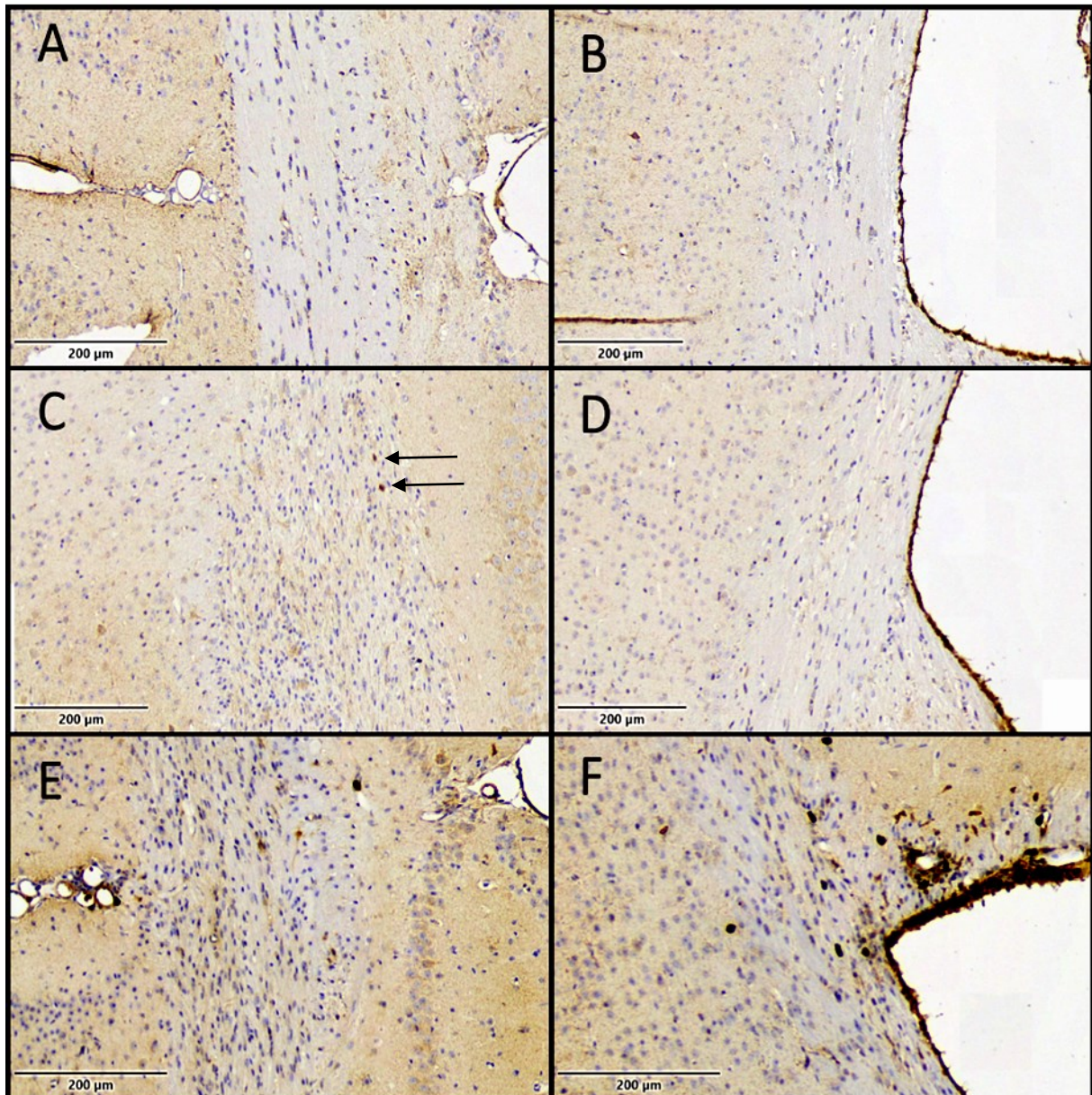


Abbildung 14: Repräsentative Ausschnitte der Annexin A1 Expression im medialen und lateralen *Corpus callosum* bei Kontrolltieren, 5 Wochen Cuprizone und Cup/EAE.

(A) zeigt das mCC und (B) das lCC eines Kontrolltieres. Es können keine ANXA1⁺-Zellen im CC identifiziert werden. (C) stellt das mCC und (D) das lCC eines 5wCup-Tieres dar. Es zeigen sich nur vereinzelte ANXA1⁺-Zellen. (schwarze Pfeile). (E) und (F) stellen Ausschnitte des mCC und lCC des Cup/EAE Modell dar. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der ANXA1⁺-Zellen. Bei allen Tiergruppen finden sich ANXA1⁺-Zellen im Ependym des Ventrikels. Maßstab: 200µm.

(Abkürzungen: 5w= 5 Wochen, CC=Corpus callosum, Cup= Cuprizone, EAE= Experimental autoimmune encephalomyelitis)

4.4 EXPRESSION VON ANNEXIN A1 IN EAE RÜCKENMARK

Hintergrund: EAE führt in immunisierten Mäusen zu einer autoimmun-bedingten Inflammation im ZNS. Es kommt zu einer Einwanderung peripherer Immunzellen in das ZNS [30, 50] und vordergründig zu Inflammation und Läsionen im Rückenmark. Ziel des Versuches ist die Untersuchung der ANXA1-Expression im Rückenmark in einem autoimmunen Tiermodell. In Voruntersuchungen konnte bereits eine erhöhte Expression von ANXA1 im EAE-Modell an Ratten durch Western-Blot nachgewiesen werden [108].

Arbeitshypothese: ANXA1 wird erhöht im EAE-Modell exprimiert im Vergleich zu Kontrolltieren.

Methode: Mithilfe von Immunhistochemischen Markierungen an Rückenmarkschnitten von Mäusen des C57BL/6 Stamms wurde die Dichte von ANXA1⁺-Zellen in unbehandelten Kontrolltieren mit EAE-immunisierten Mäusen verglichen (drei OT Ktrl, sieben OT EAE, eine NK). Um die Quantifizierung und Abgrenzung von weißer und grauer Substanz zu erleichtern, wurde zusätzlich eine HE-Färbung durchgeführt.

Ergebnis: In den Kontrolltieren können nur wenige ANXA1⁺-Zellen nachgewiesen werden ($1,96 \pm 1,19$ ANXA1⁺/mm²). Im EAE-Modell zeigt sich ein signifikanter Anstieg der ANXA1⁺-Zelldichte ($82,82 \pm 46,45$ ANXA1⁺/mm²). Die als positiv gewerteten Zellen zeigen eine sowohl nukleär und zytoplasmatische, als auch nur zytoplasmatische Markierung.

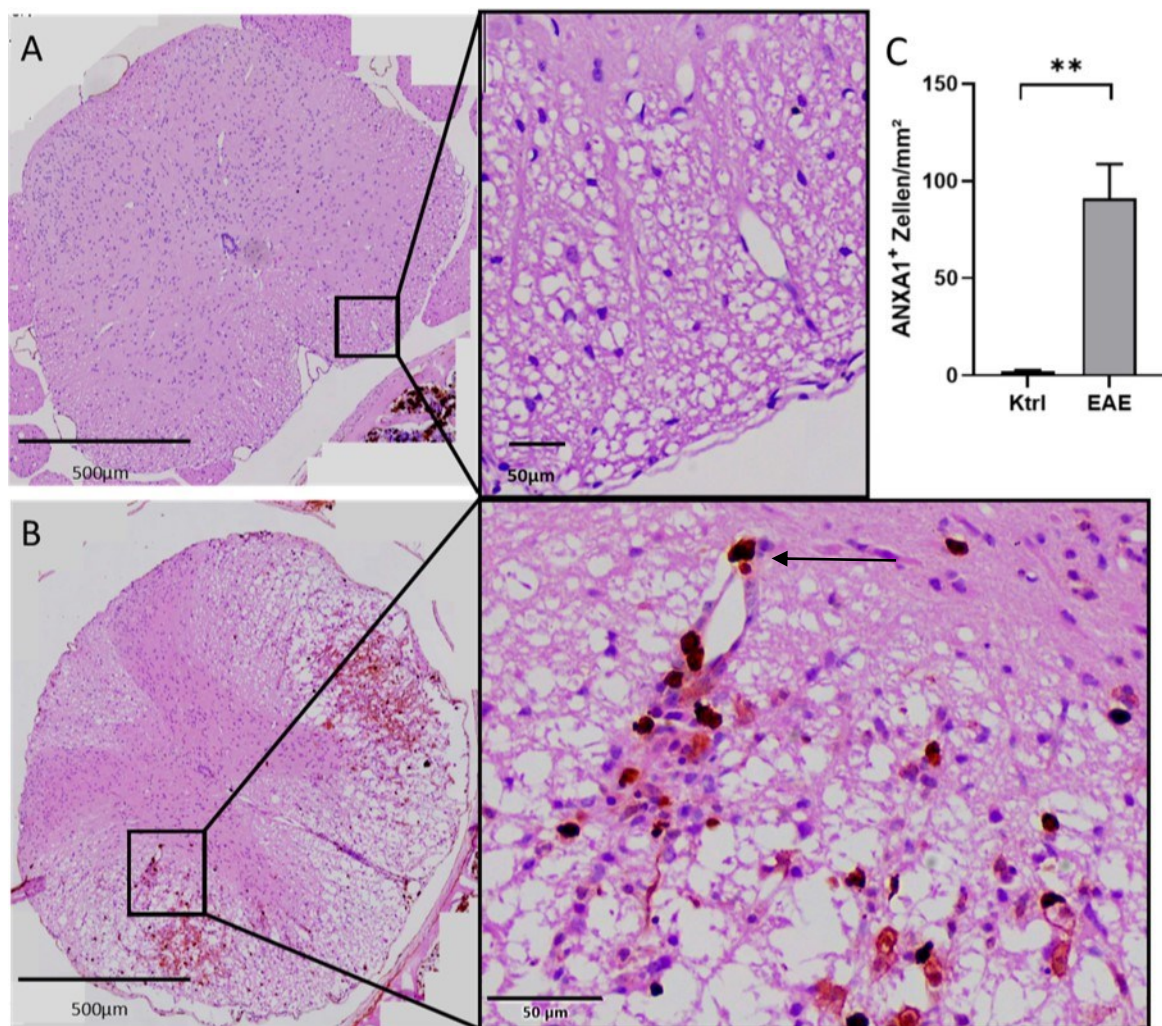


Abbildung 15: Repräsentative Ausschnitte der Annexin A1 und HE-Färbung an unbehandelten Kontrolltieren und Tieren der EAE-Gruppe.

(A) zeigt den Querschnitt des Rückenmarks eines Kontrolltieres. Nur wenige Zellen sind ANXA1⁺. In (B) ist ein repräsentativer Ausschnitt des Rückenmarks eines EAE-Tieres dargestellt. Durch die HE-Färbung ist eine Abgrenzung der weißen Substanz gut möglich. Die weiße Substanz zeigt sich aufgelockert und ist durch einen signifikanten Anstieg ANXA1⁺-Zellen gekennzeichnet. Diese zeigen ein zytoplasmatisches und nukleäres Markierungsmuster (schwarzer Pfeil: exemplarische ANXA1⁺-Zelle) (C) zeigt die graphische Darstellung der Quantifizierung. Untersucht wurde die Anzahl ANXA1⁺-Zellen in der ROI (=weiße Substanz) auf verschiedenen Höhen des Rückenmarks (jeweils 3 Schnitte pro Tier: zervikal, thorakal, lumbal). Der Graph zeigt einen signifikanten Anstieg der Zellmarkierungen im EAE-Modell im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und EAE-Gruppe wurden mit dem Mann-Whitney Test bestimmt. Kontrollgruppe n=3, EAE-Gruppe n=7.

(Abkürzungen: HE-Färbung= Hämatoxylin-Eosin-Färbung, EAE= Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, Ktrl= Kontrolltier, ANXA1= Annexin A1, ROI= Region von Interesse)

4.5 NACHWEIS VON ANNEXIN A1 DURCH IMMUNFLOURESCENZ DOPPELMARKIERUNGEN

4.5.1 EXPRESSION VON ANNEXIN A1 IN ZELLEN DER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT

4.5.1.1 ANNEXIN A1 EXPRESSION IN T-LYMPHOZYTEN

Hintergrund: Es liegt eine erhöhte Zelldichte von ANXA1 im Cup/EAE- und EAE-Modell vor. In den beiden Tiermodellen konnte bereits eine erhöhte T-Lymphozytenexpression nachgewiesen werden [39]. In Studien wurde unter bestimmten Bedingungen eine ANXA1-Expression auf T-Lymphozyten beobachtet [85, 87, 104, 121]. Um eine mögliche Expression von ANXA1 auf T-Lymphozyten nachzuweisen, wurde ein T-Lymphozyten-Marker verwendet, dessen Antikörper an Antigene auf T-Lymphozyten spezifisch bindet. Ein geeigneter Marker für T-Lymphozyten ist CD3.

Arbeitshypothese: ANXA1 wird von T-Lymphozyten exprimiert.

Methode: Um die Arbeitshypothese zu überprüfen, wurde ein Gewebe mit bekannter hoher T-Lymphozyten-Dichte gewählt. In Schnitten von muriner Milz lassen sich T-Lymphozyten nachweisen. Auf diese Weise wurde die spezifische Bindung von CD3-Antikörpern an T-Lymphozyten in muriner Milz kontrolliert. An Cup/EAE Hirn und muriner Milz wurde eine Immunfluoreszenzdoppelmarkierung durchgeführt. Das Gewebe wurde anschließend auf eine Kolo-kalisation ANXA1- und CD3-markierter Zellen untersucht (ein OT murine Milz mit anti-ANXA1 und anti-CD3, ein OT Cup/EAE mit anti-ANXA1, ein OT Cup/EAE-Hirn mit anti-ANXA1 und anti-CD3, zwei Kreuzkontrollen (KK), eine NK).

Ergebnis: CD3, im roten Kanal dargestellt, zeigt ein membranöses Markierungsmuster. ANXA1, zu sehen im grünen Kanal, zeigt das erwartete zellulär/zytoplasmatische Fluoreszenzsignal. Es können keine Doppelmarkierungen nachgewiesen werden. In Abbildung 16 (weißer Pfeil) sind eine CD3⁺- und eine ANXA1⁺-Zelle in scheinbarem Kontakt dargestellt. Es besteht der Verdacht, dass ANXA1 exprimierende Zellen im Kontakt mit CD3 exprimierenden Zellen stehen.

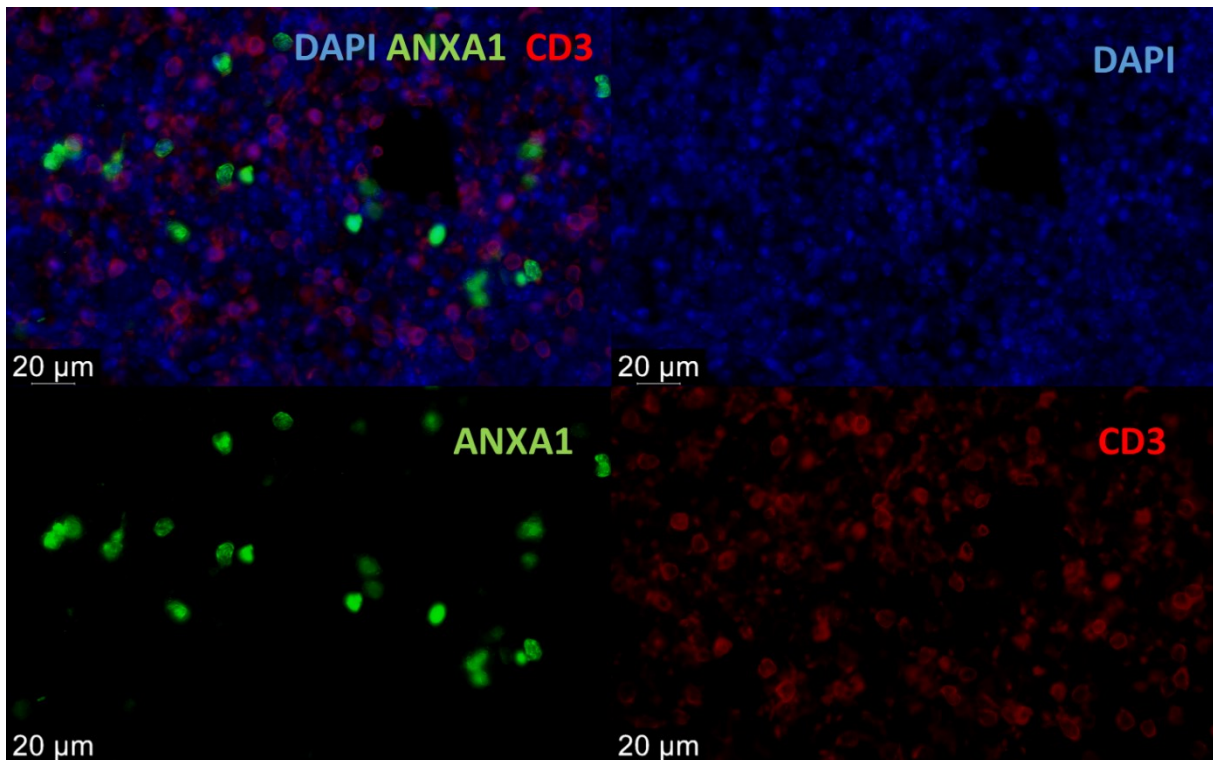


Abbildung 16: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von CD3 und ANXA1 in muriner Milz

Der repräsentative Ausschnitt zeigt eine CD3- (roter Kanal), ANXA1- (grüner Kanal) sowie DAPI-Markierung (blauer Kanal) in muriner Milz. Es finden sich keine doppelmarkierten Zellen.

(Abkürzungen: ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, CD3= *cluster of differentiation 3*, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis)

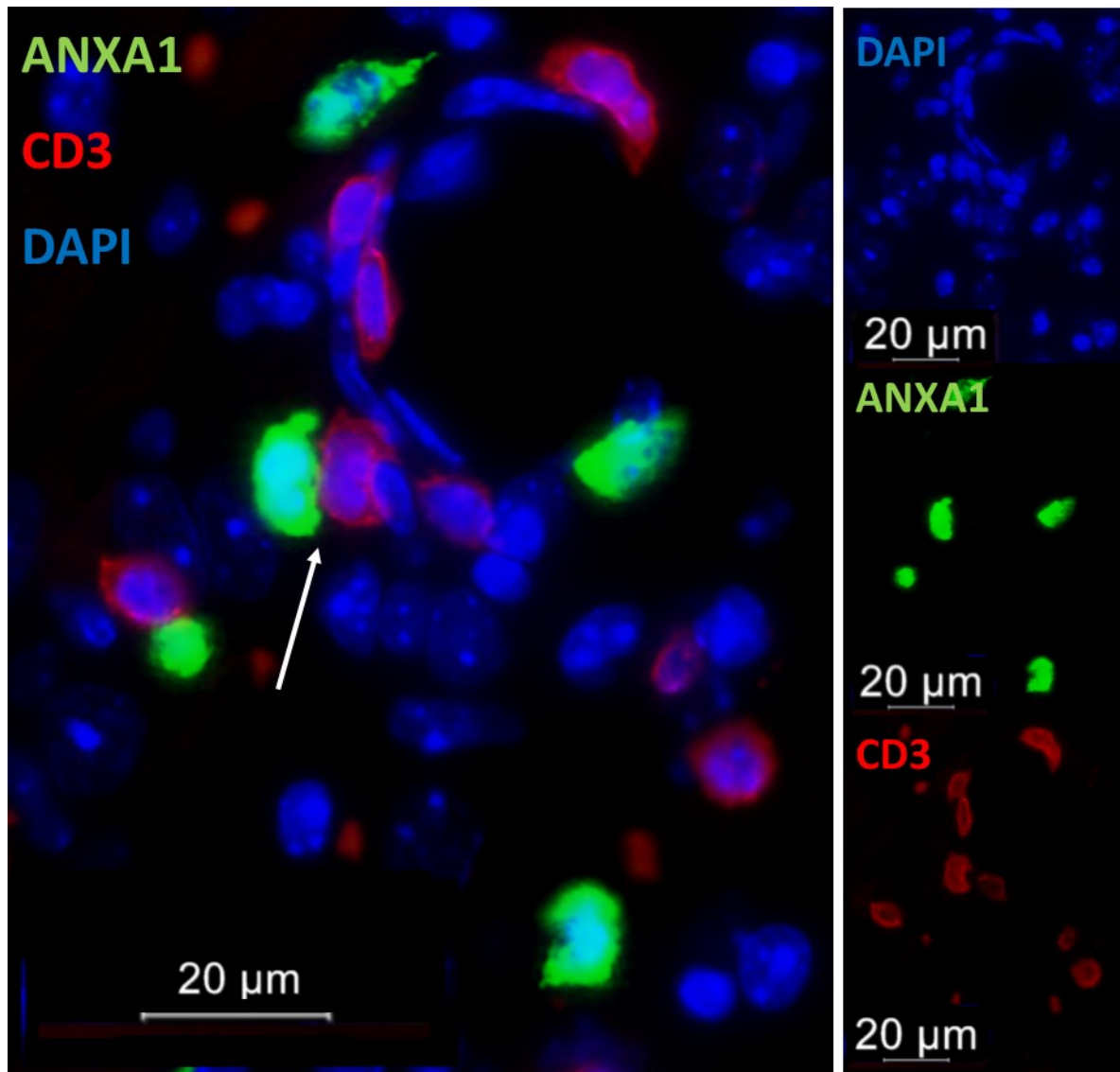


Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von CD3 und ANXA1 in Cup/EAE-Hirn

Der repräsentative Ausschnitt zeigt eine CD3- (roter Kanal), ANXA1- (grüner Kanal) sowie DAPI-Markierung (blauer Kanal) in einem Cup/EAE Hirn. Es finden sich keine doppelmarkierten Zellen.

(Abkürzungen: ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, CD3= *cluster of differentiation 3*, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis)

4.5.1.2 ANNEXIN A1-EXPRESSION IN B-LYMPHOZYTEN

Hintergrund: B-Lymphozyten sind Zellen der adaptiven Immunantwort und befinden sich unter anderem in hoher Dichte im Keimzentrum von Lymphfollikeln. Einige Autoren beschreiben unter bestimmten Bedingungen, wie dem Aktivierungszustand der B-Lymphozyten in autoimmunem Erkrankungen, eine ANXA1-Expression auf B-Lymphozyten [122]. In weiteren Studien

wurden B-Zellen als Bestandteil der Immuninfiltrate in der frühen aktiven MS-Läsion nachgewiesen [123]. Die Studie von Guerrero et al. beschreibt eine erhöhte ANXA1-Expression auf B-Lymphozyten in Inflammationen [124]. Im MOG-EAE-Modell hängt die Rekrutierung von B-Lymphozyten von aktivierten MOG-spezifischen T-Helferzellen ab [114]. Aufgrund dieser Ergebnisse anderer Studien wurde die Expression von ANXA1 auf B-Lymphozyten untersucht.

Arbeitshypothese: ANXA1 wird von B-Lymphozyten exprimiert.

Methode: Mithilfe einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung wurde in muriner Milz und im Cup/EAE Hirn eine ANXA1-Expression auf B-Lymphozyten überprüft. Schnitte muriner Milz wurden gewählt, da in Lymphfollikeln eine zuverlässige B-Lymphozytendichte nachgewiesen werden kann. Die Markierung von B-Lymphozyten erfolgte durch anti-CD45R.

Ergebnis: Beide Antikörper zeigten ihr erwartetes Markierungsmuster. Anti-CD45R hat ein membranöses Markierungsmuster. In muriner Milz konnten CD45R⁺-Zellen nachgewiesen werden. Im Cup/EAE Hirn konnten keine CD45R⁺-Zelle nachgewiesen werden. Demnach war kein B-Lymphozyten Nachweis im Hirn möglich. Entgegen der Erwartung konnten keine doppelmarkierten Zellen nachgewiesen werden.

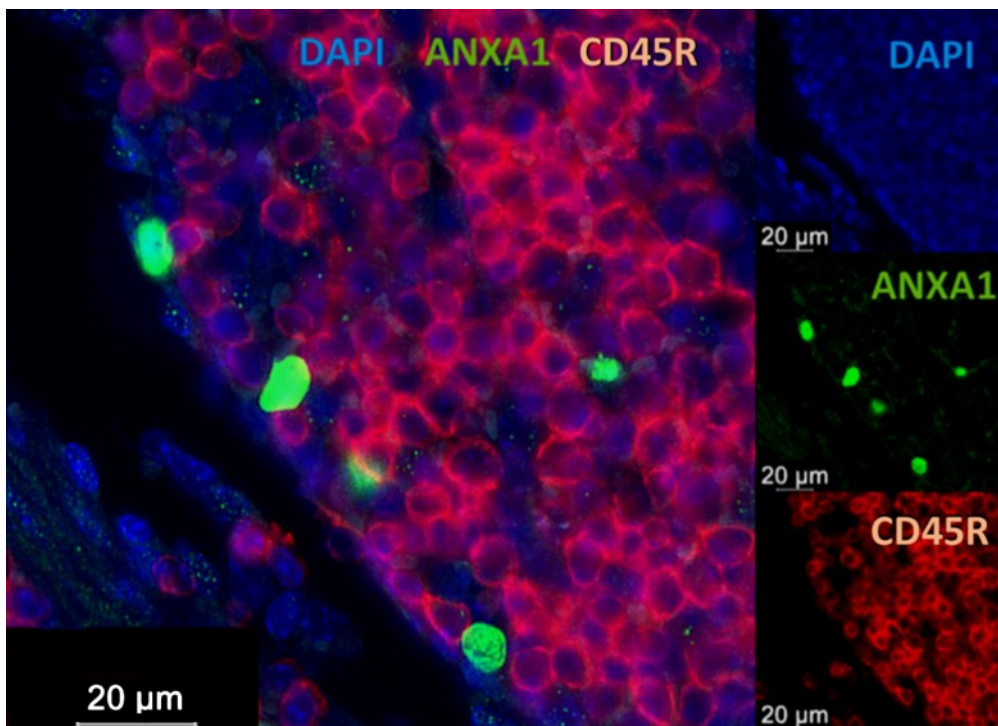


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von CD45R und ANXA1 in muriner Milz

Der Antikörper, welcher spezifisch an CD45R bindet, im roten Kanal, stellt sich in der Fluoreszenzmikroskopie mit einem membranösen Markierungsmuster dar. ANXA1, im grünen Kanal, ist zytoplasmatisch und nukleär markiert. Im blauen Kanal werden Zellkerne durch DAPI markiert. Der repräsentative Ausschnitt zeigt einen Lymphfollikel und eine erhöhte B-Lymphozytendichte. Es können keine doppelmarkierten Zellen nachgewiesen werden.

(Abkürzungen: ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, CD45= *cluster of differentiation* 45 R, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis,)

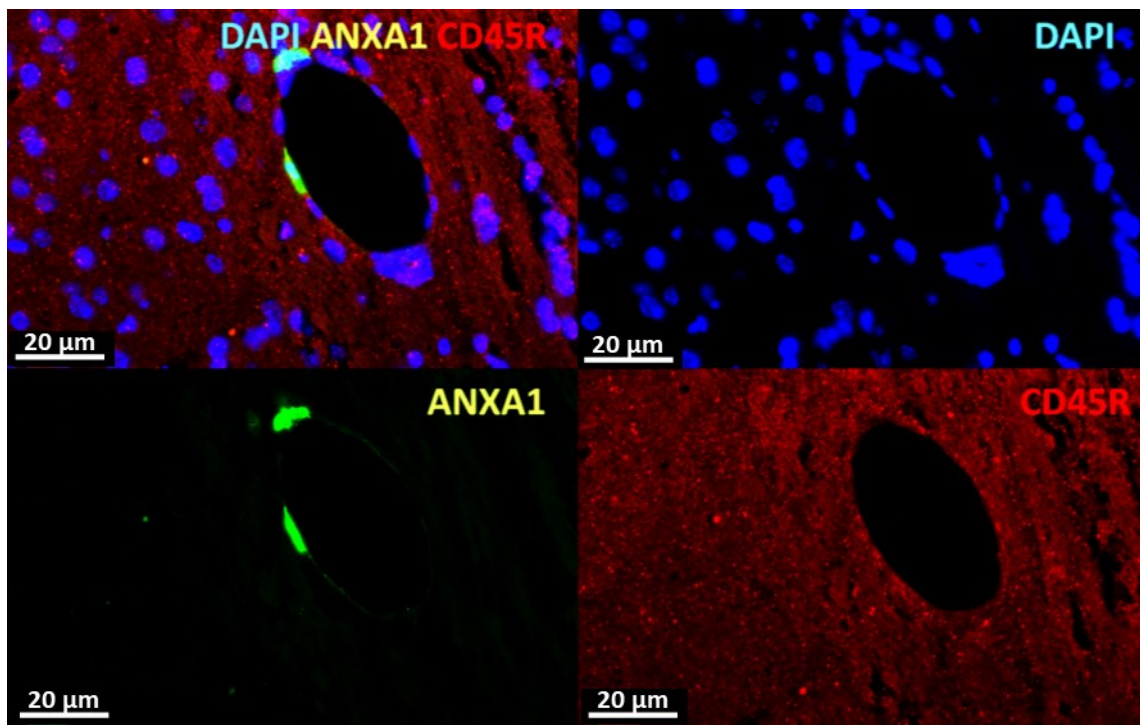


Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von CD45R und ANXA1 in Cup/EAE Hirn

Der repräsentative Ausschnitt zeigt ein an das CC angrenzende Gefäß. Im roten Kanal (CD45R-Markierung) können keine markierten Zellen identifiziert werden. Demnach können keine CD45R⁺-B-Lymphozyten im Hirn nachgewiesen werden und somit auch keine doppelmarkierten Zellen.

(Abkürzungen: ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, CD45R= *cluster of differentiation* 45 R, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis)

4.5.2 ANNEXIN A1-EXPRESSION IN ZELLEN DER ANGEBORENEN IMMUNANTWORT

Nachdem die Hypothese der Expression von ANXA1 in Zellen der adaptiven Immunantwort nicht bestätigt werden konnte, wurden weitere Markierungen für den Nachweis ANXA1 exprimierender Zellen durchgeführt. Aufgrund der aktuellen Studienlage, die ANXA1-Expressionen auf Zellen der angeborenen Immunantwort unter bestimmten Bedingungen nachweist, wurden Markierungen für Zellen der angeborenen Immunantwort durchgeführt.

4.5.2.1 ANNEXIN A1 UND CD44

Hintergrund: CD44 ist ein Marker für eine Vielzahl von Vorläuferzellen des Immunsystems. CD44 wird auf frühen Differenzierungsstufen von Immunzellen exprimiert. Insbesondere in der weißen Substanz konnten erhöhte Zelldichten von CD44 bereits beobachtet werden [125]. Aus

diesem Grund wird in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob ANXA1 und CD44 von denselben Zellen exprimiert werden

Arbeitshypothese: ANXA1 wird von Vorläuferzellen des Immunsystems exprimiert.

Methode: Untersucht wurde das Vorliegen einer Doppelmarkierung durch die Applikation beider Antikörper anti-ANXA1 und anti-CD44. Zunächst erfolgte eine Testmarkierung an muriner Milz, um das Expressions- und Verteilungsmuster von CD44 zu untersuchen. Nachdem eine Kolokalisation beider Marker auf einer Zelle nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Durchführung einer weiteren Markierungsreihe für die Quantifizierung an Cup/EAE Hirn. Dazu wurde das Verhältnis von ANXA1⁺ und CD44⁺ Zellen zu ANXA1⁺CD44⁻-Zellen betrachtet.

Ergebnis: Die Ergebnisse entsprechen der Hypothese. Es zeigen sich ANXA1⁺ und CD44⁺-Zellen mit charakteristischem Markierungsmuster (CD44 mit membranöser Markierung). Es können doppelmarkierte Zellen nachgewiesen werden. Die Quantifizierung ergab insgesamt 256 ANXA1⁺ zählbare Zellen in der Markierungsreihe. In der Markierungsreihe konnten insgesamt 241 CD44⁺ und ANXA1⁺-Zellen gezählt werden. Der Mittelwert an doppelpositiven Zellen der gesamten Cup/EAE Versuchsgruppe entsprach $93,71 \pm 3,31\%$.

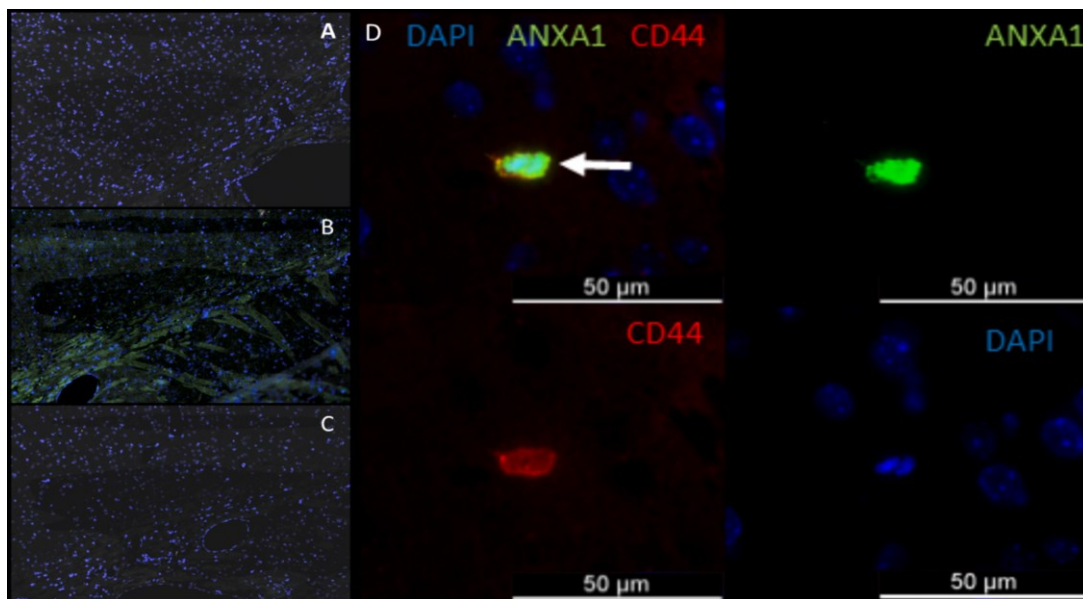


Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von CD44 und ANXA1 in Cup/EAE Hirn

(A) zeigt die Negativkontrolle. Diese wurde nur mit sekundärem Antikörper markiert und DAPI (blauer Kanal) und zeigt kein grünes oder rotes Signal. (B) und (C) zeigen die Kreuzkontrollen jeweils eines Primärantikörpers und dem nicht zugehörigen Sekundärantikörper. Auch hier zeigt sich weder ein rotes noch grünes Signal. (D) zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der DAPI/ANXA1/CD44-Markierung im Cup/EAE Hirn in Region 265. ANXA1 (grüner Kanal) zeigt ein zytoplasmatisches und nukleäres Markierungsmuster, CD44 (roter Kanal) eine membranöse Markierung. DAPI (blauer Kanal) markiert die Zellkerne. Die dargestellte Zelle (weißer Pfeil) zeigt eine Doppelmarkierung in einem repräsentativen Ausschnitt des ICC. (Abkürzungen: CC= *Corpus callosum*, ICC= laterales *Corpus callosum*, ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, CD44= *cluster of differentiation* 44, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis)

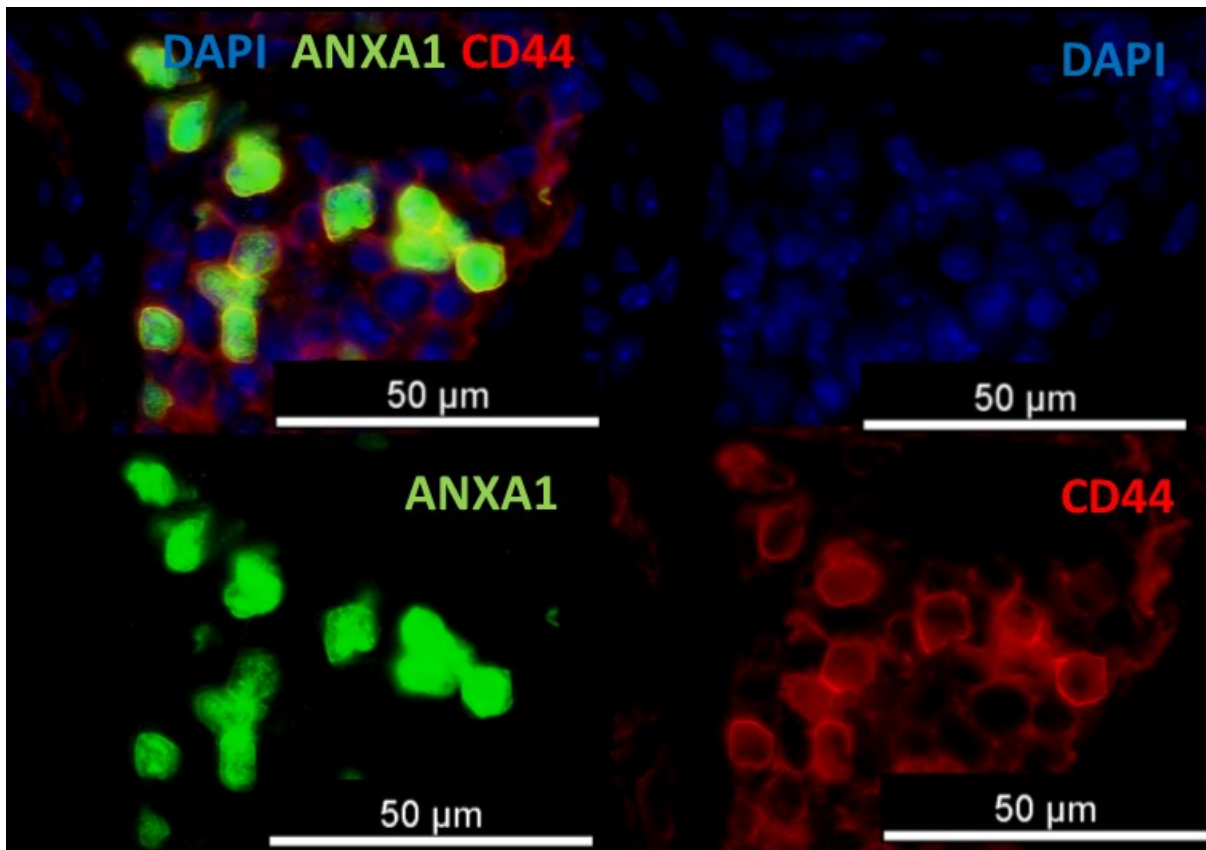


Abbildung 21: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von CD44 und ANXA1 in muriner Milz

Im grünen Kanal ist das Signal der ANXA1⁺-Zellen dargestellt. Auch im roten Kanal zeigen CD44⁺-Zellen ein membranöses Markierungsmuster. ANXA1 (grüner Kanal) zeigt ein zytoplasmatisches und nukleäres Markierungsmuster, CD44 (roter Kanal) eine membranöse Markierung der Zellen. DAPI (blauer Kanal) markiert die Zellkerne. Auch in muriner Milz kann eine Doppelmarkierung nachgewiesen werden. (Abkürzungen: CC= *Corpus callosum*, ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, CD44= *cluster of differentiation 44*, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis)

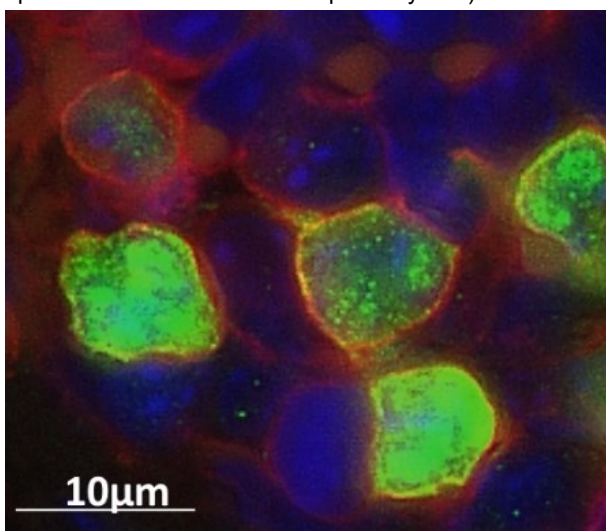


Abbildung 22: Detailaufnahme einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von CD44 und ANXA1 in muriner Milz

Die Abbildung zeigt die Doppelmarkierung einer Zelle mit CD44(rot) und ANXA1 (grün) in muriner Milz.

(Abkürzungen: CD44= *cluster of differentiation 44*, ANXA1= Annexin A1)

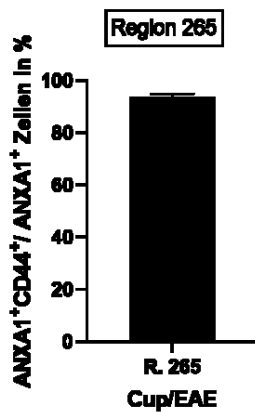


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Quantifizierung

Der Graph zeigt den prozentualen Anteil doppelt markierter Zellen in Region 265 des CC dar. 93,71±3,31% der ANXA1⁺-Zellen sind auch CD44⁺.

4.5.2.2 ANNEXIN A1 EXPRESSION IN MAKROPHAGEN/MIKROGLIA

Hintergrund: Mikroglia sind ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr des ZNS. Durch Mikroglia erfolgt die Erkennung apoptotischer Zellen oder Krankheitserreger. Mikroglia modulieren hirn-intrinsische Inflammation und können sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen einnehmen. In einer Studie von McArthur et al. wird die Expression von mikroglialem ANXA1 im Menschen beschrieben. Ebenso wird in der Studie ein Anstieg einer ANXA1-Expression auf Mikroglia im Zusammenhang mit der neurodegenerativen Erkrankung Morbus-Alzheimer beobachtet. Aus diesen Gründen ist die Untersuchung einer ANXA1-Expression auf Mikroglia in dem ebenfalls neurodegenerativen Tiermodell Cup/EAE sinnvoll. Für die Markierung der Mikroglia/Makrophagen im ZNS wurde Anti-IBA1 verwendet. IBA1 wird auch von peripheren Makrophagen exprimiert [126].

Arbeitshypothese: ANXA1 wird von Mikroglia/ peripheren Makrophagen exprimiert.

Methode: Am Cup/EAE Hirn wurde eine Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit Anti-ANXA1 und Anti-IBA1 durchgeführt. Ebenso erfolgte eine Markierung von muriner Milz, um eine mögliche Expression von ANXA1 auf peripheren Makrophagen zu untersuchen (ein OT murine Milz mit anti-ANXA1 und anti-IBA1, ein OT Cup/EAE mit anti-ANXA1, ein OT Cup/EAE-Hirn mit anti-ANXA1 und anti-IBA1, zwei KK, eine NK).

Ergebnis: Der Nachweis beider Proteine ist sowohl im Hirn als auch in der Milz möglich. Im roten Kanal ist IBA1 mit membranösen Markierungsmuster dargestellt. Im grünen Kanal ist das ANXA1-Signal zu sehen. In Milz und Hirn können eindeutig ANXA1-exprimierende Zellen nachgewiesen werden. Es lassen sich weder in Hirn noch in Milz Doppelmarkierungen von IBA1 und ANXA1 nachweisen. Demnach scheint ANXA1 im verwendeten Tiermodell Cup/EAE nicht von Mikroglia oder peripheren Makrophagen exprimiert zu werden.

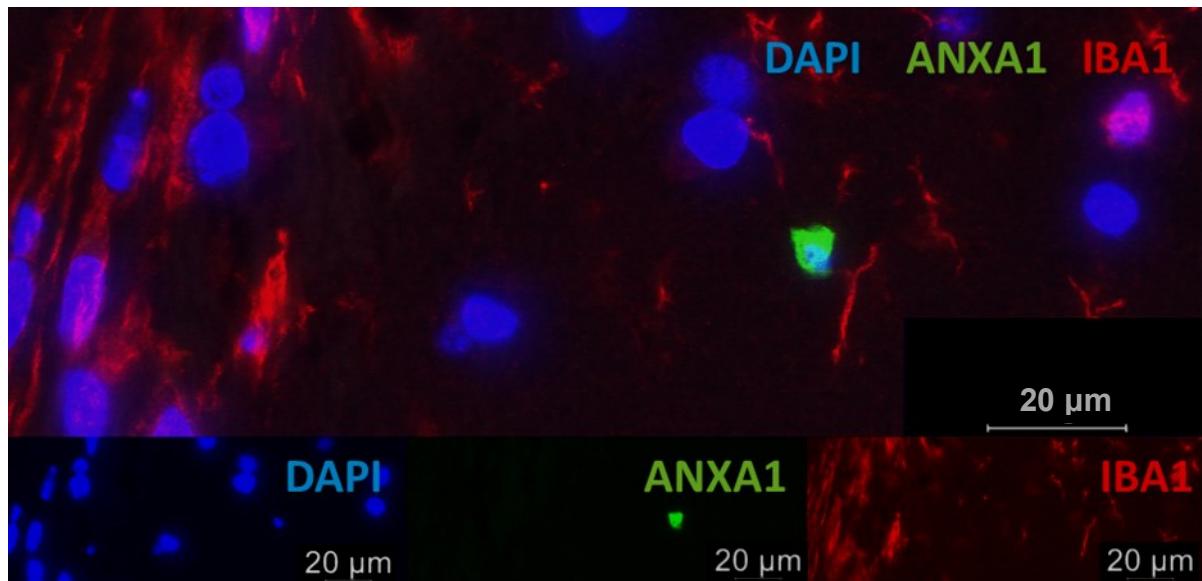


Abbildung 24: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von IBA1 und ANXA1 in CUP/EAE Hirn

IBA1, im roten Kanal zu sehen, zeigt ein membranöses Markierungsmuster. Im grünen Kanal sind ANXA1⁺-Zellen markiert. Der blaue Kanal zeigt ein nukleäres Markierungsmuster durch DAPI. Es liegen keine Doppelmarkierungen vor. (Abkürzungen: CC= *Corpus callosum*, ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, IBA1= ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis)

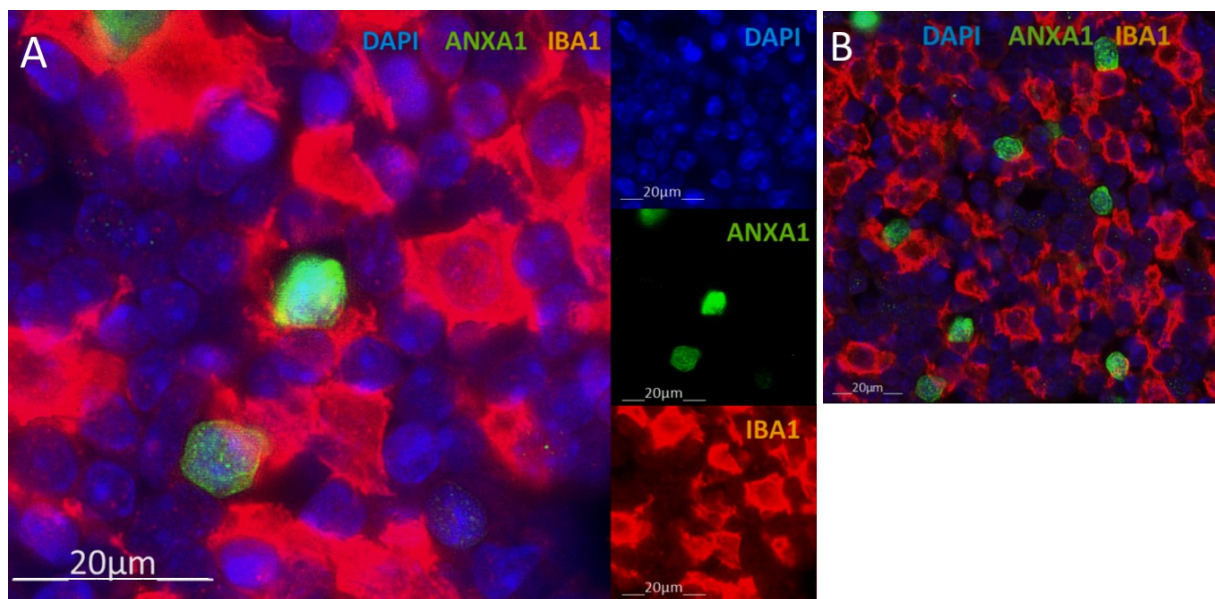


Abbildung 25: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von IBA1 und ANXA1 in muriner Milz

Abbildung A) zeigt Detailaufnahmen der Kanäle. IBA1, im roten Kanal zu sehen, zeigt ein membranöses Markierungsmuster. Im grünen Kanal sind ANXA1⁺-Zellen zytoplasmatisch und nukleär markiert. Der blaue Kanal zeigt ein nukleäres Markierungsmuster durch DAPI. Es liegen keine Doppelmarkierungen vor. Abbildung B) zeigt einen repräsentativen Ausschnitt des Markierungsmusters.

(Abkürzungen: CC= *Corpus callosum*, ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, IBA1= ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis)

4.5.2.3 ANNEXIN A1-EXPRESSION IN PROLIFERIERENDEN ZELLEN

Hintergrund: PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) markiert proliferierende Zellkerne [127]. Insbesondere in jungen Tieren, die eine Cuprizone-Intoxikation erhielten, konnte ein signifikanter Anstieg der Zelldichte proliferierender Mikroglia in der weißen Substanz während De-/Remyelinisierungsprozessen nachgewiesen werden [128]. Weiterhin besteht die Annahme, dass ANXA1 einen Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation besitzt. [129].

Arbeitshypothese: ANXA1 wird von proliferierenden Zellen exprimiert.

Methode: An Cup/EAE Hirnschnitten wurde mittels Immunfluoreszenzdoppelmarkierung ANXA1 und PCNA nachgewiesen (ein OT Cup/EAE-Hirn mit anti-ANXA1 und anti-PCNA, zwei KK, eine NK).

Ergebnis: Das Markierungsmuster entsprach der Erwartung. PCNA⁺-Zellen sind nukleär markiert. ANXA1⁺-Zellen zeigten die bekannte nukleäre und zytoplasmatische Markierung.

Die Erwartung der Doppelmarkierung von ANXA1⁺-Zellen und PCNA⁺-Zellen wurde nicht bestätigt. Es konnte keine ANXA1-Expression in proliferierenden Zellen nachgewiesen werden.

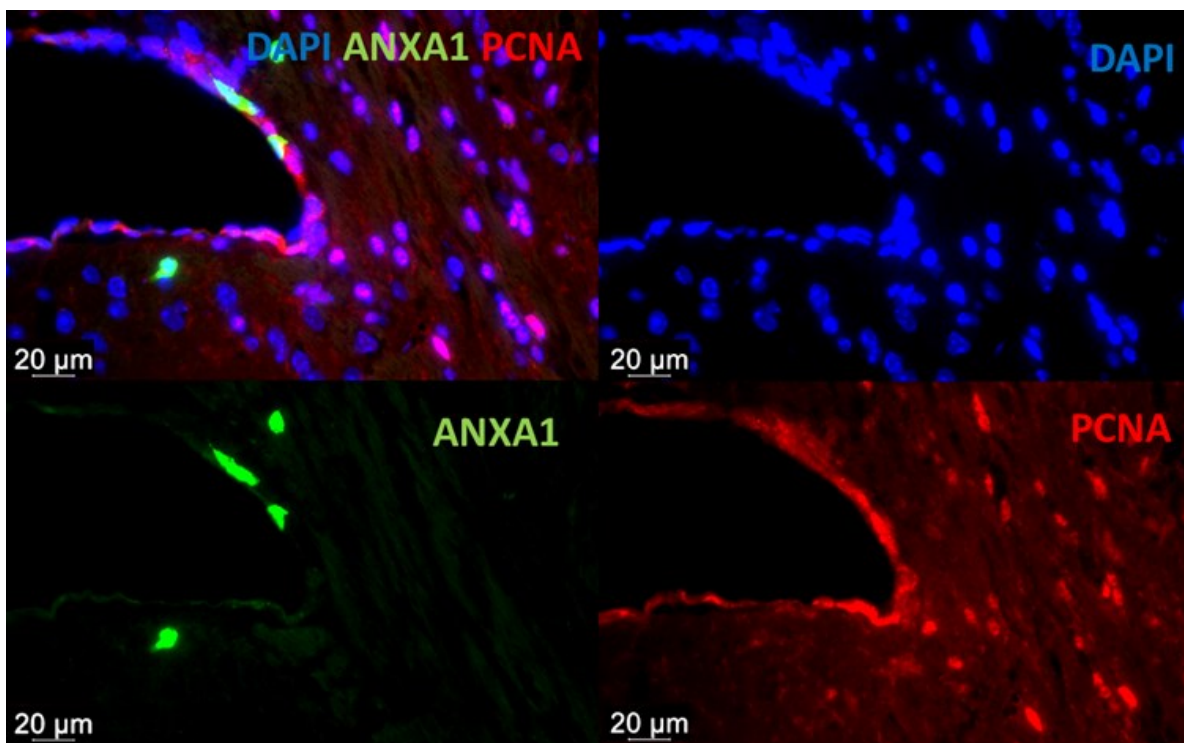


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von PCNA und ANXA1 in CUP/EAE Hirn

Der grüne Kanal zeigt ein deutliches Signal von ANXA1-Zellen. Es handelt sich vorraussichtlich um periventrikuläre Ependymzellen im ICC. Im roten Kanal ist das Markierungssignal von PCNA dargestellt. Das Markierungsmuster von PCNA ist nukleär. Es können keine doppelmarkierten Zellen nachgewiesen werden. (Abkürzungen: CC= *Corpus callosum*, ICC= *laterales Corpus callosum*, ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, PCNA= *proliferating cell nuclear antigen*, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis)

4.5.2.4 ANNEXIN A1 UND LY6G

Hintergrund: Neutrophile Granulozyten sind ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr und gehören zur Untergruppe der Leukozyten. Durch neutrophile Granulozyten erfolgt die Erstabwehr von Bakterien durch Phagozytose oder die Exozytose bakterizider Stoffe aus ihren Granula. Zusätzlich sind neutrophile Granulozyten in einem aktivierten Zustand in der Lage NETs auszubilden. Neutrophile Granulozyten werden als Reaktion auf eine lokale Gewebsinfektion oder Entzündung rekrutiert. Ebenso folgt auf eine zerebrale Entzündungsreaktion die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das ZNS [130]. Die Neuroinflammation in MS führt zu einer erhöhten Granulozyten Zelldichte im ZNS [131]. Eine ANXA1 Expression von neutrophilen Granulozyten wurde bereits in Studien beobachtet [85]. Aus diesem Grund, wurde eine ANXA1 Expression von neutrophilen Granulozyten in dieser Arbeit untersucht. Ein geeigneter Antikörper, um spezifisch an neutrophile Granulozyten zu binden, ist Ly6G.

Arbeitshypothese: ANXA1 wird von Granulozyten exprimiert.

Methode: Untersucht wird das Vorliegen einer Doppelmarkierung durch die Anwendung beider Marker (ANXA1 und Ly6G) im Rahmen einer Immunfluoreszenzmarkierung von Cup/EAE Hirnen (acht OT Cup/EAE-Hirn mit anti-ANXA1 und anti-Ly6G, zwei KK, eine NK).

Ergebnis: Beide Marker zeigen ihr erwartetes Markierungsmuster. Es können doppelt-markierte Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 339 ANXA1⁺-Zellen in allen Schnitten ausgewertet. Nach Auszählung doppelt und einfach positiver Zellen wurde pro Schnitt ein Mittelwert gebildet. Hieraus wurde im Anschluss der Mittelwert eines Tieres ermittelt. In der gesamten Zählung können 308 ANXA1⁺Ly6G⁺ Zellen nachgewiesen werden. Der Mittelwert an doppeltpositiver Zellen der gesamten Cup/EAE Versuchsgruppe entspricht einem Wert von 87,89%±9,78.

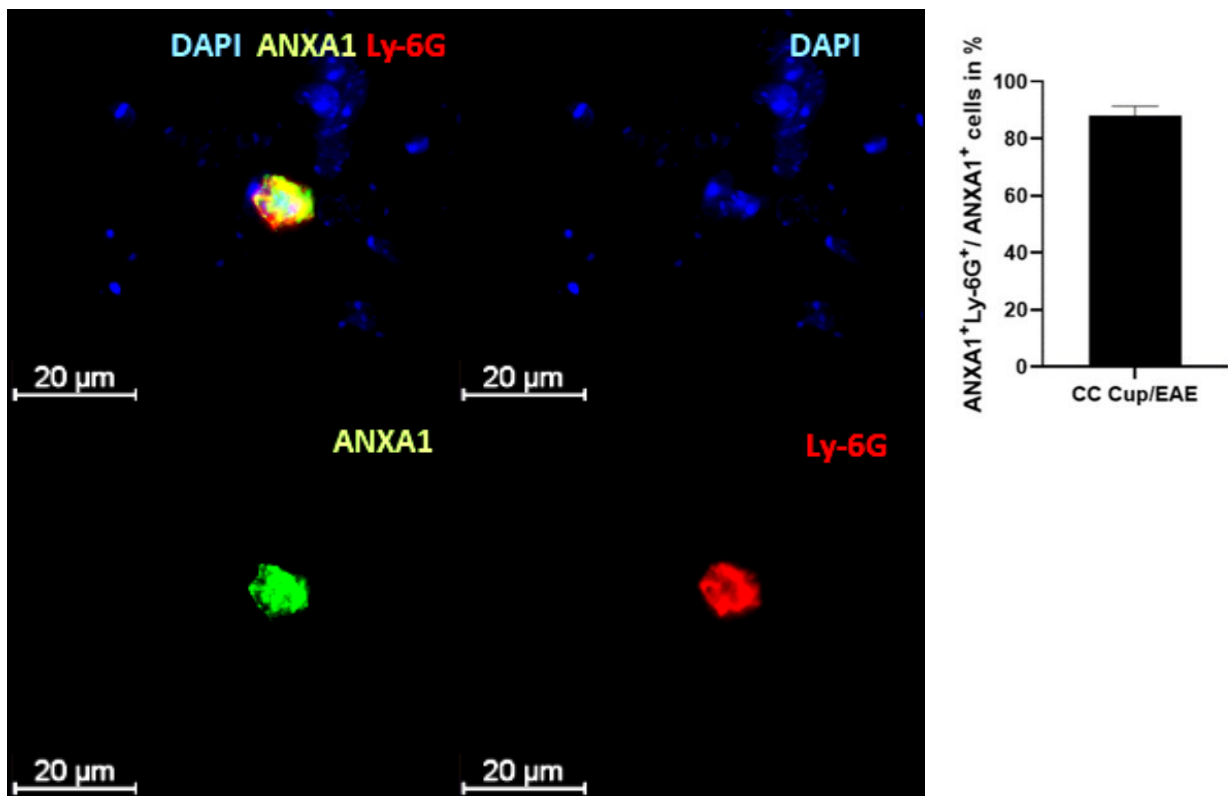


Abbildung 27: Repräsentativer Ausschnitt einer Ly6G/ANXA1/DAPI Immunfluoreszenzdoppelmarkierung im *Corpus callosum* eines Cup/EAE Hirns und Quantifizierung ANXA1⁺Ly6G⁺/ANXA1⁺ Zellen.

In der repräsentativen Abbildung wird beispielhaft eine doppeltmarkierte Zelle gezeigt, die sowohl nukleär und zytoplasmatisch durch Anti-ANXA1 (grüner Kanal), sowie membranös durch Anti-Ly6G (roter Kanal) markiert ist und somit in die Zählung doppeltmarkierter Zellen aufgenommen wurde. Im Graph ist die prozentuale Verteilung der ANXA1⁺ und Ly6G⁺- Zellen (87,89% ± 9,78) und der ANXA1⁺-Zellen dargestellt.

(Abkürzungen: ANXA1= Annexin A1, DAPI= 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Ly6G= *Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D*, Cup=Cuprizone, EAE=Experimentelle Autoimmunenenzephalomyelitis)

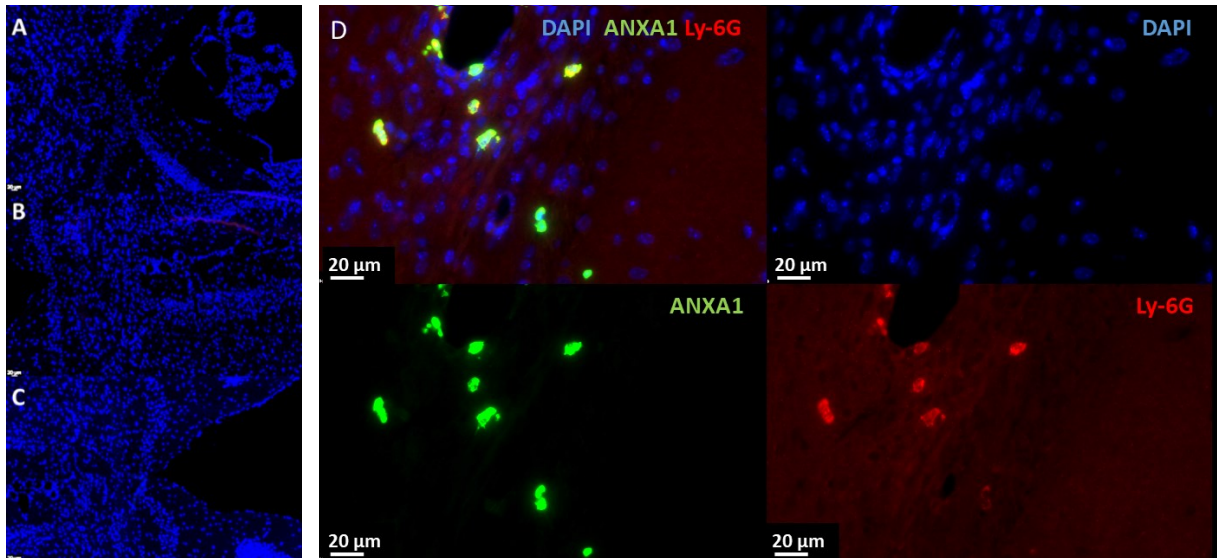


Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von Ly6G und ANXA1 in Cup/EAE Hirn

(A) zeigt die Negativkontrolle. Diese wurde nur mit sekundärem Antikörper markiert und DAPI (blauer Kanal) und zeigt kein grünes oder rotes Signal. (B) und (C) zeigen die Kreuzkontrollen jeweils eines Primärantikörpers und dem nicht zugehörigen Sekundärantikörper. Auch hier zeigt sich weder ein rotes noch grünes Signal. (D) zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der DAPI/ANXA1/Ly6G-Markierung im Cup/EAE Hirn. Dargestellt sind doppelt markierte Zellen im ICC.

(Abkürzungen: CC= *Corpus callosum*, Cup= Cuprizone, EAE= Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, Ly6G= *Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D*)

5. DISKUSSION

5.1. DIE VERWENDETEN TIERMODELLE

MS ist eine komplexe Erkrankung, für deren Erforschung Tierversuche häufig unvermeidlich sind. Die Heterogenität von MS lässt sich nicht in einem einzigen Tiermodell erfassen [132]. Mithilfe verschiedener Tiermodelle können einzelne Symptome und pathologische Prozesse nachgeahmt und untersucht werden. Dabei ist ein Vorteil, dass im Gegensatz zu MS-Patienten, mit Tiermodellen leichter und reproduzierbarer ZNS-Gewebeproben gewonnen werden können. Sowohl genetische Einflüsse als auch verschiedene Umwelteinflüsse können in Tiermodellen im Vergleich zum Menschen reduziert werden. Dennoch unterliegen Tiermodelle den Einflüssen von Spezies, Stamm, Geschlecht und Alter. Dauer und Dosis der Intoxikation können reguliert werden und sind für den Ausgang des Modells von Bedeutung. Um die Einflüsse auf das Tiermodell möglichst gering zu halten, wurden die Tiere unter gleichen Bedingungen gehalten und ein einheitliches Versuchsprotokoll an genetisch identischen Tieren gleichen Geschlechtes und Alters befolgt. Kritisch betrachtet werden muss, dass Inzuchtlinien zu genetischen Unregelmäßigkeiten und deren Manifestation führen können.

5.1.1. DIE EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENZEPHALITIS

Es existiert eine Vielzahl an EAE-Modellen. Das in dieser Arbeit verwendete und in Kapitel 1.3.2 beschriebene MOG-EAE-Modell liefert wichtige Erkenntnisse über autoimmune Prozesse im ZNS. Der Symptomverlauf der EAE zeigt in verschiedenen Hinsichten Parallelen zur MS. Zu den pathologischen Merkmalen der EAE und MS gehören Inflammation, Demyelinisierung, axonaler Verlust und Gliose [53]. Die dadurch verursachten Symptome, wie z.B. Lähmungserscheinungen oder Entzündungen des Kleinhirns und Sehnervs [39], sind denen der menschlichen MS ähnlich [60]. Neben den häufig auftretenden Läsionen im Rückenmark lassen sich, wie auch in der MS, entzündliche Läsionen vor allem in der weißen Substanz finden [133]. Im EAE-Modell liegt, wie auch in der RRMS, eine erhöhte Permeabilität der BHS vor [133]. Das in dieser Arbeit verwendete EAE-Modell verläuft, anders als die RRMS, monophasisch akut mit einer partiellen Remission [39]. Insbesondere für immunologische Aspekte, wie die T-Zell-Infiltration in das ZNS, ist das EAE-Modell geeignet. Sowohl in der MS als auch im EAE-Modell finden sich APCs mit ZNS-Antigenen in lymphoiden Organen [53]. Das EAE-Modell hat bereits wichtige Erfolge in der Erforschung neuer MS-Medikamente erbracht. Eines dieser Medikamente ist der humane monoklonale Antikörper Natalizumab, der in verschiedenen EAE-Modellen eine Verbesserung des Symptomverlaufs bewirkt [134]. Alle derzeit von

der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenen immunmodulatorischen MS-Medikamente sind bis zu einem gewissen Grad bei der Behandlung von EAE wirksam, obwohl nicht alle Medikamente in EAE entwickelt wurden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das EAE-Modell ein äußerst nützliches Modell zur Untersuchung potenzieller Behandlungen für MS ist [135]. Mithilfe der entwickelten Medikamente (z.B. Natalizumab) kann insbesondere die Schubfrequenz und die Aktivität bildmorphologisch im MRT reduziert werden [136]. Neben diesen Erfolgen, gibt es leider auch Beispiele, in denen aussichtsreiche Therapieansätze im EAE-Modell sich als wirkungslos bis schädigend für den MS-Patienten erwiesen (z.B. TNFalpha Blocker) [58]. Dies zeigt die Einschränkungen des EAE-Modells in der direkten Übertragung auf eine MS-Erkrankung auf.

5.1.2. DAS CUPRIZONE-MODELL

Das Cuprizone-Modell, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, ist ein zytodegeneratives, toxin-induziertes Tiermodell, das sich insbesondere für die Untersuchung von De- und Remyelinisierungsprozessen eignet [25]. Ausgewählte pathologische Prozesse, wie zum Beispiel Demyelinisierung, diffuser axonaler Schaden [137] oxidativer Stress [36] und die Integrität der BHS [138] lassen sich sowohl im Cuprizone-Modell als auch in progressiven MS-Phasen beobachten. Schon vor einer ersten Demyelinisierung treten sowohl im Cuprizone als auch in MS Läsionen auf [139–141], die gekennzeichnet sind durch gestresste Oligodendrozyten und aktivierte Mikrogliazellen [142, 143]. Eine pathologische Parallele ist die Oligodendrogliopathie. Oligodendrozyten haben die physiologische Aufgabe mit ihren Myelinscheiden die einzelnen Nervenzellfortsätze zu isolieren. In der MS zeigen sich erste Myelinanomalien an inneren Myelinscheiden [144, 145], wie auch im Cuprizone-Modell [146]. Neben diesen Parallelen gibt es Aspekte der MS-Erkrankung, die sich im Cuprizone-Modell nicht beobachten lassen. Die Rolle der Immunzellmigration ins ZNS ist im Cuprizone-Modell umstritten. Während einige Studien von einer untergeordneten Rolle ausgehen [52, 147], beschreiben andere Studien das vollständige Ausbleiben einer T-Zell-Rekrutierung [49, 148]. Anders als in der RRMS bleibt die BHS im Cuprizone-Modell weitestgehend intakt [42, 147, 149]. Dies könnte möglicherweise ein Grund für eine fast vollständige Abwesenheit von T-Zellen sein [42, 46]. In einer Studie von Barnett et al. wird eine primäre Oligodendrozyten-Apoptose und Mikrogliazellaktivierung in Abwesenheit von Lymphozyten in MS-Läsionen einiger Patienten beschrieben [143]. Neueste Erkenntnisse zweifeln jedoch diesen Unterschied an. So konnte neben einer Zunahme der Mastzellenpräsenz auch ein Anstieg der Permeabilität der BHS nach 3 Tagen Cuprizone-

Intoxikation gemessen werden [150]. Zusammenfassend ist das Cuprizone-Modell gut geeignet, um ausgewählte pathologische Prozesse, wie neurodegenerative Prozesse zu untersuchen. Vergleichbare neurodegenerativen Prozesse sind möglicherweise treibende Prozesse in der Krankheitsentwicklung in progressiven MS-Phasen [14].

5.1.3. DAS CUPRIZONE/EAE-MODELL

Die Kombination des autoimmunen EAE-Modells und des zytodegenerativen Cuprizone-Modells hat das Ziel die primäre Zytodegeneration und die folgende, sekundäre Einwanderung von Immunzellen in das ZNS zu imitieren. Nach der Cuprizone-Intoxikation kommt es zu einer primären Oligodendrozyten-Apoptose und Zytodegeneration. Die EAE-Induktion führt zu einer gestörten Permeabilität der BHS und einer Migration von peripheren enzephalitogenen Immunzellen [64]. Die Läsionen im Cup/EAE befinden sich, im Gegensatz zum reinen EAE-Modell, zusätzlich zu den Läsionen im Rückenmark auch im Vorderhirn und weisen Parallelen zu Hirnbildgebungen aktiver Läsionen von MS-Patienten auf [65–67]. Auch in der MS finden sich Entzündungsherde im Vorderhirn [1].

5.1.4. DIE LIMITATION DER TIERMODELLE

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist es nicht möglich die komplexe Heterogenität der MS-Erkrankung in einem einzigen Tiermodell wiederzugeben. Dadurch stellt sich die Frage, ob sich die Untersuchung der nachgeahmten Teilaspekte mithilfe von Tiermodellen wirklich für die Untersuchung von MS eignet [132]. Während die Auslösung der MS-Erkrankung unbekannt ist [42], bedarf es in Tiermodellen einer künstlich herbeigeführten Toxininduktion (Cuprizone) oder MOG-Injektion (EAE). Ein wesentlicher Unterschied sind zudem die Erkrankungszeiträume. Während eine MS-Erkrankung über Jahrzehnte fortschreiten kann [151], laufen Tiermodelle innerhalb weniger Wochen bis Tage ab. Weiterhin bleiben auch zunächst unsichtbare pathologische Aspekte vor Ausbruch einer MS in Tiermodellen unberücksichtigt [152]. Studien vermuten erste Veränderungen der weißen Substanz noch vor dem Auftreten klinischer Symptome [140]. Diese pathologischen Veränderungen lassen sich nicht durch ein Tiermodell untersuchen. Obwohl kein Tiermodell die vollständige Komplexität der MS erfasst, ist die Untersuchung pathologischer Teilaspekte durch Tiermodelle in der MS-Forschung momentan essentiell und liefert wichtige Erkenntnisse. Dabei muss die Wahl des Tiermodells der Fragestellung der Studie angepasst werden. Die Tiermodelle können sich teilweise ergänzen und somit den menschlichen Erkrankungsprozessen weiter angenähert werden. Obwohl eine

klare Limitierung der Tiermodelle vorliegt, überwiegt deren Bedeutung für das Verständnis der Erkrankung und ist unverzichtbar in der Entwicklung von Therapieansätzen.

5.2. IMMUNHISTOCHEMIE, IMMUNFLUORESCENZ UND HISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

In der Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und in histochemischen Färbungen können bestimmte Fehlerquellen auftreten, die hier kritisch beleuchtet werden. In immunhistochemischen und immunfluoreszierenden Markierungen binden Antikörper an Antigene. Es ist bekannt, dass es bei dieser Methode zur Ausbildung von unspezifischen Antikörperbindungen kommen kann, die zu einer Ergebnisverfälschung führen. Um einer unspezifischen Bindung entgegenzuwirken, wurden gewisse Schritte, wie das „Blocken“ (siehe Kapitel 3.9.1), in das Markierungsprotokoll aufgenommen. Weiterhin wurden Negativkontrollen ohne Primäantikörper mitgeführt und so das Auftreten unspezifischer Bindungen des Sekundäantikörpers überprüft. Zusätzlich wurde das vorliegende Markierungsmuster mit dem nach spezifischer Bindung erwartete Markierungsmuster verglichen. Insbesondere bei Immunfluoreszenzmarkierungen wurde durch Kreuzkontrollen eine Bindung von Sekundäantikörpern an den falschen Primäantikörper ausgeschlossen. Einen weiteren Einfluss auf Markierungs- bzw. Färbungsmethoden haben Alter, Dicke, Einbettvorgang sowie Lagerung des Gewebes. Um auch diesen Einfluss möglichst klein zu halten, wurden Markierungs- oder Färbungsreihen stets nach einem einheitlichen Protokoll und zur selben Zeit durchgeführt. Auf diese Weise konnten Fehlerquellen möglichst gering gehalten und vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

5.3. DIE QUANTIFIZIERUNG VON ZELLDICHTE UND OPTISCHER DICHTEN

Die Quantifizierung der Zelldichte erfolgte manuell durch den Experimentator und ist dadurch gewissen Fehlerquellen ausgesetzt. Um einer Erwartungshaltung über den Experimentausgang vorzubeugen, wurden alle Objektträger durch einen zweiten, unbeteiligten Experimentator verblindet. Kritisch betrachtet werden müssen persönliche Zählkriterien, sowie Unterschiede in der Intensität der Markierung. Die optische Dichte wurde mithilfe eines Grenzwertes im Programm ImageJ quantifiziert. Eine direkte Beeinflussung des Ergebnisses entstand durch die Auswahl eines Schwellenwertes (sog. engl. *threshold*). Je nach Auswahl des Schwellenwertes wird ein Bildpunkt als eindeutig schwarz oder weiß eingestuft. Diese Auswahl erfolgte manuell und stellt somit eine Fehlerquelle dar. Alle Hirnschnitte wurden unter einheitlichen Bedingungen quantifiziert, um auch diesen Einfluss zu verringern.

5.4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit konnten folgende wesentliche Ergebnisse erbracht werden:

- Die Annexin A1-Zelldichte ist im Cup/EAE-Modell im *Corpus callosum* und im EAE-Modell in der weißen Substanz des Rückenmarks signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrolltieren
- Die Annexin A1-Zelldichte ist im zytodegenerativen Cuprizone Modell nicht signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrolltieren
- Annexin A1 wird von CD44⁺ immunologischen Vorläuferzellen und Ly6G⁺ Granulozyten exprimiert

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse diskutiert und im Rahmen aktueller Forschungserkenntnisse in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet.

5.4.1. NACHWEIS UND BEDEUTUNG VON ANNEXIN A1

Das Protein ANXA1 ist in der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer aktuell von Bedeutung [153]. So zeigte sich im ZNS von Alzheimer-Patienten eine gesteigerte ANXA1 Expression [126]. Im Rahmen entzündlicher ZNS-Erkrankungen, wie der MS, scheint ANXA1 eine Schlüsselrolle bei der Regulierung von Neuroinflammation einzunehmen [126, 154]. Insbesondere in murinen Tiermodellen wurden bereits antiinflammatorische Effekte des ANXA1 Proteins nachgewiesen. In Studien konnte gezeigt werden, dass verstärkte Inflammationen in transgenen Mäusen ohne funktionelles ANXA1 Protein (ANXA1^{-/-}) auftreten [107]. Das proinflammatorische Interleukin 6 wurde bei einer Blockierung des FPR2/ANXA1-Signalweges erhöht freigesetzt [107]. Die Ergebnisse der Studien sprechen dafür, dass ANXA1 protektive Effekte im Rahmen von inflammatorisch vermittelten Prozessen besitzt. In einer anderen Studie wurden Mäuse vor einer Infektion mit dem Influenza-A-Virus mit humanem ANXA1 behandelt. Es konnten signifikant verbesserte Überlebensraten und geringere Lungenschäden nach ANXA1-Behandlung im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden [82]. Die Studie bestärkt die Hypothese, dass ANXA1 antiinflammatorische Effekte besitzen könnte. Weiterhin scheint das ANXA1/FPR2-System eine Funktion in der Eindämmung zerebraler Entzündungen einzunehmen [155]. In MS-Plaques konnte eine stadienabhängige Expression von ANXA1 nachgewiesen werden. Erhöhte ANXA1-Zelldichten fanden sich in MS-Läsionen im Vergleich zur unbeschädigten weißen Substanz (sog. engl. *normal-appearing white matter*). In akuten Läsionen war die Zelldichte ANXA1-exprimierender Zellen im Vergleich zu chronischen Läsionen deutlich gesteigert. In chronischen Läsionen fanden sich ANXA1⁺-Zellen vor allem an den inflammatorisch aktiven Läsionsrändern. In unbeschädigter weißer Substanz konnten nahezu keine ANXA1-Expressionen festgestellt werden [114]. Eine

weitere Studie konnte signifikant erhöhte ANXA1-Zelldichten im ZNS in MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten feststellen. In dieser Studie wurden ebenfalls gesteigerte ANXA1-Zelldichten in MS-Plaques im Vergleich zur weißen Substanz festgestellt [116]. Die Ergebnisse beider Studien sprechen für eine Beteiligung von ANXA1 in der akuten MS-Inflammation. Ob der Effekt von ANXA1 in akuten MS-Inflammationen eine Rolle spielt und ob diese pathologisch oder protektiv ist, ist bisher unklar. Im EAE-Modell konnte der Nachweis der signifikant erhöhten Expression von ANXA1 in EAE Läsionen gegenüber Kontrolltieren bereits erbracht werden [114, 115]. Das spricht für die Beteiligung von ANXA1 an der akuten Inflammation im EAE-Modell. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen den aktuellen Forschungserkenntnissen nicht. Die signifikant gesteigerten ANXA1-Zelldichten im Cup/EAE- und im EAE-Modell unterstreichen die Hypothese, dass ANXA1 und das ANXA1/FPR2-System an immunmodulatorischen Prozessen beteiligt sein könnten. Möglicherweise erfüllt ANXA1 dabei eine antiinflammatorische Funktion.

Cristante, McArthur et al. gehen von einer Regulation der BHS-Integrität durch ANXA1 aus. In einem Experiment mit ANXA1^{-/-} Mäusen wurde eine erhöhte Permeabilität der BHS im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt. Es wird aktuell untersucht, ob die Gabe von ANXA1 zu einer Besserung der Funktion der BHS führt [156]. Da die geschädigte BHS zu den pathologischen Merkmalen der MS gehört, könnte auch hier ANXA1 ein vielversprechender Ansatzpunkt für zukünftige Behandlungsstrategien sein. Im Cuprizone-Modell konnte keine signifikant erhöhte ANXA1-Zelldichte nachgewiesen werden. Ein Erklärungsansatz ist begründet in den Unterschieden der Pathogenese des Cuprizone-Modells im Vergleich zu dem EAE- und dem Cup/EAE-Modell. Zwar kommt es auch im Cuprizone-Modell zu einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten [137, 157], jedoch bleibt die BHS im Gegensatz zum EAE- und Cup/EAE-Modell intakt [158–161]. Immunzellmigrationen aus der Peripherie in das ZNS wie im EAE- und Cup/EAE-Modell bleiben im Cuprizone-Modell weitestgehend aus oder sind von untergeordneter Relevanz. Die aus Vorbefunden bekannte erhöhte ANXA1 Expression im EAE- und Cup/EAE-Modell kann unter Umständen darauf zurückgeführt werden, dass ANXA1⁺-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen ins ZNS einwandern.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen, die ANXA1 exprimieren in Bereichen des ZNS aufzufinden sind, welche stark demyelinisiert oder inflammatorisch verändert sind. Betroffen sind das *Corpus callosum* im Cup/EAE-Modell und die weiße Substanz sowie perivaskuläre Läsionen im EAE-Modell. Aus dieser Beobachtung ist abzuleiten, dass es sich bei den ANXA1⁺-Strukturen im Gewebe um Zellen, die an der pathologischen Veränderung beteiligt sind, handeln könnte. Zellen, die im ZNS für eine solche Expression in Frage kommen, sind residente Gliazellen und Neurone, aber auch rekrutierte Immunzellen aus der Peripherie.

5.4.2. ZELLULÄRE EXPRESSION VON ANNEXIN A1

Die Expression des Proteins ANXA1 ist bei einer Vielzahl von Zellen bekannt. Es wird hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert und findet sich in zytoplasmatischen und membranständigen Kompartimenten [104] in subzellulären Granula [104, 162]. Die Expression von ANXA1 konnte in neutrophilen Granulozyten, [85, 88, 91, 104, 121, 162] eosinophilen Granulozyten [85], Monozyten [85, 88, 104, 121], sowie Mastzellen [85, 88], Natürliche Killerzellen [104, 121] und Makrophagen nachgewiesen werden. In geringen Mengen konnte eine ANXA1-Expression auch in spezifischen Untergruppen von Lymphozyten (T- und B-Zellen) mit Hilfe von Durchflusszytometrie nachgewiesen werden [85, 87, 104, 121, 122, 163]. Weiterhin hat der Differenzierungszustand der Zellen einen Einfluss auf die Expression von ANXA1 [94]. So liegen bei Monozyten, bevor sie zu Makrophagen differenzieren, ein geringeres ANXA1-Expressionsniveau vor, als in ausgereiften Makrophagen [94]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die mögliche Expression von ANXA1 in den verwendeten Tiermodellen von verschiedenen Zellen des Immunsystems mit Hilfe von Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen untersucht.

TABELLE 14: ZELLULÄRE EXPRESSION VON ANNEXIN A1

ANXA1-exprimierende Zellen	Spezies	Methode	Referenz
T-Lymphozyten und B-Lymphozyten	Mensch	<ul style="list-style-type: none"> • Western-Blot-Analyse von Plasmaproben • Enzymgekoppeltes, immunologisches Nachweisverfahren engl.: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) 	[121] [122]
	Mensch	<ul style="list-style-type: none"> • Durchflusszytometrie • ELISA 	
Monozyten	Mensch	<ul style="list-style-type: none"> • Western-Blot-Analyse von Plasmaproben 	[121]

Mastzellen		Ratte	<ul style="list-style-type: none"> • Immunfluoreszenz 	[164]
Eosinophile nulozyten	Gra-	Mensch	<ul style="list-style-type: none"> • Durchflusszytometrie[122] • ELISA 	[122] [80]
Neutrophile nulozyten	Gra-	Mensch	<ul style="list-style-type: none"> • Durchflusszytometrie • ELISA 	[122]
Makrophagen		Mensch	<ul style="list-style-type: none"> • Western-Blot-Analyse 	[165]
		Mensch	<ul style="list-style-type: none"> • Western-Blot-Analyse 	[166]

5.4.2.1. ANNEXIN A1 EXPRESSION IN T- UND B-LYMPHOZYTEN

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Immunantwort. MS wurde lange Zeit als eine hauptsächlich T-Zell-vermittelte inflammatorische Erkrankung angesehen. Es liegen gesteigerte Zelldichten von T_H1/T_H17 -Zellen im ZNS-Gewebe von MS-Patienten sowie in Tiermodellen (z.B. in EAE) vor [167]. Neben T-Zellen spielen auch B-Zellen eine Schlüsselrolle in der MS-Pathologie [168]. B-Zellen sind antigenpräsentierende Zellen [169] und zudem in der Lage als differenzierte Plasmazellen Antikörper zu produzieren, die auch in MS Patienten nachweisbar sind [170]. In MS-Patienten scheinen B-Zellen pro-inflammatorische Immunfunktionen zu verstärken [171]. Es finden sich Hinweise für das Auftreten von B-zell-reichen Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen in MS [169, 172]. In aktiven Läsionen der MS finden sich sowohl T- als auch B-Lymphozyten [169, 173] und es konnte eine Korrelation zwischen der T- und B-Lymphozyten, sowie der Plasmazelldichte und dem Ausmaß der axonalen Schädigung und Neurodegeneration bei progressiver MS beobachtet werden [174]. In bereits publizierten Studien konnte im Cup/EAE Modell eine signifikante Rekrutierung von Lymphozyten, insbesondere $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, in das Vorderhirn der Mäuse beobachtet werden [65]. Verschiedene pathologische Prozesse im ZNS lösen eine Rekrutierung unterschiedlicher T-Zell-Subtypen in das geschädigte Gewebe aus. So konnte im reinen Cuprizone-Modell, in dem

keine Induktion von autoimmunen Prozessen durchgeführt wird, eine Rekrutierung von überwiegend CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen beobachtet werden [175]. Im EAE-Modell, in dem eine autoimmune Reaktion über die Injektion von Myelin-Proteinen induziert wird, setzt sich die vordergründig im Rückenmark der Tiere entstehende Inflammation der weißen Substanz hauptsächlich aus CD4⁺ T_H1 und T_H17 Zellen zusammen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine ANXA1-Expression weder von den überwiegend CD4⁺ T-Zellen im EAE Modell, noch von anderen T-Zell Subtypen im Cup/EAE Modell beobachtet werden. Weiterhin konnte auch keine ANXA1-Expression auf B-Lymphozyten beobachtet werden.

5.4.2.2. ANNEXIN A1 EXPRESSION IN MAKROPHAGEN UND MIKROGLIA

Makrophagen und Mikroglia sind wichtige Bestandteile der angeborenen Immunantwort. Sie sind an der primären Immunreaktion beteiligt und initiieren Entzündungsreaktionen, Homöostase und Geweberegeneration [176]. In MS-Läsionen finden sich erhöhte Makrophagen- und Mikroglia-Zelldichten, die für eine immunvermittelte Neurotoxizität verantwortlich sein könnten [177]. Eine Mikrogliose kann im zeitlichen Verlauf bereits früh innerhalb aktiver Läsionen nachgewiesen werden und verbleibt bis die Läsion inaktiv oder rückläufig ist. Makrophagen und Mikroglia sind auch an den autoimmunvermittelten Prozessen der EAE beteiligt [177]. Studien konnten bereits eine ANXA1 Expression auf Makrophagen und Astrozyten im EAE-Modell durch eine Immunhistochemische Markierung [178], sowie auf Mikroglia [126] und Makrophagen in MS nachweisen [114]. Daher war davon auszugehen, dass auch in den verwendeten Tiermodellen eine Expression von ANXA1 auf Makrophagen und Mikroglia vorliegt. In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Markierungen mit einem anti-IBA1 Antikörper durchgeführt, welcher sowohl Mikroglia als auch Makrophagen spezifisch bindet. Eine Ko-Lokalisation von ANXA1 und IBA1 konnte nicht beobachtet werden. Das spricht dafür, dass die Expression von ANXA1 auf Makrophagen und Mikroglia möglicherweise durch andere pathogene Reize hervorgerufen wird. Möglicherweise bleibt diese notwendige Stimulation in den verwendeten Tiermodellen aus. Mikrogliazellen durchlaufen im Rahmen pathologischer ZNS-Prozesse einen komplexen Differenzierungsprozess, welcher nicht durch zwei statische Zustände, wie aktiv oder ruhend, beschrieben werden kann [179]. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass Mikrogliazellen im Rahmen des dynamischen Differenzierungsprozesses eine ANXA1 Expression beobachten lassen. In *in vitro* Untersuchungen konnte murine Mikroglia in Zellkulturen mit Liposacchariden stimuliert und eine ANXA1 Expression hervorgerufen werden [180].

5.4.2.3 ANNEXIN A1 EXPRESSION IN PROLIFERIERENDEN ZELLEN

Als Zellproliferation bezeichnet man das schnelle Wachstum oder auch die Vermehrung von Gewebe. Eine beschleunigte Zellteilung kann einem Gewebeaufbau oder auch der Heilung von Verletzungen oder Entzündungen dienen. In *post mortem* ZNS Gewebe von MS-Patienten konnte eine gesteigerte Zellproliferation von Mikroglia und Astrozyten in demyelinisierenden Läsionen nachgewiesen werden [181, 182]. Im Cuprizone-Tiermodell wird eine Mikrogliazellzunahme im *Corpus callosum* durch Proliferation und/oder Rekrutierung vermutet [46]. Insbesondere in jungen Cuprizone-intoxikierten Mäusen konnte ein signifikanter Anstieg proliferierender Mikroglia in der weißen Substanz während De- und Remyelinisierungsprozessen nachgewiesen werden [128]. In einer Studie wird ein Zusammenhang von ANXA1-Zelldichte und des Proliferationszustandes vermutet [183]. Ebenso besteht der Verdacht, dass ANXA1 an der Proliferation von Tumorgewebe beteiligt sein könnte. In vielen Tumorentitäten konnte eine gesteigerte ANXA1-Expression mit Metastasierungen in Verbindung gebracht werden [184]. Je nach Krebsart scheint ANXA1 variierende Einflüsse auf Zellproliferation, Apoptose, Chemosensitivität, Metastasierung und Invasion zu haben [185]. In einer Studie konnte eine Expression von ANXA1 auf proliferierenden Hepatozyten nachgewiesen werden [186, 187]. Eine andere Studie zeigte in einem Modell mit Mäusen ohne funktionelles ANXA1 Protein eine gehemmte Zellproliferation von Lungenkrebszellen [90]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Expression von ANXA1 von proliferierenden Zellen untersucht. Zellproliferation kann mit Antikörpern, welche spezifisch das proliferierende Zellkernantigen (engl. Proliferating Cell Nuclear Antigen PCNA) binden, dargestellt werden [128]. Es konnte kein Nachweis einer Kollokalisierung von ANXA1⁺- und PCNA⁺-Zellen erbracht werden. Grund dafür kann sein, dass ANXA1 nicht auf proliferierenden Zellen exprimiert wird. Studien beschreiben häufig einen Einfluss auf die Regulation der Proliferation, statt einer ANXA1-Expression auf proliferativen Zellen. Möglicherweise ist ANXA1 daher zwar an der Regulation der Zellproliferation beteiligt, wird aber von proliferierenden Zellen nicht in ausreichendem Maße exprimiert, um in einer Immunfluoreszenz Markierung dargestellt zu werden. Gegebenenfalls können zukünftige Untersuchungen mit anderen Methoden weiteren Aufschluss über die Expression von ANXA1 in proliferierenden Zellen geben. Die funktionelle Rolle von ANXA1 an der Proliferation von Zellen, insbesondere in MS-Läsionen als auch in inflammatorischen und demyelinisierenden Läsionen der in dieser Arbeit verwendeten Tiermodelle, ist weiterhin unklar. Hier könnten beispielsweise weitere *in vitro* Zellkultur-Untersuchungen weitere Erkenntnisse erbringen.

5.4.2.4 ANNEXIN A1 EXPRESSION IN IMMUNOLOGISCHEN VORLÄUFERZELLEN

CD44 ist ein Zelloberflächenglykoprotein, das an der Zell-Zell-Interaktion, Zelladhäsion und Migration beteiligt ist [188] und es befindet sich auf einer Vielzahl von Immunzellen und immunologischen Vorläuferzellen wie z.B. myeloischen Stammzellen [188]. Im ZNS konnte CD44 in der weißen Substanz auf Gliazellen nachgewiesen werden [125]. In Hirnschnitten von MS Patienten konnten erhöhte Konzentrationen von CD44 in der weißen Substanz gefunden werden. In aktiven Läsionen wurde auf der Oberfläche reaktiver Astrozyten hohe Konzentrationen von CD44 nachgewiesen [189]. Studien gehen bei MS von veränderten Rezeptoren oder extrazellulären Matrixkomponenten wie CD44 auf Zelloberflächen aus. Diese Veränderungen führen zur Rekrutierung von Immunzellen und stehen möglicherweise mit der Bildung von MS-Läsionen in Verbindung [125]. CD44 wird im Cuprizone-Modell signifikant stärker exprimiert, als in Hirnen unbehandelter Kontrolltiere [125]. Insbesondere in demyelinisierten Bereichen der weißen Substanz können CD44-Expressionen lokalisiert werden [125]. Neben der CD44 Expression auf Gliazellen wird CD44 auch auf peripheren Immunzellen wie Lymphozyten, Monozyten, Thymozyten und Granulozyten exprimiert [190]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Kollokalisierung von CD44 und ANXA1 exprimierenden Zellen untersucht. Eine Kollokalisierung von CD44 und ANXA1 konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Demnach ist davon auszugehen, dass ANXA1 von CD44⁺-Zellen exprimiert wird. Wie bereits beschrieben befindet sich CD44 auf einer Vielzahl von Immun- oder Vorläuferzellen. Um eine ANXA1 exprimierende Zellart identifizieren zu können, bedarf es demnach weiterer Eingrenzungen in Form von zellspezifischen Markierungen der Zellen des Immunsystems.

5.4.2.5 ANNEXIN A1 EXPRESSION IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Neutrophile Granulozyten sind an der ersten Reaktion der angeborenen Immunantwort in akuten Entzündungen beteiligt. Studien belegen eine mögliche CD44 Expression auf neutrophilen Granulozyten [190]. Es ist eine Vielzahl von Effekten neutrophiler Granulozyten bekannt, die zur Pathogenese von MS beitragen könnten [191]. Dazu zählen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Enzymen, Myeloperoxidase und eine Vielzahl von Proteinase. Neutrophile Granulozyten stehen im Verdacht an der Zerstörung und Phagozytose von Myelin, der Freisetzung von NETs, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, der Störung der Integrität der BHS und der Erzeugung und Präsentation von Autoantigenen beteiligt zu sein [131]. Daraus lassen sich grundsätzlich proinflammatorische Funktionen der neutrophilen Gra-

nulozyten ableiten. Ob sich diese proinflammatorischen Eigenschaften der neutrophilen Granulozyten auch auf die MS-Pathologie übertragen lassen, bleibt bislang jedoch unklar [131, 191]. Im EAE-Modell sind erhöhte Zelldichten neutrophiler Granulozyten in ZNS und Peripherie und deren pathogene Rolle bekannt [131, 192]. Studien vermuten einen Effekt auf Inflammationen im ZNS durch neutrophile Granulozyten im EAE-Modell [193], sowie einen direkten Einfluss auf die Integrität der BHS. Die verursachte Schädigung der BHS und die dadurch ermöglichte Infiltration von Immunzellen in das ZNS sind wichtige Merkmale der EAE [131]. In weiteren Studien wird ein, durch die Depletion von Neutrophilen Granulozyten, die Hemmung der Neutrophilenmigration sowie die Depletion der Zytokine, die eine Neutrophilenmigration fördern, verzögerter Beginn und Schweregrad der EAE beschrieben [131]. Das belegt den proinflammatorischen Einfluss neutrophiler Granulozyten im EAE-Modell. Voruntersuchungen anderer Studien zeigen in peripheren Leukozyten eine ANXA1 Expression auf neutrophilen Granulozyten [194]. In der vorliegenden Arbeit lässt sich die ANXA1 Expression auf Ly6G⁺-Zellen im Cup/EAE-Modell bestätigen. Ly6G wird vorwiegend auf peripheren neutrophilen Granulozyten, aber auch auf der Mehrzahl der myeloischen Zellen im Knochenmark exprimiert [182]. Ly6-Proteine der Maus zeichnen sich durch ein auf die Zelllinie beschränktes Expressionsmuster auf lymphoiden Zellen aus. Eine Studie von Fleming et al. beschreibt eine hohe Spezifität von Ly6G, die sich von anderen serologisch definierten Ly6-Spezifitäten unterscheidet [182]. Demnach ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den Ly6G⁺-Zellen in dieser Arbeit um neutrophile Granulozyten handelt.

5.4.2.6 ANNEXIN A1 ALS BESTANDTEIL NEUTROPHILER EXTRAZELLULÄRER FALLEN

Aufgrund der aktuellen Studienlage ergibt sich der Ansatz, dass ANXA1 Bestandteil der NETs sein könnte [194]. Es handelt sich bei NETs um netzartige Chromatinstrukturen, die aus zytosolischen und granulären Proteinen bestehen. NETs sind Bestandteil neutrophiler Granulozyten und übernehmen mehrere immunmodulatorische Funktionen. Neutrophile Granulozyten und NETs sind an der Interaktion von angeborenem und adaptivem Immunsystem beteiligt und in der Lage zum Beispiel über die APC-Aktivierung die Differenzierung von T_H17-Helferzellen einzuleiten [193]. NETs scheinen an zytotoxischen Effekten beteiligt zu sein, die sich in einer möglichen Beteiligung am Abbau der BHS in neuroinflammatorischen Erkrankungen äußern könnte [195, 196]. Eine Dysregulierung von NETs steht im Verdacht autoimmune Erkrankungen hervorzurufen [194, 197]. In der Studie von Bruschi et al. wird am Beispiel der Lupusnephritis ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von ANXA1 in NETs und einer Autoimmunität vermutet [194]. Inwieweit sich diese Hypothese auf das Krankheitsbild der MS

oder der EAE übertragen lässt, bleibt vorerst durch mangelnde experimentelle Beweise unklar. In einigen Humanstudien konnten bereits erhöhte Anzahlen von NETs bei MS-Patienten festgestellt werden [198]. Die weitere Untersuchung einer ANXA1 Expression in NETs könnte daher in Zukunft wichtige Erkenntnisse in der MS-Forschung liefern.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Erforschung des FPR Liganden ANXA1 ist derzeit in vielen Bereichen der Medizin, wie zum Beispiel Autoimmun- oder Krebserkrankungen, von Bedeutung. Die Funktion und Expression von ANXA1 im gesunden ZNS und im ZNS bei neurodegenerativen oder inflammatorischen Erkrankungen ist noch nicht vollständig gesichert. In der vorliegenden Arbeit kann erstmals der Nachweis eines signifikanten Anstiegs der ANXA1 Expression im Cup/EAE-Modell erbracht werden. Weiterhin erfolgte die Eingrenzung von Zelldifferenzierungszustand und Zellart der ANXA1 exprimierenden Zelle. Die Expression von ANXA1 kann auf immunologischen Vorläuferzellen (CD44⁺) und Ly6G⁺Granulozyten nachgewiesen werden. Die genaue Charakterisierung der ANXA1 exprimierenden Leukozyten bedarf weiterer Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise für eine mögliche Beteiligung von ANXA1 an immunologischen Prozessen, die auch bei MS eine Rolle spielen könnten. Im Verdacht steht eine anti-inflammatorische Funktion über den ANXA1/FPR2 Signalweg. Es ist bekannt, dass ANXA1 durch die Bindung an FPR2 Inflammationen auflösen kann [199]. Wie genau ANXA1 und der ANXA1/FPR2 Signalweg an Prozessen der Inflammation in den Tiermodellen beteiligt ist und wie sich diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen, bedarf weiterer Studien. Dies ist wichtig für die weitere Verbesserung des Verständnisses der MS-Pathogenese und somit auch für den Ausbau neuer Therapieansätze.

7. THESEN

1. Die Multiple Sklerose ist eine erworbene, chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems, die häufig im jungen Erwachsenenalter diagnostiziert wird.
 2. In der MS treten entzündliche Läsionen der weißen und grauen Substanz des ZNS auf. Zu den Läsionsmerkmalen zählen Demyelinisierung, Inflammation, der Untergang von Axonen und eine reaktive Gliose.
 3. Das Cuprizone-Modell ist ein Toxin-induziertes, zytodegeneratives Modell und eignet sich zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsprozessen. Zu den zentralen Merkmalen des Modells zählen Demyelinisierung bedingt durch Oligodendrozytenapoptose, begleitet von Mikro- und Astroglie, sowie akutem axonalen Schaden im Zentralnervensystem der Mäuse.
 4. Im EAE-Modell kommt es zur Bildung von autoreaktiven T-Helferzellen 1 (T_h1-Zellen) und T-Helferzellen 17 (T_h17-Zellen). Diese T-Zellen sind enzephalitogen und dringen über die BHS in Hirn und Rückenmark ein. Im ZNS erkennen die T-Zellen das MOG₃₅₋₅₅ Antigen und verursachen, vor allem im Rückenmark und der weißen Substanz, eine Inflammation und Gewebeschädigung.
 5. Die Kombination des autoimmunen EAE-Modells und des zytodegenerativen Cuprizone-Modells hat das Ziel die primäre Zytodegeneration und die folgende, sekundäre Einwanderung von Immunzellen in das ZNS zu imitieren.
 6. Der Formyl-Peptid-Rezeptor ist ein Transmembranprotein und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der Rezeptor ist in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden zu binden. Dies führt, abhängig von dem Liganden, zu spezifischen intrazellulären Reaktionen.
 7. ANXA1 ist ein endogener Ligand des FPR und vermittelt durch die extrazelluläre Bindung an den Rezeptor überwiegend anti-inflammatorische Effekte. Die anti-inflammatorischen Signalkaskaden begrenzen Entzündungsreaktionen.
 8. Im EAE-Modell ist die Dichte ANXA1-exprimierender Zellen gegenüber Kontrolltieren im Rückenmark signifikant erhöht.
 9. Im Cup/EAE-Modell ist die Dichte ANXA1-exprimierender Zellen gegenüber Kontrolltieren im *Corpus callosum* signifikant erhöht.
-

10. Die Multiple Sklerose ist eine immunvermittelte Erkrankung, bei der neben der zellulären Immunantwort auch das humorale Immunsystem beteiligt ist.
11. ANXA1 wird von CD44⁺-Zellen im murinen Tiermodellen der MS exprimiert. CD44 ist ein Zelloberflächenglykoprotein, das an der Zell-Zell-Interaktion, Zelladhäsion und Migration beteiligt ist und es befindet sich auf einer Vielzahl von Immunzellen und immunologischen Vorläuferzellen.
12. ANXA1 wird von Ly6G exprimierenden Granulozyten in den murinen Tiermodellen der MS exprimiert.
13. Neutrophile Granulozyten sind an der ersten Reaktion der angeborenen Immunantwort in akuten Entzündungen beteiligt. Es ist eine Vielzahl von Effekten neutrophiler Granulozyten bekannt, die zur Pathogenese von MS beitragen könnten. Dazu zählen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Enzymen, Myeloperoxidase und eine Vielzahl von Proteinase.
14. Neutrophile Granulozyten erfüllen proinflammatorische Funktionen im EAE-Modell.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERLAUFSFORMEN DER MULTIPLEN SKLEROSE (MS)	5
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHER AUFBAU DES FPR	11
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE ABBILDUNG DER LIGANDENBINDUNG	13
ABBILDUNG 4: DIE STRUKTUR VON ANNEXIN A1	14
ABBILDUNG 5 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSUCHSGRUPPEN A-D	20
ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG DER HIRNREGIONEN	22
ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DER IN DER IMMUNFLUORESCENZ UNTERSUCHTEN ROIS AUF HÖHE DES ROSTRALEN HIPPOCAMPUS, REGION 265	23
ABBILDUNG 8: DARSTELLUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCH UNTERSUCHTEN REGION VON INTERESSE IM RÜCKENMARK	23
ABBILDUNG 9: PRINZIP EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN MARKIERUNG NACH DER ABC-METHODE	25
ABBILDUNG 10: PRINZIP EINER IMMUNFLOURESCENZ-MARKIERUNG	30
ABBILDUNG 11: DARSTELLUNG DES AUSMAßES DER DEMYELINISIERUNG IM <i>CORPUS CALLOSUM</i> AUF HÖHE DES ROSTRALEN HIPPOCAMPUS	38
ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG DES AUSMAßES DER MIKROGLOIOSE IM <i>CORPUS CALLOSUM</i> AUF HÖHE DES ROSTRALEN HIPPOCAMPUS	40
ABBILDUNG 13:QUANTIFIZIERUNG DER ANNEXIN A1 EXPRIMIERENDEN ZELLEN UNTER KONTROLLBEDINGUNGEN, NACH 5 WOCHEN CUPRIZONE-INTOXIKATION UND IM CUP/EAE MODELL	42
ABBILDUNG 14: REPRÄSENTATIVE AUSSCHNITTE DER ANNEXIN A1 EXPRESSION IM MEDIALEN UND LATERALEN <i>CORPUS CALLOSUM</i> BEI KONTROLLTIEREN, 5 WOCHEN CUPRIZONE UND CUP/EAE	43
ABBILDUNG 15: REPRÄSENTATIVE AUSSCHNITTE DER ANNEXIN A1 UND HE-FÄRBUNG AN UNBEHANDELTEN KONTROLLTIEREN UND TIEREN DER EAE-GRUPPE	45
ABBILDUNG 16: IMMUNFLOURESCENZ-DOPPELMARKIERUNG VON CD3 UND ANXA1 IN MURINER MILZ	47
ABBILDUNG 17: IMMUNFLOURESCENZ-DOPPELMARKIERUNG VON CD3 UND ANXA1 IN CUP/EAE-HIRN	48
ABBILDUNG 18: IMMUNFLOURESCENZ-DOPPELMARKIERUNG VON CD45R UND ANXA1 IN MURINER MILZ	49

ABBILDUNG 19: IMMUNFLOURESZENZ-DOPPELMARKIERUNG VON CD45R UND ANXA1 IN CUP/EAE	50
ABBILDUNG 20: IMMUNFLOURESZENZ-DOPPELMARKIERUNG VON CD44 UND ANXA1 IN CUP/EAE HIRN	51
ABBILDUNG 21: IMMUNFLOURESZENZ-DOPPELMARKIERUNG VON CD44 UND ANXA1 IN MURINER MILZ	52
ABBILDUNG 22: DETAILAUFNAHME EINER IMMUNFLOURESZENZ-DOPPELMARKIERUNG VON CD44 UND ANXA1 IN MURINER MILZ	52
ABBILDUNG 23: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER QUANTIFIZIERUNG	53
ABBILDUNG 24: IMMUNFLOURESZENZ-DOPPELMARKIERUNG VON IBA1 UND ANXA1 IN CUP/EAE HIRN	54
ABBILDUNG 25: IMMUNFLOURESZENZ-DOPPELMARKIERUNG VON IBA1 UND ANXA1 IN MURINER MILZ	54
ABBILDUNG 26 IMMUNFLOURESZENZ-DOPPELMARKIERUNG VON PCNA UND ANXA1 IN CUP/EAE HIRN	55
ABBILDUNG 27: REPRÄSENTATIVER AUSSCHNITT EINER LY6G/ANXA1/DAPI IMMUNFLOURESZENZDOPPELMARKIERUNG IM CORPUS CALLOSUM EINES CUP/EAE HIRNS UND QUANTIFIZIERUNG ANXA1⁺LY6G⁺/ANXA1⁺ ZELLEN	57
ABBILDUNG 28: IMMUNFLOURESZENZ-DOPPELMARKIERUNG VON LY6G UND ANXA1 IN CUP/EAE HIRN	58

9. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: EINTEILUNG DER LIGANDEN DES FORMYL-PEPTID-REZEPTORS	12
TABELLE 2: TIEREXPERIMENTE VON DENEN MATERIAL IN DIESER STUDIE VERWENDET WURDE..	18
TABELLE 3: EINTEILUNG DER VERSUCHSGRUPPEN	19
TABELLE 4: MANUELLE ENTWÄSSERUNG UND EINBETTUNG	21
TABELLE 5: ENTPARAFFINIERUNG UND REHYDRIERUNG	26
TABELLE 6: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER BEI IMMUNHISTOCHEMISCHEN MARKIERUNGEN	27
TABELLE 7: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER BEI IMMUNHISTOCHEMISCHEN MARKIERUNGEN	27
TABELLE 8: ENTWÄSSERUNG	28
TABELLE 9: ARBEITSPROTOKOLL EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN MARKIERUNG	29
TABELLE 10: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER BEI IMMUNFLUORESCENZ- DOPPELMARKIERUNGEN	31
TABELLE 11: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER BEI IMMUNFLUORESCENZ- DOPPELFÄRBUNGEN	31
TABELLE 12: ARBEITSPROTOKOLL EINER IMMUNFLUORESCENZ-DOPPELMARKIERUNG	32
TABELLE 13: ARBEITSSCHRITTE EINER DICHEMESSUNG MITTELS IMAGE	34
TABELLE 14: ZELLULÄRE EXPRESSION VON ANNEXIN A1	65
TABELLE 15: VERWENDETE CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	80
TABELLE 16: VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN	81

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ANX	Annexin
ANXA1	Annexin A1
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	Cluster of differentiation
CC	Corpus callosum
Cup	Cuprizone
C-ter	C-Terminus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppeltes, immunologisches Nachweisverfahren (engl. „enzyme-linked Immunosorbent Assay“)
engl.	englisch
et al.	et alia
FPR	Formyl-Peptid-Rezeptor
FPR1	Formyl-Peptid-Rezeptor 1
FPR2	Formyl-Peptid-Rezeptor 2
FPR3	Formyl-Peptid-Rezeptor 3
g	Gramm
gem.	gemäß
GS	graue Substanz
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-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
KK	Kreuzkontrollen

Abkürzungsverzeichnis

Ktrl	Kontrolltier
l	Liter
lcc	laterales Corpus callosum
Ly6G	Lymphozyten-Antigen 6 Komplex Locus G6D (engl. „Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D“)
mcc	mediales Corpus callosum
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOG35-55	Myelin-Oligodendrozyten-Protein 35-55
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
MS	Multiple Sklerose
NETs	Neutrophile extrazelluläre Fallen (engl. „neutrophil extracellular traps“)
NK	Negativkontrollen
N-ter	N-Terminus
OT	Objekträger
PBS	Phosphatpufferlösung (engl. „phosphate buffered saline“)
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	pimär-progressive MS
PRR	Musterwiedererkennungsrezeptoren (engl. „pattern recognition receptor“)
PTX	Pertussis-Toxin
RM	Rotationsmikrotom
ROI	region of interest
ROIs	regions of interest
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. „relapsing-remitting MS“)
RASF	rheumatoide Arthritis
SEM	Standardfehler (engl. „Standard Error of the Mean“)
SPMS	sekundär-progressive MS (engl. „secondary-progressive MS“)
T _h	T-Helferzelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
vgl.	vergleiche
WS	weiße Substanz
ZNS	Zentralnervensystem

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μg	Mikrogramm
5wCup	5 Wochen Cuprizone

11. ANHANG

11.1. CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

TABELLE 15: VERWENDETE CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

Chemikalie	Hersteller/Firma	Katalognummer
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Chromogen	Dako	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Substrat	Dako	K3468
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth	6335.1
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydraton)	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
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
Salzsäure (HCl), 37%	Merck	1.00317.1000
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific	J1800AMNZ
Tris (PUFFERAN®)	Roth	AE15.2
Wasserstoffperoxid 35% (H ₂ O 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 16: 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)
Eosin-Lösung	0,5g Eosin Y 250ml destilliertes Wasser
Hämatoxylin-Farblösung	250ml Mayers Hämalaunlösung filtriert

HCl-Alkohol	70% v/v Ethanol 30% v/v destilliertes Wasser Angesäuert mit 3% v/v Salzsäure 37%
Natriumacetat-Puffer	1,088g Natriumacetat 200ml destilliertes Wasser
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
Perfusionslösung	90% v/v destilliertes Wasser 10% v/v Formaldehydlösung 37% 4,6 g/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 8 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Tris(hydroxymethyl)aminomethane/Ethylendiamintetra-essigsäure-Puffer	6,05g Tris 1,85g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat 5000ml destilliertes Wasser pH-Wert auf 9,0 eingestellt

12. Literatur

1. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T (2015) Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 14(4):406–419. doi:10.1016/S1474-4422(14)70305-9
2. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A (2010) Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67(6):824–830. doi:10.1002/ana.21978
3. Ramagopalan SV, Dymment DA, Ebers GC (2008) Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 31(12):645–652. doi:10.1016/j.tins.2008.09.001
4. Ascherio A, Munger KL, Simon KC (2010) Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 9(6):599–612. doi:10.1016/S1474-4422(10)70086-7
5. Houen G, Trier NH, Frederiksen JL (2020) Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 11:587078. doi:10.3389/fimmu.2020.587078
6. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15(9):545–558. doi:10.1038/nri3871
7. Chitnis T, Weiner HL (2017) CNS inflammation and neurodegeneration. *J Clin Invest* 127(10):3577–3587. doi:10.1172/JCI90609
8. Lucchinetti C, Brck 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. doi:10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q
9. Kipp M, van der Valk P, Amor S (2012) Pathology of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(5):506–517. doi:10.2174/187152712801661248
10. Lassmann H (2018) Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(3). doi:10.1101/cshperspect.a028936
11. Mollica A, Stefanucci A, Costante R, Pinnen F (2012) Role of formyl peptide receptors (FPR) in abnormal inflammation responses involved in neurodegenerative diseases. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 11(1):20–36. doi:10.2174/187152312803476246
12. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, Hernández-Navarro VE, Sánchez-López AL, Alatorre-Jiménez MA (2014) Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res* 45(8):687–697. doi:10.1016/j.arcmed.2014.11.013
13. 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
14. Luchicchi A, Preziosa P, Hart B 't (2021) Editorial: "Inside-Out" vs "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Front Cell Neurosci* 15:666529. doi:10.3389/fncel.2021.666529
15. Engelhardt B, Kappos L (2008) Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *Neurodegener Dis* 5(1):16–22. doi:10.1159/000109933
16. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221(1-2):7–14. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.10.015
17. Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *The Lancet* 357(9270):1777–1789. doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7
18. Ulfing N, Ritschel G (2005) *Kurzlehrbuch Histologie*, 2. Aufl. Georg Thieme, Stuttgart
19. Hanke ML, Kielian T (2011) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 121(9):367–387. doi:10.1042/CS20110164

20. Migeotte I, Communi D, Parmentier M (2006) Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(6):501–519. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.09.009
21. Bihler K, Kress E, Esser S, Nyamoya S, Tauber SC, Clarner T, Stope MB, Pufe T, Brandenburg L-O (2017) Formyl Peptide Receptor 1-Mediated Glial Cell Activation in a Mouse Model of Cuprizone-Induced Demyelination. *J Mol Neurosci* 62(2):232–243. doi:10.1007/s12031-017-0924-y
22. Hernández-Pedro NY, Espinosa-Ramirez G, La Cruz VP de, Pineda B, Sotelo J (2013) Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. *Clin Dev Immunol* 2013:413465. doi:10.1155/2013/413465
23. Barry A, Cronin O, Ryan AM, Sweeney B, Yap SM, O'Toole O, Allen AP, Clarke G, O'Halloran KD, Downer EJ (2016) Impact of Exercise on Innate Immunity in Multiple Sclerosis Progression and Symptomatology. *Front Physiol* 7:194. doi:10.3389/fphys.2016.00194
24. Cattaneo F, Guerra G, Ammendola R (2010) Expression and signaling of formyl-peptide receptors in the brain. *Neurochem Res* 35(12):2018–2026. doi:10.1007/s11064-010-0301-5
25. Ransohoff RM, Brown MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 122(4):1164–1171. doi:10.1172/JCI58644
26. Yu Y, Ye RD (2015) Microglial A β receptors in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* 35(1):71–83. doi:10.1007/s10571-014-0101-6
27. Lehnardt S (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58(3):253–263. doi:10.1002/glia.20928
28. Mariani MM, Kielian T (2009) Microglia in infectious diseases of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 4(4):448–461. doi:10.1007/s11481-009-9170-6
29. Konat GW, Kielian T, Marriott I (2006) The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. *J Neurochem* 99(1):1–12. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04076.x
30. Ndubaku U, Bellard ME de (2008) Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem* 110(3):182–195. doi:10.1016/j.acthis.2007.10.003
31. Cussell PJG, Gomez Escalada M, Milton NGN, Paterson AWJ (2020) The N-formyl peptide receptors: contemporary roles in neuronal function and dysfunction. *Neural Regen Res* 15(7):1191–1198. doi:10.4103/1673-5374.272566
32. Prinz M, Priller J (2017) The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci* 20(2):136–144. doi:10.1038/nn.4475
33. Lee KH, Kronbichler A, Park DD-Y, Park Y, Moon H, Kim H, Choi JH, Choi Y, Shim S, Lyu IS, Yun BH, Han Y, Lee D, Lee SY, Yoo BH, Lee KH, Kim TL, Kim H, Shim JS, Nam W, So H, Choi S, Lee S, Shin JI (2017) Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 16(11):1160–1173. doi:10.1016/j.autrev.2017.09.012
34. Wilson AS, Randall KL, Pettitt JA, Ellyard JI, Blumenthal A, Enders A, Quah BJ, Bopp T, Parish CR, Brüstle A (2022) Neutrophil extracellular traps and their histones promote Th17 cell differentiation directly via TLR2. *Nat Commun* 13(1):528. doi:10.1038/s41467-022-28172-4
35. 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

36. 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
37. 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
38. 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
39. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S (2017) Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol* 27(2):123–137. doi:10.1111/bpa.12454
40. Carey EM, Freeman NM (1983) Biochemical changes in Cuprizone-induced spongiform encephalopathy. I. Changes in the activities of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase, oligodendroglial ceramide galactosyl transferase, and the hydrolysis of the alkenyl group of alkenyl, acyl-glycerophospholipids by plasmalogenase in different regions of the brain. *Neurochem Res* 8(8):1029–1044. doi:10.1007/BF00965198
41. Sen MK, Mahns DA, Coorssen JR, Shortland PJ (2019) Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination. *Neurosci Biobehav Rev* 107:23–46. doi:10.1016/j.neubiorev.2019.08.008
42. Torkildsen O, Brunborg LA, Myhr K-M, Bø L (2008) The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl* 188:72–76. doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x
43. 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
44. 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
45. Steelman AJ, Thompson JP, Li J (2012) Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. *Neurosci Res* 72(1):32–42. doi:10.1016/j.neures.2011.10.002
46. 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
47. 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
48. 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
49. 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
50. Kashani IR, Chavoshi H, Pasbakhsh P, Hassani M, Omid 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

51. 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
 52. Bjelobaba I, Savic D, Lavrnja I (2017) Multiple Sclerosis and Neuroinflammation: The Overview of Current and Prospective Therapies. *Curr Pharm Des* 23(5):693–730. doi:10.2174/1381612822666161214153108
 53. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 164(4):1079–1106. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
 54. Gold R, Lington C, Lassmann H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129(Pt 8):1953–1971. doi:10.1093/brain/awl075
 55. 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
 56. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med* 58(1):39–53. doi:10.1084/jem.58.1.39
 57. Rivers TM, Schwentker FF (1935) ENCEPHALOMYELITIS ACCOMPANIED BY MYELIN DESTRUCTION EXPERIMENTALLY PRODUCED IN MONKEYS. *J Exp Med* 61(5):689–702. doi:10.1084/jem.61.5.689
 58. Sriram S, Steiner I (2005) Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58(6):939–945. doi:10.1002/ana.20743
 59. Farooqi N, Gran B, Constantinescu CS (2010) Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *J Neurochem* 115(4):829–844. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06982.x
 60. 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
 61. 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
 62. Mannara F, Valente T, Saura J, Graus F, Saiz A, Moreno B (2012) Passive experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 with MOG: evidence of involvement of B cells. *PLoS ONE* 7(12):e52361. doi:10.1371/journal.pone.0052361
 63. Libbey JE, Tsunoda I, Fujinami RS (2010) Studies in the modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5(2):168–175. doi:10.1007/s11481-010-9215-x
 64. Scheld M, Rütther BJ, Große-Veldmann R, Ohi 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
 65. Rütther 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
66. Titus HE, Chen Y, Podojil JR, Robinson AP, Balabanov R, Popko B, Miller SD (2020) Pre-clinical and Clinical Implications of "Inside-Out" vs. "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Front Cell Neurosci* 14:599717. doi:10.3389/fncel.2020.599717
67. 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
68. Filippi M, Preziosa P, Banwell BL, Barkhof F, Ciccarelli O, Stefano N de, Geurts JJG, Paul F, Reich DS, Toosy AT, Traboulsee A, Wattjes MP, Yousry TA, Gass A, Lubetzki C, Weinshenker BG, Rocca MA (2019) Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain* 142(7):1858–1875. doi:10.1093/brain/awz144
69. Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM (1975) N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(3):1059–1062. doi:10.1073/pnas.72.3.1059
70. Ho CF-Y, Ismail NB, Koh JK-Z, Gunaseelan S, Low Y-H, Ng Y-K, Chua JJ-E, Ong W-Y (2018) Localisation of Formyl-Peptide Receptor 2 in the Rat Central Nervous System and Its Role in Axonal and Dendritic Outgrowth. *Neurochem Res* 43(8):1587–1598. doi:10.1007/s11064-018-2573-0
71. Li L, Chen K, Xiang Y, Yoshimura T, Su S, Zhu J, Bian X, Wang JM (2016) New development in studies of formyl-peptide receptors: critical roles in host defense. *J Leukoc Biol* 99(3):425–435. doi:10.1189/jlb.2RI0815-354RR
72. Migeotte I, Riboldi E, Franssen J-D, Grégoire F, Loison C, Wittamer V, Detheux M, Robberecht P, Costagliola S, Vassart G, Sozzani S, Parmentier M, Communi D (2005) Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. *J Exp Med* 201(1):83–93. doi:10.1084/jem.20041277
73. Raabe CA, Gröper J, Rescher U (2019) Biased perspectives on formyl peptide receptors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866(2):305–316. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.11.015
74. He H-Q, Liao D, Wang Z-G, Wang Z-L, Zhou H-C, Wang M-W, Ye RD (2013) Functional characterization of three mouse formyl peptide receptors. *Mol Pharmacol* 83(2):389–398. doi:10.1124/mol.112.081315
75. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM (2009) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev* 61(2):119–161. doi:10.1124/pr.109.001578
76. Rabiet M-J, Macari L, Dahlgren C, Boulay F (2011) N-formyl peptide receptor 3 (FPR3) departs from the homologous FPR2/ALX receptor with regard to the major processes governing chemoattractant receptor regulation, expression at the cell surface, and phosphorylation. *J Biol Chem* 286(30):26718–26731. doi:10.1074/jbc.M111.244590
77. Brink C, Dahlén S-E, Drazen J, Evans JF, Hay DWP, Nicosia S, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T (2003) International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol Rev* 55(1):195–227. doi:10.1124/pr.55.1.8
78. Gavins FNE (2010) Are formyl peptide receptors novel targets for therapeutic intervention in ischaemia-reperfusion injury? *Trends Pharmacol Sci* 31(6):266–276. doi:10.1016/j.tips.2010.04.001
-

79. Boulay F, Tardif M, Bouchon L, Vignais P (1990) The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 29(50):11123–11133. doi:10.1021/bi00502a016
80. Cooray SN, Gobbetti T, Montero-Melendez T, McArthur S, Thompson D, Clark AJL, Flower RJ, Perretti M (2013) Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(45):18232–18237. doi:10.1073/pnas.1308253110
81. Cattaneo F, Parisi M, Ammendola R (2013) Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. *Int J Mol Sci* 14(4):7193–7230. doi:10.3390/ijms14047193
82. Schloer S, Hübel N, Masemann D, Pajonczyk D, Brunotte L, Ehrhardt C, Brandenburg L-O, Ludwig S, Gerke V, Rescher U (2019) The annexin A1/FPR2 signaling axis expands alveolar macrophages, limits viral replication, and attenuates pathogenesis in the murine influenza A virus infection model. *FASEB J* 33(11):12188–12199. doi:10.1096/fj.201901265R
83. Radel SJ, Genco RJ, Nardin E de (1994) Structural and functional characterization of the human formyl peptide receptor ligand-binding region. *Infect Immun* 62(5):1726–1732. doi:10.1128/iai.62.5.1726-1732.1994
84. Ammendola R, Parisi M, Esposito G, Cattaneo F (2021) Pro-Resolving FPR2 Agonists Regulate NADPH Oxidase-Dependent Phosphorylation of HSP27, OSR1, and MARCKS and Activation of the Respective Upstream Kinases. *Antioxidants (Basel)* 10(1). doi:10.3390/antiox10010134
85. Gavins FNE, Hickey MJ (2012) Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. *Front Immunol* 3:354. doi:10.3389/fimmu.2012.00354
86. Radke S, Austermann J, Russo-Marie F, Gerke V, Rescher U (2004) Specific association of annexin 1 with plasma membrane-resident and internalized EGF receptors mediated through the protein core domain. *FEBS Lett* 578(1-2):95–98. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.078
87. Rescher U, Gerke V (2004) Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117(Pt 13):2631–2639. doi:10.1242/jcs.01245
88. Côté MC, Lavoie JR, Houle F, Poirier A, Rousseau S, Huot J (2010) Regulation of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by LIM kinase 1-mediated phosphorylation of annexin 1. *J Biol Chem* 285(11):8013–8021. doi:10.1074/jbc.M109.098665
89. Gerke V, Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82(2):331–371. doi:10.1152/physrev.00030.2001
90. Kelly L, McGrath S, Rodgers L, McCall K, Tulunay Virlan A, Dempsey F, Crichton S, Goodyear CS (2022) Annexin-A1: The culprit or the solution? *Immunology*. doi:10.1111/imm.13455
91. Vong L, D'Acquisto F, Pederzoli-Ribeil M, Lavagno L, Flower RJ, Witko-Sarsat V, Perretti M (2007) Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3. *J Biol Chem* 282(41):29998–30004. doi:10.1074/jbc.M702876200
92. Lim LH, Solito E, Russo-Marie F, Flower RJ, Perretti M (1998) Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24):14535–14539. doi:10.1073/pnas.95.24.14535
93. Gavins FNE, Yona S, Kamal AM, Flower RJ, Perretti M (2003) Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. *Blood* 101(10):4140–4147. doi:10.1182/blood-2002-11-3411

94. Perretti M, Croxtall JD, Wheller SK, Goulding NJ, Hannon R, Flower RJ (1996) Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat Med* 2(11):1259–1262. doi:10.1038/nm1196-1259
95. Parente L, Solito E (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res* 53(4):125–132. doi:10.1007/s00011-003-1235-z
96. Coupade C de, Solito E, Levine JD (2003) Dexamethasone enhances interaction of endogenous annexin 1 with L-selectin and triggers shedding of L-selectin in the monocytic cell line U-937. *Br J Pharmacol* 140(1):133–145. doi:10.1038/sj.bjp.0705413
97. Williams SL, Milne IR, Bagley CJ, Gamble JR, Vadas MA, Pitson SM, Khew-Goodall Y (2010) A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration. *J Immunol* 185(5):3057–3063. doi:10.4049/jimmunol.1000119
98. Ernst S, Lange C, Wilbers A, Goebeler V, Gerke V, Rescher U (2004) An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *J Immunol* 172(12):7669–7676. doi:10.4049/jimmunol.172.12.7669
99. Tagoe CE, Marjanovic N, Park JY, Chan ES, Abeles AM, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH (2008) Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol* 181(4):2813–2820. doi:10.4049/jimmunol.181.4.2813
100. Chatterjee BE, Yona S, Rosignoli G, Young RE, Nourshargh S, Flower RJ, Perretti M (2005) Annexin 1-deficient neutrophils exhibit enhanced transmigration in vivo and increased responsiveness in vitro. *J Leukoc Biol* 78(3):639–646. doi:10.1189/jlb.0405206
101. Reddy RC, Standiford TJ (2010) Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol* 17(1):18–24. doi:10.1097/MOH.0b013e32833338f3
102. Gavins FNE, Dalli J, Flower RJ, Granger DN, Perretti M (2007) Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. *FASEB J* 21(8):1751–1758. doi:10.1096/fj.06-7842com
103. Babbin BA, Laukoetter MG, Nava P, Koch S, Lee WY, Capaldo CT, Peatman E, Severson EA, Flower RJ, Perretti M, Parkos CA, Nusrat A (2008) Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *J Immunol* 181(7):5035–5044. doi:10.4049/jimmunol.181.7.5035
104. Spurr L, Nadkarni S, Pederzoli-Ribeil M, Goulding NJ, Perretti M, D'Acquisto F (2011) Comparative analysis of Annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX expression in human leukocyte subsets. *Int Immunopharmacol* 11(1):55–66. doi:10.1016/j.intimp.2010.10.006
105. Grewal T, Wason SJ, Enrich C, Rentero C (2016) Annexins - insights from knockout mice. *Biol Chem* 397(10):1031–1053. doi:10.1515/hsz-2016-0168
106. Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, Roviezzo F, Yona S, Paul-Clark MJ, Gavins FNE, Perretti M, Morris JF, Buckingham JC, Flower RJ (2003) Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J* 17(2):253–255. doi:10.1096/fj.02-0239fje
107. Kao W, Gu R, Jia Y, Wei X, Fan H, Harris J, Zhang Z, Quinn J, Morand EF, Yang YH (2014) A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis. *Br J Pharmacol* 171(17):4087–4096. doi:10.1111/bph.12768
108. Dufton N, Perretti M (2010) Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacology & Therapeutics* 127(2):175–188. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.04.010
109. LE Y, OPPENHEIM J, WANG J (2001) Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 12(1):91–105. doi:10.1016/s1359-6101(01)00003-x
110. Li W, Jiang H, Bai C, Yu S, Pan Y, Wang C, Li H, Li M, Sheng Y, Chu F, Wang J, Chen Y, Li J, Jiang J (2022) Ac2-26 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in

- mice via regulating IL-22/IL-22R1/STAT3 signaling. *PeerJ* 10:e14086.
doi:10.7717/peerj.14086
111. Nylander A, Hafler DA (2012) Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 122(4):1180–1188.
doi:10.1172/JCI58649
112. Colamatteo A, Maggioli E, Azevedo Loiola R, Hamid Sheikh M, Cali G, Bruzzese D, Maniscalco GT, Centonze D, Buttari F, Lanzillo R, Perna F, Zuccarelli B, Mottola M, Cassano S, Galgani M, Solito E, Rosa V de (2019) Reduced Annexin A1 Expression Associates with Disease Severity and Inflammation in Multiple Sclerosis Patients. *J Immunol* 203(7):1753–1765. doi:10.4049/jimmunol.1801683
113. Perretti M, D'Acquisto F (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 9(1):62–70. doi:10.1038/nri2470
114. Probst-Cousin S, Kowolik D, Kuchelmeister K, Kayser C, Neundörfer B, Heuss D (2002) Expression of annexin-1 in multiple sclerosis plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28(4):292–300. doi:10.1046/j.1365-2990.2002.00396.x
115. Bolton C, ELDERFIELD A, FLOWER R (1990) The detection of lipocortins 1, 2 and 5 in central nervous system tissues from Lewis rats with acute experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 29(1-3):173–181. doi:10.1016/0165-5728(90)90160-o
116. Elderfield A-J, Newcombe J, Bolton C, Flower RJ (1992) Lipocortins (annexins) 1, 2, 4 and 5 are increased in the central nervous system in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 39(1-2):91–100. doi:10.1016/0165-5728(92)90178-N
117. Yool DA, Klugmann M, McLaughlin M, Vouyiouklis DA, Dimou L, Barrie JA, McCulloch MC, Nave K-A, Griffiths IR (2001) Myelin proteolipid proteins promote the interaction of oligodendrocytes and axons. *J. Neurosci. Res.* 63(2):151–164. doi:10.1002/1097-4547(20010115)63:2<151::AID-JNR1007>3.0.CO;2-Y
118. Guerrero BL, Sicotte NL (2020) Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol* 11:374. doi:10.3389/fimmu.2020.00374
119. Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H (2017) Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 79:619–643. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034406
120. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004) Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88(4):844–856. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x
121. GOULDING N (1990) Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *The Lancet* 335(8703):1416–1418. doi:10.1016/0140-6736(90)91445-g
122. Morand EF, Hutchinson P, Hargreaves A, Goulding NJ, Boyce NW, Holdsworth SR (1995) Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol* 76(2):195–202. doi:10.1006/clin.1995.1115
123. Wekerle H (2017) B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 50(1):57–60. doi:10.1080/08916934.2017.1281914
124. Ribeiro AB, Caloi CM, Pimenta STS, Seshayyan S, Govindarajulu S, Souto FJD, Damazo AS (2020) Expression of annexin-A1 in blood and tissue leukocytes of leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 53:e20200277. doi:10.1590/0037-8682-0277-2020
125. Reinbach C, Stadler M-S, Pröbstl N, Chrzanowski U, Schmitz C, Kipp M, Hochstrasser T (2020) CD44 expression in the cuprizone model. *Brain Res* 1745:146950. doi:10.1016/j.brainres.2020.146950
126. McArthur S, Cristante E, Paterno M, Christian H, Roncaroli F, Gillies GE, Solito E (2010) Annexin A1: a central player in the anti-inflammatory and neuroprotective role of microglia. *J Immunol* 185(10):6317–6328. doi:10.4049/jimmunol.1001095
-

127. Strzalka W, Ziemienowicz A (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot* 107(7):1127–1140. doi:10.1093/aob/mcq243
128. Klein B, Mrowetz H, Barker CM, Lange S, Rivera FJ, Aigner L (2018) Age Influences Microglial Activation After Cuprizone-Induced Demyelination. *Front Aging Neurosci* 10:278. doi:10.3389/fnagi.2018.00278
129. Xia W, Zhu J, Wang X, Tang Y, Zhou P, Hou M, Li S (2020) ANXA1 directs Schwann cells proliferation and migration to accelerate nerve regeneration through the FPR2/AMPK pathway. *FASEB J* 34(10):13993–14005. doi:10.1096/fj.202000726RRR
130. Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, Urra X, Chamorro A, Planas AM (2015) Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathol* 129(2):239–257. doi:10.1007/s00401-014-1381-0
131. Woodberry T, Bouffler SE, Wilson AS, Buckland RL, Brüstle A (2018) The Emerging Role of Neutrophil Granulocytes in Multiple Sclerosis. *J Clin Med* 7(12). doi:10.3390/jcm7120511
132. Procaccini C, Rosa V de, Pucino V, Formisano L, Matarese G (2015) Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol* 759:182–191. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.042
133. 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
134. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N (1992) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356(6364):63–66. doi:10.1038/356063a0
135. Robinson AP, HARP CT, NORONHA A, Miller SD (2014) The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* 122:173–189. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X
136. Steinman L, Zamvil SS (2006) How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60(1):12–21. doi:10.1002/ana.20913
137. 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
138. Correale J, Gaitán MI, Ysrraelit MC, Fiol MP (2017) Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain* 140(3):527–546. doi:10.1093/brain/aww258
139. Amor S, Baker D (2012) Checklist for reporting and reviewing studies of experimental animal models of multiple sclerosis and related disorders. *Mult Scler Relat Disord* 1(3):111–115. doi:10.1016/j.msard.2012.01.003
140. van der Valk P, Amor S (2009) Preactive lesions in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 22(3):207–213. doi:10.1097/WCO.0b013e32832b4c76
141. 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
142. Groot CJ de, Bergers E, Kamphorst W, Ravid R, Polman CH, Barkhof F, van der Valk P (2001) Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions: increased

- yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. *Brain* 124(Pt 8):1635–1645. doi:10.1093/brain/124.8.1635
143. Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55(4):458–468. doi:10.1002/ana.20016
 144. Rodriguez M, Scheithauer B (1994) Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 18(1-2):3–13. doi:10.3109/01913129409016267
 145. Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Stefferl A, Brück W, Lucchinetti C, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H (2003) Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(1):25–33. doi:10.1093/jnen/62.1.25
 146. Johnson ES, Ludwin SK (1981) The demonstration of recurrent demyelination and remyelination of axons in the central nervous system. *Acta Neuropathol* 53(2):93–98. doi:10.1007/BF00689988
 147. 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. doi:10.1016/s0165-5728(02)00205-9
 148. Sen MK, Almuslehi MSM, Gyengesi E, Myers SJ, Shortland PJ, Mahns DA, Coorsen 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
 149. Bakker DA, Ludwin SK (1987) Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. *Journal of the Neurological Sciences* 78(2):125–137. doi:10.1016/0022-510x(87)90055-4
 150. Shelestak J, Singhal N, Frankle L, Tomor R, Sternbach S, McDonough J, Freeman E, Clements R (2020) Increased blood-brain barrier hyperpermeability coincides with mast cell activation early under cuprizone administration. *PLoS ONE* 15(6):e0234001. doi:10.1371/journal.pone.0234001
 151. 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* 10:916. doi:10.3389/fneur.2019.00916
 152. Pröbstl N (2018) Die Expression von CD44 in murinen Multiple Sklerose Tiermodellen, Ludwig-Maximilians-Universität München
 153. 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 L-O (2020) Inhibition of formyl peptide receptors improves the outcome in a mouse model of Alzheimer disease. *J Neuroinflammation* 17(1):131. doi:10.1186/s12974-020-01816-2
 154. Ries M, Loiola R, Shah UN, Gentleman SM, Solito E, Sastre M (2016) The anti-inflammatory Annexin A1 induces the clearance and degradation of the amyloid- β peptide. *J Neuroinflammation* 13(1):234. doi:10.1186/s12974-016-0692-6
 155. Gavins FNE, Hughes EL, Buss NAPS, Holloway PM, Getting SJ, Buckingham JC (2012) Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-FPR2/ALX anti-inflammatory system. *FASEB J* 26(12):4977–4989. doi:10.1096/fj.12-205971
 156. Cristante E, McArthur S, Mauro C, Maggioli E, Romero IA, Wylezinska-Arridge M, Couraud PO, Lopez-Tremoleda J, Christian HC, Weksler BB, Malaspina A, Solito E (2013) Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(3):832–841. doi:10.1073/pnas.1209362110

157. 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
 158. Bakker DA, Ludwin SK (1987) Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *Journal of the Neurological Sciences* 78(2):125–137
 159. 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
 160. 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
 161. 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
 162. Perretti M, Christian H, Wheller SK, Aiello I, Mugridge KG, Morris JF, Flower RJ, Goulding NJ (2000) Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. *Cell Biol Int* 24(3):163–174. doi:10.1006/cbir.1999.0468
 163. Araújo TG, Mota STS, Ferreira HSV, Ribeiro MA, Goulart LR, Vecchi L (2021) Annexin A1 as a Regulator of Immune Response in Cancer. *Cells* 10(9). doi:10.3390/cells10092245
 164. Oliani SM, Christian HC, Manston J, Flower RJ, Perretti M (2000) An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. *Lab Invest* 80(9):1429–1438. doi:10.1038/labinvest.3780150
 165. Gan H, Lee J, Ren F, Chen M, Kornfeld H, Remold HG (2008) Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat Immunol* 9(10):1189–1197. doi:10.1038/ni.1654
 166. Harricane MC, Caron E, Porte F, Liautard JP (1996) Distribution of annexin I during non-pathogen or pathogen phagocytosis by confocal imaging and immunogold electron microscopy. *Cell Biol Int* 20(3):193–203. doi:10.1006/cbir.1996.0024
 167. Kaskow BJ, Baecher-Allan C (2018) Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(4). doi:10.1101/cshperspect.a029025
 168. Castillo-Trivino T, Braithwaite D, Bacchetti P, Waubant E (2013) Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review. *PLoS ONE* 8(7):e66308. doi:10.1371/journal.pone.0066308
 169. Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL (2017) Ocrelizumab and Other CD20+ B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* 14(4):835–841. doi:10.1007/s13311-017-0557-4
 170. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G (2013) Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84(8):909–914. doi:10.1136/jnnp-2012-304695
 171. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, Calabresi PA, Waubant E, Hauser SL, Zhang J, Smith CH (2010) Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol* 67(4):452–461. doi:10.1002/ana.21939
-

172. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R, Reynolds R (2011) Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 134(Pt 9):2755–2771. doi:10.1093/brain/awr182
173. Lassmann H, Bradl M (2017) Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133(2):223–244. doi:10.1007/s00401-016-1631-4
174. 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(Pt 5):1175–1189. doi:10.1093/brain/awp070
175. 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
176. Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, Cui L (2018) The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 318:1–7. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.02.015
177. Zia S, Rawji KS, Michaels NJ, Burr M, Kerr BJ, Healy LM, Plemel JR (2020) Microglia Diversity in Health and Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 11:588021. doi:10.3389/fimmu.2020.588021
178. Huitinga I, Bauer J, Strijbos PJ, Rothwell NJ, Dijkstra CD, Tilders FJ (1998) Effect of annexin-1 on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the rat. *Clin Exp Immunol* 111(1):198–204. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00490.x
179. Prinz M, Jung S, Priller J (2019) Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 179(2):292–311. doi:10.1016/j.cell.2019.08.053
180. You J-E, Jung S-H, Kim P-H (2021) The Effect of Annexin A1 as a Potential New Therapeutic Target on Neuronal Damage by Activated Microglia. *Mol Cells* 44(4):195–206. doi:10.14348/molcells.2021.0020
181. Correale J, Farez MF (2015) The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Front Neurol* 6:180. doi:10.3389/fneur.2015.00180
182. Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL (2012) The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev* 248(1):170–187. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01135.x
183. Guzmán-Aránguez A, Olmo N, Turnay J, Lecona E, Pérez-Ramos P, López de Silanes I, Lizarbe MA (2005) Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 94(1):178–193. doi:10.1002/jcb.20293
184. Kotepui KU, Obchoei S, Vaeteewoottacharn K, Okada S, Wongkham S, Sawanyawisuth K (2022) Annexin A1 Is a Potential Prognostic Marker for, and Enhances the Metastasis of, Cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 23(2):715–721. doi:10.31557/APJCP.2022.23.2.715
185. Foo SL, Yap G, Cui J, Lim LHK (2019) Annexin-A1 - A Blessing or a Curse in Cancer? *Trends Mol Med* 25(4):315–327. doi:10.1016/j.molmed.2019.02.004
186. Lim LHK, Pervaiz S (2007) Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J* 21(4):968–975. doi:10.1096/fj.06-7464rev
187. Masaki T, Tokuda M, Fujimura T, Ohnishi M, Tai Y, Miyamoto K, Itano T, Matsui H, Watanabe S, Sogawa K (1994) Involvement of annexin I and annexin II in hepatocyte proliferation: can annexins I and II be markers for proliferative hepatocytes? *Hepatology* 20(2):425–435

188. Park JW, Jung K-H, Lee JH, Moon SH, Cho YS, Lee K-H (2021) ⁸⁹Zr anti-CD44 immuno-PET monitors CD44 expression on splenic myeloid cells and HT29 colon cancer cells. *Sci Rep* 11(1):3876. doi:10.1038/s41598-021-83496-3
189. Girgrah N, Letarte M, Becker LE, Cruz TF, Theriault E, Moscarello MA (1991) Localization of the CD44 glycoprotein to fibrous astrocytes in normal white matter and to reactive astrocytes in active lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 50(6):779–792. doi:10.1097/00005072-199111000-00009
190. Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW (1980) Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10(10):737–744. doi:10.1002/eji.1830101003
191. Bondt M de, Hellings N, Opdenakker G, Struyf S (2020) Neutrophils: Underestimated Players in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS). *Int J Mol Sci* 21(12). doi:10.3390/ijms21124558
192. Yakimov V, Schweiger F, Zhan J, Behrangi N, Horn A, Schmitz C, Hochstrasser T, Kipp M (2019) Continuous cuprizone intoxication allows active experimental autoimmune encephalomyelitis induction in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* 152(2):119–131. doi:10.1007/s00418-019-01786-4
193. Steinbach K, Piedavent M, Bauer S, Neumann JT, Friese MA (2013) Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs. *J Immunol* 191(9):4531–4539. doi:10.4049/jimmunol.1202613
194. Bruschi M, Petretto A, Vaglio A, Santucci L, Candiano G, Ghiggeri GM (2018) Annexin A1 and Autoimmunity: From Basic Science to Clinical Applications. *Int J Mol Sci* 19(5). doi:10.3390/ijms19051348
195. Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, Turano E, Rossi B, Angiari S, Dusi S, Montresor A, Carlucci T, Nani S, Tosadori G, Calciano L, Catalucci D, Berton G, Bonetti B, Constantin G (2015) Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med* 21(8):880–886. doi:10.1038/nm.3913
196. Strecker J-K, Schmidt A, Schäbitz W-R, Minnerup J (2017) Neutrophil granulocytes in cerebral ischemia - Evolution from killers to key players. *Neurochem Int* 107:117–126. doi:10.1016/j.neuint.2016.11.006
197. Papayannopoulos V (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 18(2):134–147. doi:10.1038/nri.2017.105
198. Naegele M, Tillack K, Reinhardt S, Schipling S, Martin R, Sospedra M (2012) Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. *J Neuroimmunol* 242(1-2):60–71. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.11.009
199. Ansari J, Senchenkova EY, Vital SA, Al-Yafeai Z, Kaur G, Sparkenbaugh EM, Orr AW, Pawlinski R, Hebbel RP, Granger DN, Kubes P, Gavins FNE (2021) Targeting the AnxA1/Fpr2/ALX pathway regulates neutrophil function, promoting thromboinflammation resolution in sickle cell disease. *Blood* 137(11):1538–1549. doi:10.1182/blood.2020009166

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

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

14. DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut der Anatomie der Universität Rostock unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Lars-Ove Brandenburg für die herausragende Betreuung und die vielen Anregungen im Rahmen dieser Arbeit.

Sein Engagement und die enorme Unterstützung der gesamten Arbeit waren mir eine große Motivation bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Herrn Dr. med. Hannes Kaddatz danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft, die exzellente und unkomplizierte fachliche Betreuung, sowohl bei der Einarbeitung in die laborexperimentellen Methoden als auch bei der inhaltlichen Ausgestaltung dieser Arbeit. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

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.

Für die sprachlichen Korrekturen und die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Mathis Ruf.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für die unbegrenzte Unterstützung und lieben Worte während der gesamten Zeit.

Meinem Ehemann danke ich für seine Geduld, die vielen Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.

15. WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name, Vorname	Ruf, Alina
Geburtsdatum	15.11.1994
Geburtsort	Basingstoke (GB)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Beruflicher Werdegang

Zahnärzte Bergstraße | Assistenz Zahnärztin

01/2020 – 09/2022

Zahnarztpraxis Dr. Dörte Möller | Angestellte Zahnärztin

Seit 10/2022

Akademischer Werdegang

16.10.2019 – Zahnärztliche Prüfung

04.04.2017 – Zahnärztliche Vorprüfung

01.09.2015 – Naturwissenschaftliche Vorprüfung

seit 06.10.2014 Studium der Zahnmedizin an der Universität Rostock

05.07.2013 Allgemeine Hochschulreife

Rudolf-Hildebrand-Gymnasium, 04416 Markkleeberg