

Aus dem Institut für Anatomie

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

# Immunzellmigrationsrouten in Multiple Sklerose Mausmodellen

---

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

Vorgelegt von

Theresa Maria Greiner | geb. am 04.01.1998 in Rostock  
aus Rostock | 2022

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00004608](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004608)

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

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp

Universitätsmedizin Rostock, Institut für Anatomie

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg. B. Schulz

Universitätsklinik RWTH Aachen, Klinik für Neurologie

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Zettl

Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Neurologie

Datum der Einreichung: 12.07.2022

Datum der Verteidigung: 21.02.2023

## **Inhaltsverzeichnis**

---

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.1.1 Klinische Aspekte.....	1
1.1.2 Neuropathologie und inflammatorische Prozesse der MS .....	2
1.1.3 Rolle von proinflammatorischen Zytokinen .....	4
1.2 Das Zentralnervensystem als immunprivilegierter Raum.....	5
1.2.1 Grenzstrukturen an der Gehirnoberfläche .....	5
1.2.2 Blut-Hirn-Schranke .....	7
1.2.3 Aufbau des Plexus choroideus und der Blut-Liquor-Schranke.....	10
1.2.4 Immunzellmigrationsrouten in das Zentralnervensystem.....	11
1.3 Mausmodelle der Multiplen Sklerose .....	15
1.3.1 Cuprizone-Modell .....	15
1.3.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	17
1.3.3 Kombination aus Cuprizone und EAE.....	18
1.4 Fragestellung.....	19
1.4.1 Die Migrationsroute innerhalb des PVS penetrierender Gefäße .....	19
1.4.2 Die Migrationsroute innerhalb des Stromas des Plexus choroideus .....	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Tierversuchsaufbau.....	22
2.1.1 Versuchstierhaltung.....	22
2.1.2 Versuchsgruppen .....	22
2.1.3 Klinische Beurteilung der Mäuse .....	23
2.1.4 Transkardiale Perfusion und Paraffineinbettung .....	25

2.2	Histologie und Immunhistochemie .....	26
2.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	26
2.2.2	Indirekte Immunhistochemie .....	28
2.2.3	Immunfluoreszenzdoppelmarkierung.....	33
2.3	Histologische Auswertung .....	35
2.3.1	Auswertung von HE-Färbungen.....	35
2.3.2	Auswertung der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung I .....	36
2.3.3	Auswertung der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung II .....	36
2.3.4	Auswertung der optischen Dichte .....	37
2.3.5	Auswertung der optischen Dichte in Schichten.....	38
2.4	Untersuchung von Genexpressionen .....	40
2.4.1	Gewebeaufbereitung.....	40
2.4.2	RNA-Isolation .....	40
2.4.3	Reverse Transkription.....	42
2.4.4	Kontroll-Polymerase-Ketten-Reaktion .....	43
2.4.5	Quantitative Echtzeit-PCR .....	47
2.5	Statistische Auswertungen.....	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Meningeale Migrationsroute .....	53
3.1.1	T-Zellen im perivaskulären Raum .....	53
3.1.2	T-Zellen entlang des perivaskulären Raums penetrierender Gefäße .....	53
3.1.3	Genexpressionsuntersuchung der Meningen .....	56
3.2	Choroidale Migrationsroute .....	58
3.2.1	Morphologie des murinen Plexus choroideus .....	59
3.2.2	Grenzstrukturen an der lateralen Anheftungsstelle.....	63
3.2.3	Grenzstrukturen an der medialen Anheftungsstelle.....	66

4	Diskussion .....	71
4.1	Diskussion der Methoden .....	71
4.1.1	Tiermodelle .....	71
4.1.2	Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und histologische Färbungen.....	74
4.1.3	Genexpressionsuntersuchungen mittels qRT-PCR .....	76
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	78
4.2.1	Meningeale Migrationsroute .....	78
4.2.2	Choroidale Migrationsroute .....	82
4.3	Fazit .....	85
5	Zusammenfassung .....	86
6	Thesen .....	87
7	Literatur .....	VIII
8	Anhang .....	XXIX
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	XXIX
8.2	Tabellenverzeichnis.....	XXX
8.3	Materialien und Chemikalien.....	XXXI
8.4	Puffer, Blockseren und Färbelösungen .....	XXXIII
8.5	Verwendete Antikörper.....	XXXV
8.6	EAE-Scores Tierversuch .....	XXXVI
9	Danksagung .....	XXXVII
10	Eidesstattliche Erklärung .....	XXXVIII
11	Lebenslauf .....	XXXIX

## Abkürzungsverzeichnis

---

ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AQP1	Aquaporin 1
Aqua dest.	aqua destillata, destilliertes Wasser
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basen Paare
ca.	circa
CCL2	$\alpha$ -Chemokinligand 2
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary deoxyribonucleic acid)
CIS	klinisch isoliertes Syndrom (engl. clinically isolated syndrome)
CLDN5	Claudin 5
CT-Wert	Schwellenwertzyklus (engl. threshold cycle)
Cup	Cuprizone
Cup/EAE	Kombiniertes Cuprizone und EAE Mausmodell
CXCL10	$\beta$ -Chemokin Ligand 10
CXCR3	$\beta$ -Chemokin Rezeptor 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	et alia
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein)

HCl	Chlorwasserstoffsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIER	Demaskierung (engl. heat induced epitope retrieval)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IBA1	ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül 1 (engl. ionized calcium binding adapter molecule-1)
IFN $\gamma$	Interferon gamma
ICAM1	Interzellulär-Adhäsionsmolekül 1 (engl. intercellular adhesion molecule 1)
IL1beta	Interleukin-1-beta
IL-6	Interleukin-6
K <sup>+</sup>	Kalium
MBP	basisches Myelinprotein (engl. myelin basic protein)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
M-MLV	Moloney murines Leukämie-Virus
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
MRT	Magnetresonanztomographie
MOG <sub>35-55</sub>	Myelin-Oligodendrozyten-Protein 35-55
MS	Multiple Sklerose
Na <sup>+</sup>	Natrium
NOD	nicht fettleibige Diabetes Mäuse (engl. non-obese diabetic)
PBS	Phosphatpufferlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	pimär-progressive MS
PTX	Pertussis-Toxin
PVS	perivaskulärer Raum (engl. perivascular space)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR (engl. quantitative realtime PCR)

---

RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (eng. relative fluorescence units)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROI	region of interest
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. relapsing-remitting MS)
RT	reverse Transkriptase
SAS	Subarachnoidalraum (engl. subarachnoid space)
SFO	Subfornikal Organ
SPMS	sekundär-progressiv MS (engl. secondary-progressive MS)
SQ	Starting Quantity
TGF $\beta$ -2	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ -2 (engl. transforming growth factor $\beta$ -2)
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VCAM1	Gefäßzelladhäsionsmolekül 1 (engl. vascular adhesion molecule 1)
VLA-4	Alpha-4-Integrin (engl. very late antigen 4)
ZNS	Zentralnervensystem
ZO1	Zonula occludens Protein 1
ZVO	Zirkumventrikuläres Organ
5WCup	fünf Wochen Cuprizone



# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose

---

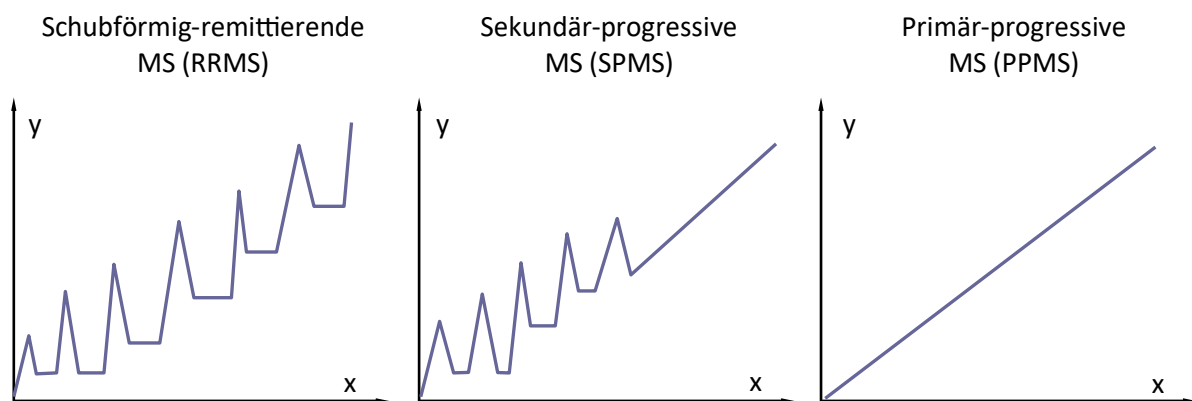
Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche neurodegenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), von der weltweit über zwei Millionen Menschen betroffen sind [1]. Durch die Erkrankung kommt es im ZNS zu fokal-demyelinisierenden Läsionen, einer daraus resultierenden Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit sowie einem Verlust von Axonen und Synapsen [2]. Das Krankheitsbild der MS ist sehr heterogen und unter anderem durch motorische und sensible Ausfälle gekennzeichnet. Die Heterogenität der Symptome ist Folge der unterschiedlichen Lokalisation der MS-Läsionen innerhalb des ZNS [3]. Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht geklärt, diskutiert werden verschiedene Einflussfaktoren wie eine genetische Prädisposition [4] oder Umwelteinflüsse in Form von Infektionen, Impfungen und Nikotinabusus [5,6]. Kürzlich konnte in einer longitudinalen Studie gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus das Risiko an MS zu erkranken deutlich erhöht [7].

### 1.1.1 Klinische Aspekte

---

Im Verlauf der MS kommt es zu vollständig oder teilweise reversiblen bis hin zu irreversiblen Episoden neurologischer Störungen. Klinisch können unterschiedliche Verlaufsformen der MS abgegrenzt werden [8] (Abbildung 1.1.1). Die schubförmig remittierende MS (engl. relapsing remitting MS, RRMS) betrifft 85 % der MS-Patienten und ist damit die häufigste Form der MS [9]. Die RRMS ist durch Schübe neurologischer Symptomatik, gefolgt von einer Phase der Remission mit Symptomlosigkeit oder Verringerung der Symptomatik, gekennzeichnet. Etwa 10 bis 15 Jahre nach Beginn kann die RRMS in eine sekundär progressive MS (SPMS) ohne Phasen der Remission übergehen [10]. Die klinische Diagnose der SPMS wird retrospektiv gestellt, da der Übergang graduell ist und bisher keine klinischen, pathologischen oder immunologischen Kriterien zu sicheren Diagnosestellung vorhanden sind [11]. Die Symptomatik der SPMS verschlechtert sich fortschreitend und kann durch einzelne, aufgesetzte Schübe verstärkt werden. Tritt der progressive Verlauf ohne eine vorherige RRMS ein, spricht man von der primär progressiven MS (PPMS). Diese Form zeigt sich bei etwa 15 % der Patienten [12].

Bei etwa 85 % der MS-Patienten tritt zunächst ein klinisch isoliertes Syndrom (engl. clinically isolated syndrome, CIS) auf [13,14]. Das CIS zeigt die klinischen Symptome eines demyelinisierenden inflammatorischen Ereignisses, erfüllt aber nicht alle Kriterien in der Diagnostik nach McDonald [15]. Erst wenn in einer T2-gewichteten Magnetresonanztomographie (MRT) und der Untersuchung des Liquors örtlich und zeitlich disseminierte Läsionen nachgewiesen werden konnten, kann eine MS-Diagnose nach den momentan gültigen McDonald-Kriterien gestellt werden [16].



**Abbildung 1.1.1 Verlaufsformen der MS**

Schematische Darstellung der Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (MS), Schwere der Symptomatik (y) in Abhängigkeit von der Zeit nach Krankheitsbeginn (x).

### 1.1.2 Neuropathologie und inflammatorische Prozesse der MS

---

Bei der MS treten histopathologisch Demyelinisierung und axonaler Schaden in herdförmigen, inflammatorischen Läsionen auf. Diese MS-Läsionen können im gesamten ZNS auftreten, betreffen jedoch vorrangig die weiße Substanz. Prädilektionsstellen sind insbesondere periventrikuläre und juxtakortikale Regionen, das *Corpus callosum*, die *Pons*, das *Cerebellum* und das Rückenmark [17]. Neben Demyelinisierung, Inflammation und einem Untergang der Axone kommt es in den MS-Läsionen zu einer reaktiven Gliose [18,19]. Das Ausmaß des akuten axonalen Schadens korreliert positiv mit dem Ausmaß der Inflammation und ist in akut-entzündlichen Läsionen am größten [19,20]. Die MS-Läsionen können histopathologisch nach dem Muster der inflammatorischen Aktivität und der Demyelinisierung in Subtypen unterteilt werden [21]. Alle Läsionen mit einer aktiven Demyelinisierung weisen perivaskuläre Ansammlungen von Immunzellen und eine Infiltration dieser Immunzellen ins Parenchym auf [22,23]. Die perivaskulären Infiltrate können neben T-Zellen und Makrophagen auch B-Zellen und Plasmazellen enthalten [24]. Im demyelinisierten Parenchym

sind B-Zellen und Plasmazellen weniger zu finden [23]. In der SPMS treten perivaskuläre Infiltrate auch im Bereich der zerebralen Leptomeningen auf. In den Meningen von RRMS-Patienten sind hingegen seltener perivaskuläre Infiltrate, aber verstreute T-Zellen zu finden. In der SPMS wurde weiterhin die Bildung von Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen in den Meningen beschrieben [23]. Diese Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen bestehen aus semiorganisierten, kompartmentalisierten Ansammlungen von B-Zellen, enthalten aber auch T-Zellen [23,25]. Sie ähneln den in anderen autoimmunen Erkrankungen beschriebenen ektopten Lymphfollikeln, denen eine Bedeutung beim Ursprung der Inflammation zugeschrieben wird [26,27]. In etwa 40 % der *post mortem* untersuchten SPMS-Fälle konnten solche Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen nachgewiesen werden [25]. Ihre Bedeutung für die Pathogenese der MS ist bislang unklar, zugeschrieben wird ihnen eine Verstärkung der myelinspezifischen T-Zellantwort [28].

Die Mehrheit der Immunzellen in den Infiltraten besteht aus Monozyten und von Monozyten abgeleiteten Zellen, gefolgt von T-Zellen [29]. Quantitativ dominieren in den parenchymalen und perivaskulären Infiltraten von MS-Läsionen die T-Zellen gegenüber den B-Zellen etwa um den Faktor zehn [30]. Dabei ist die Menge der infiltrierenden T- und B-Zellen in der RRMS verglichen mit den progressiven Verlaufsformen deutlich höher [30,31]. Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf den T-Zellen. T-Zellen reifen im Thymus und differenzieren sich hier in zwei Untergruppen (engl. cluster of differentiation, CD): CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. CD3 ist ein Transmembranprotein und als Korezeptor des T-Zellrezeptors auf allen T-Zellen exprimiert. CD3 kann daher als Pan-T-Zellmarker verwendet werden. Nach der Reifung im Thymus zirkulieren naive T-Zellen in der Peripherie zwischen dem Blut und den sekundären lymphatischen Organen. Naive T-Zellen differenzieren nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen in den aktivierten Zustand. Dieses Antigen wird ihnen durch eine antigenpräsentierende Zelle (APZ) über Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. major histocompatibility complex, MHC) präsentiert. CD4<sup>+</sup> Zellen interagieren mit MHC II und CD8<sup>+</sup> Zellen mit MHC I. Die aktivierten T-Zellen haben die Fähigkeit zur Extravasation und Migration in inflammatorisches Gewebe. Nach der Migration der T-Zellen in das Parenchym sezernieren CD4<sup>+</sup> Zellen proinflammatorische Zytokine zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen. CD8<sup>+</sup> Zellen lösen in Zielzellen durch die Sekretion von Effektormolekülen eine Apoptose aus. In den

Infiltraten von MS-Läsionen dominieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen über CD4<sup>+</sup> T-Zellen [30,32,33]. B-Zellen reifen im Knochenmark. Nach dem Kontakt einer naiven B-Zelle mit einem Antigen, wird dieses von der B-Zelle über MHC II präsentiert und von einer T-Helferzelle erkannt. Die Aktivierung der B-Zelle erfolgt über Zytokine, welche von T-Helferzellen produziert werden. Aktivierte B-Zellen können sich in B-Gedächtniszellen und Antikörper produzierende Plasmazellen differenzieren.

Der Funktionsverlust der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist ein weiteres Charakteristikum der MS [34]. Im MRT zeigt sich dieser Funktionsverlust in frischen Läsionen durch eine Anreicherung des Kontrastmittels Gadolinium im Gewebe [35,36]. In histopathologischen Studien konnte gezeigt werden, dass der durch Gadolinium angezeigte Funktionsverlust der BHS mit der inflammatorischen Aktivität in den Läsionen korreliert [35,37]. Anhand einer veränderten Organisation des Verschlusskontakte-Proteins (engl. Tight Junction) Zonula occludens Protein 1 (ZO1) konnte weiterhin gezeigt werden, dass die BHS in Läsionen mit einer stark ausgeprägten Inflammation auch stärker aufgelockert ist [38,39]. Zusätzlich kann in solchen Läsionen das Endothel über das Muskelprotein Dysferlin dargestellt werden, da dieses nur an Gefäßen mit einer undichten BHS von den Endothelzellen expremiert wird [40].

### **1.1.3 Rolle von proinflammatorischen Zytokinen**

---

Die Infiltration peripherer Lymphozyten wird durch proinflammatorische Zytokine und Chemokine gefördert, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), Interferon gamma (INF $\gamma$ ), Interleukin-1-beta (IL1beta), Interleukin-6 (IL6),  $\alpha$ -Chemokinligand-2 (CCL2) oder  $\beta$ -Chemokinligand-10 (CXCL10) [41,42]. Viele dieser Zytokine liegen in Liquor und Serum von MS-Patienten in erhöhter Konzentration vor, wie zum Beispiel das Chemokin CXCL10 [41]. CXCL10 wirkt chemotaktisch auf T-Zellen [43] und wird von Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Endothelzellen [44] und Astrozyten gebildet [45]. Der  $\beta$ -Chemokin Rezeptor 3 (CXCR3), ein Rezeptor für CXCL10, ist auf etwa 80-90 % der T-Zellen im Liquor von MS-Patienten expremiert [46]. Ein weiteres proinflammatorisches Chemokin ist CCL2. Es wirkt chemotaktisch auf T-Gedächtniszellen, natürliche Killerzellen, Mikroglia und professionelle antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen [47,48] und spielt speziell bei der Transmigration von Lymphozyten über das Gefäßendothel eine wichtige Rolle [48–50]. In aktiven MS-Läsionen wird CCL2 von reaktiven Astrozyten und Monozyten gebildet [47,48,51]. Im Gegensatz zu CXCL10 ist die CCL2-Konzentration im Serum von MS-Patienten

erhöht und im Liquor hingegen reduziert [52,53]. Das Zytokin IL1beta ist bei MS-Patienten nur im Liquor nachweisbar [53,54]. Die Expression von IL1beta im ZNS ist auf Gliazellen, vor allem Mikroglia, beschränkt [55]. In der Peripherie wird IL1beta außerdem von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, natürlichen Killer- und B-Zellen gebildet. IL1beta trägt über die Förderung der Expression von Endothelwachstumsfaktor A auf Astrozyten [56] und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen [57] zur Auflockerung der BHS und Rekrutierung von Lymphozyten bei. Neben CXCL10 ist auch IL6 sowohl im Liquor als auch im Serum von MS-Patienten in erhöhter Konzentration vorhanden [41,53,54]. IL6 kann sowohl von Lymphozyten, Makrophagen und Mikroglia als auch von nicht-inflammatorischen Zellen wie Endothelzellen und Neuronen gebildet werden [58]. An Endothelzellen sorgt es für eine starke Expression von Adhäsionsmolekülen. Dies ermöglicht die Extravasation von peripheren Immunzellen in das ZNS-Parenchym und führt so zu einer Auflockerung der BHS [59].

## 1.2 Das Zentralnervensystem als immunprivilegiertes Raum

---

Das ZNS gilt als immunprivilegiertes Raum, was sich durch eine niedrige Expression von MHC I und II, eine niedrige Anzahl ansässiger dendritischer Zellen und durch die Abwesenheit einer klassischen Lymphdrainage aus dem ZNS zeigt [60]. Die Immunüberwachung des ZNS wird von den Mikrogliazellen übernommen. Mikroglia sind residente Makrophagen, welche sowohl Phagozytose betreiben und Antigene präsentieren als auch Zytokine sezernieren können

Im Folgenden sollen die Grenzstrukturen dieses, als immunprivilegiertes beschriebenen, Raumes besprochen werden.

### 1.2.1 Grenzstrukturen an der Gehirnoberfläche

---

Anatomisch wird das ZNS durch strukturierte Bindegewebsschichten begrenzt, die Meningen. An den knöchernen Schädel von innen angelagert, liegt die *Dura mater* als äußerste Schicht der Meningen. Die *Dura mater* besteht aus straffem, geflechtartigem Bindegewebe und mehreren Schichten flacher Fibroblasten. Direkt unter der *Dura mater* liegt die *Leptomeninges*, bestehend aus der *Arachnoidea mater* und der *Pia mater*. Zwischen der *Arachnoidea mater* und der darunterliegenden *Pia mater* liegt der Subarachnoidalraum, der als äußerer Liquorraum mit Liquor gefüllt ist. Die *Arachnoidea mater* besteht aus flachen Zellen, die über Tight Junctions

eine Barrierschicht zwischen dem äußeren Liquorraum und dem blutbestimmten Milieu der *Dura mater* bilden [61]. Der Subarachnoidalraum wird von den *Trabeculae arachnoideae* durchspannt, welche die *Arachnoidea mater* mit der *Pia mater* verbinden. Die *Pia mater* liegt der Gehirnoberfläche eng an. Die piale Zellschicht verläuft entlang penetrierender Arterien bis in den präkapillären Bereich. Die zahlreichen Gefäße der *Leptomeningx* sind durch Tight Junctions des kontinuierlichen Endothels gegenüber dem Liquor isoliert [62,63]. Unterhalb der *Pia mater* bilden Astrozytenfortsätze und eine aufgelagerte Basallamina die *Membrana limitans glialis superficialis*. Im Gegensatz zu penetrierenden Gefäßen sind leptomeningeale Gefäße nicht von Astrozytenfortsätzen umschlossen. Die leptomeningealen Gefäße sind als Folge dessen durchlässiger für Immunzellen als Gefäße mit einer vollständigen BHS [64]. Der Aufbau der Meningen ist in Abbildung 1.2.1 schematisch dargestellt.

Neben ihrer Funktion als mechanischer Schutz des ZNS sind die Meningen auch an der physiologischen Immunüberwachung des ZNS beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten im Rahmen der Immunüberwachung in den Meningen gesunder Mäuse über das Endothel migrieren können [65]. Die Meningen enthalten weitere Immunzellen wie Makrophagen und dendritische Zellen [66]. Die fehlende klassische Lymphdrainage des ZNS wird von Lymphgefäßen der *Dura mater* und des Subarachnoidalraumes übernommen. [67,68].

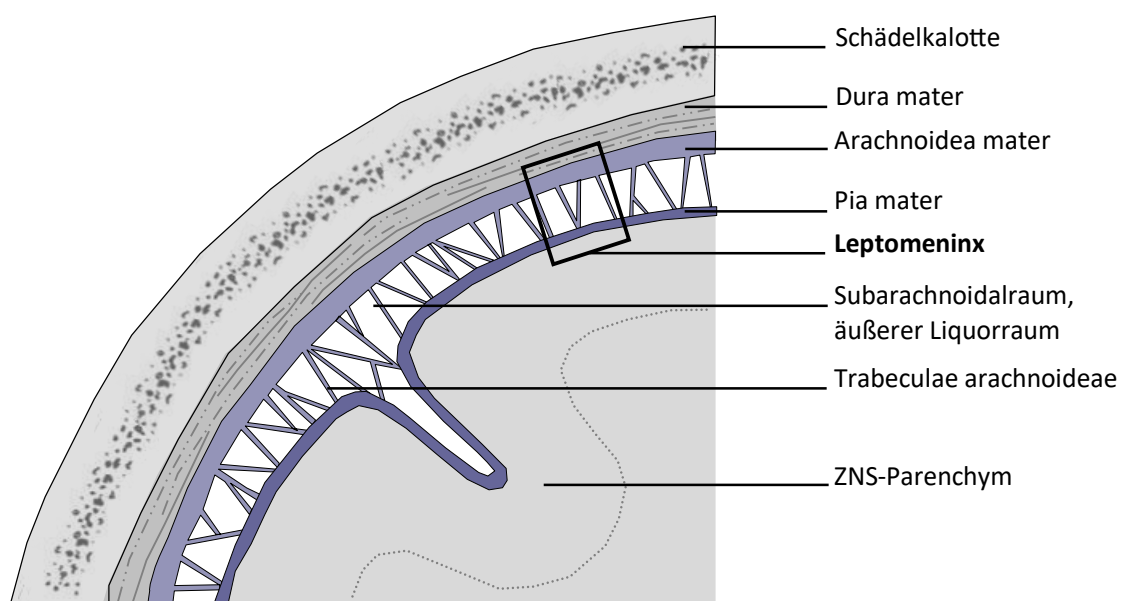
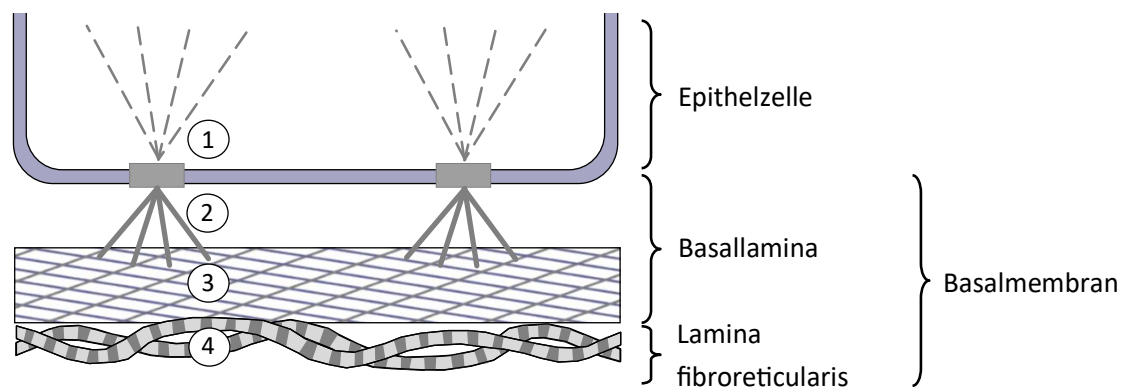


Abbildung 1.2.1 Schematische Darstellung der Meningen

### 1.2.2 Blut-Hirn-Schranke

Die BHS bildet die Grenze zwischen ZNS-Parenchym und vaskulärem Netzwerk. Sie ist weitgehend undurchlässig für toxische Metabolite, Krankheitserreger, Antikörper und Leukozyten. Die Barriere beruht auf der Interaktion von Endothelzellen, Perizyten und perivaskulären Astrozyten. Die eigentliche Barriere liegt auf Höhe des Gefäß-assoziierten kontinuierlichen Endothels [63], welches über Tight Junctions verbunden ist. Die Tight Junctions sind an der apikalen Zellmembran lokalisiert und verbinden die Endothelzellen untereinander. Tight Junctions verhindern einen parazellulären Transport von hydrophilen Molekülen. Der extrazelluläre Anteil dieser Verschlusskontakte besteht aus Claudinen und Occludinen, die über seitliche und End-zu-End-Kontakte verbunden sind. Adapterproteine wie ZO1 stellen eine Verknüpfung zu den intrazellulären Aktinfilamenten des Zytoskeletts her. Die Endothelzellen der BHS exprimieren in hohem Maße Claudin 5 (CLDN5) [69], Occludin [70], das junctionale Adhäsionsmolekül 4 [71] sowie ZO1 [72]. Ein Verlust von Tight Junction Proteinen wie ZO1 oder CLDN5 ist mit einem Verlust der Schrankenfunktion der BHS assoziiert [73,74]. Im Vergleich zu anderen Geweben exprimieren die Endothelzellen der BHS unter physiologischen Bedingungen eine geringere Menge von Adhäsionsmolekülen, welche für die Transmigration von Lymphozyten über das Endothel essentiell sind [75]. Die Transmigration der Lymphozyten ist daher stark eingeschränkt.

An der Oberfläche des ZNS und entlang der Gefäße bilden die Fortsätze von Astrozyten die durchgehende *Membrana limitans glialis*, welche eine weitere Barriere bildet. Astrozyten wirken zusätzlich direkt auf die Tight Junctions Formierung der Endothelzellen [76]. Die Gefäße des ZNS sind umrundet von zwei Basallaminae, der äußeren, von Astrozytenendfüßen gebildeten parenchymalen Basallamina, und der inneren vaskulären Basallamina des Endothels [70,77]. Auf Höhe der Kapillaren verschmelzen die beiden Basallaminae [78]. Basallaminae sind ein ultrastruktureller Bestandteil von Basalmembranen. Basalmembranen bestehen aus einer kompakten Schicht von Proteoglykanen, Kollagenen und Lamininen. Sie dienen der Verankerung des Epithels und zur Abgrenzung gegenüber dem angrenzenden Gewebe. Ultrastrukturell besteht die Basalmembran im Allgemeinen aus zwei Teilen, der Basallamina und der *Lamina fibroreticularis* (Abbildung 1.2.2). Hauptbestandteile der Basallamina sind Kollagen IV und Laminin [79]. Die *Lamina fibroreticularis* verankert die Basallamina am angrenzenden Bindegewebe und besteht aus Kollagenfibrillen.



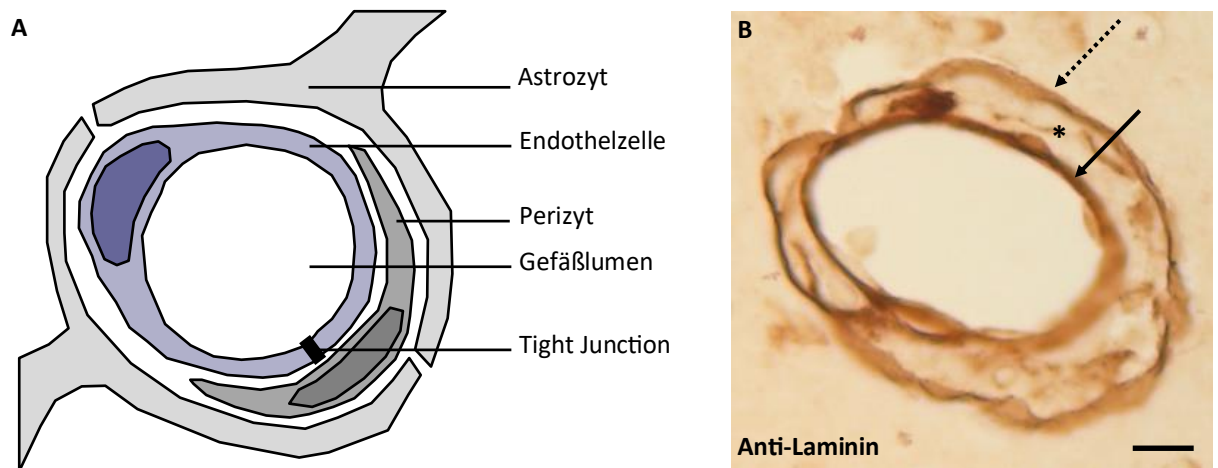
**Abbildung 1.2.2 Aufbau einer Basalmembran**

Schematische Darstellung der Basalmembran mit ihren zwei Anteilen: Basallamina und *Lamina fibroreticularis*. Das Zytoskelett der Epithelzellen ist über Adaptermoleküle an der Extrazellulärmatrix verankert (1). Die Basallamina lässt sich in *Lamina rara* (2) und *Lamina densa* (3) unterteilen. Die *Lamina rara* wird von Adhäsionsmolekülen durchzogen und die *Lamina densa* besteht aus einem dichten Netz von Kollagen- und Lamininfasern. Die *Lamina fibroreticularis* (4) besteht aus Kollagenfibrillen und ist an der *Lamina densa* sowie am umliegenden Gewebe befestigt.

Die Basallaminae bilden eine weitere Barriere für den Übertritt von Molekülen und Zellen zwischen dem vaskulären System und neuronalem Gewebe [77]. In die vaskuläre Basallamina sind Perizyten eingebettet. Diese können über kontraktile Proteine den Durchmesser des Gefäßes regulieren [80,81]. Zwischen den beiden Basallaminae existiert ein mit Liquor gefüllter Raum. Dieser sogenannte perivaskuläre Raum (engl. perivascular space, PVS) wurde erstmals von Rudolf Virchow und Charles-Philippe Robin beschrieben [82]. Der PVS steht mit den äußeren Liquorräumen in Verbindung und ist an der Bewegung und Drainage interstitieller Flüssigkeiten des ZNS beteiligt [83]. Der Aufbau der BHS ist in Abbildung 1.2.3 schematisch dargestellt.

Die BHS besteht prinzipiell an allen Gefäßabschnitten innerhalb des ZNS [84]. Es konnten dennoch Unterschiede in der Tight Junctions Formierung und damit der Dichte der BHS zwischen präkapillären, kapillären und postkapillären Gefäßen festgestellt werden [77,85]. Dies kann auf die physiologisch variierende Breite des PVS zurückgeführt werden. Auf Höhe der postkapillären Gefäße ist der PVS weiter als auf Höhe der kapillären und präkapillären Gefäße. Die größere Entfernung zwischen Astrozyten und Endothelzellen auf Höhe der postkapillären Gefäße scheint den Signaleinfluss der Astrozyten auf die Formierung der Tight Junctions des Endothels zu schmälern [85].





**Abbildung 1.2.3 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke**

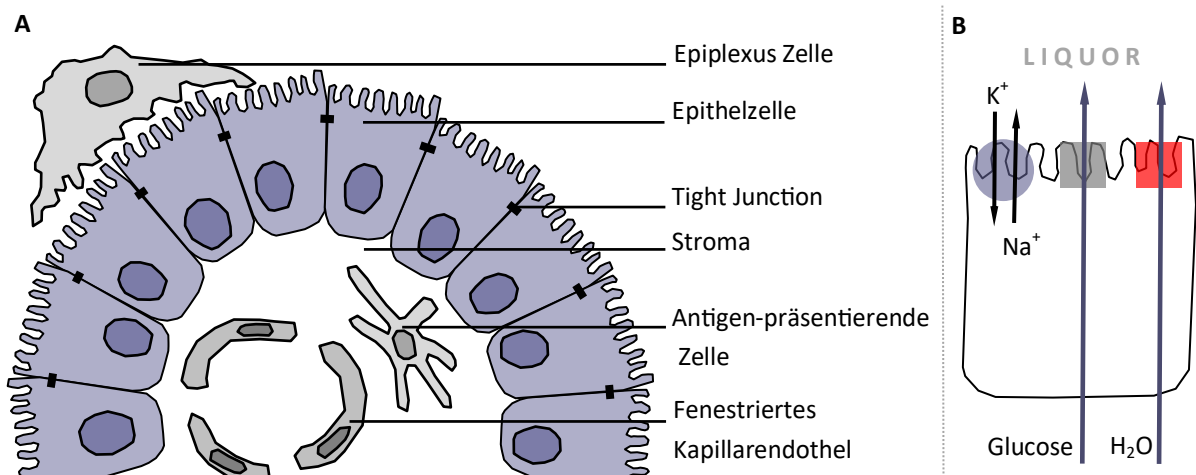
(A) Schematischer Aufbau der zellulären Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke, (B) Anti-Laminin Immunmarkierung eines murinen Gehirnschnittes des kombinierten Mausmodells von Cuprizone und experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis. Durch die Rekrutierung von peripheren Immunzellen in den perivaskulären Raum (Stern) werden die parenchymale Basalmembran (gestrichelter Pfeil) und die vaskuläre Basalmembran (durchgehender Pfeil) in diesem inflammatorischen Mausmodell auseinandergedrängt und sind dadurch einzeln darstellbar, Maßstab 20 µm.

Die BHS ist nicht an allen Kapillaren des Gehirns gleichermaßen ausgeprägt. Entlang des dritten und vierten Ventrikels liegen die unpaaren zirkumventrikulären Organe (ZVO) [86]. ZVO sind Hirnareale, die durch eine nicht vorhandene BHS eine Kommunikation zwischen dem ZNS und dem Blut erlauben. Die Kapillaren der ZVO besitzen ein fenestriertes Endothel und damit eine aufgelockerte BHS mit einer diskontinuierlichen ZO1 Expression [86,87] und einer erhöhten Immunreaktivität für Dysferlin [40]. Die aufgelockerte BHS ermöglicht die Diffusion im Blut zirkulierender hydrophiler Stoffe zu den Neuronen und umgekehrt den Übergang von Neurohormonen in das Blutsystem. Die Einteilung der ZVO erfolgt in sensorische und sekretorische ZVO [86]. Zu den sensorischen ZVO gehören das Subfornikalorgan, die *Area postrema* und das *Organum vasculosum*. Die sekretorischen ZVO sind die *Glandula pinealis*, die *Eminentia mediana*, die Neurohypophyse und das Subkommissuralorgan. Eine Barriere zwischen Blutsystem und dem ZNS Parenchym innerhalb der ZVO wird vermutlich durch spezielle, langgestreckte, Astrozyten-ähnliche, spezialisierte Ependymzellen, den Tanyzyten [88,89] gebildet. Tanyzyten weisen eine erhöhte ZO1 Expression auf [87].

### **1.2.3 Aufbau des Plexus choroideus und der Blut-Liquor-Schranke**

Der *Plexus choroideus* ist ein Gefäßkonvolut, das in allen vier Ventrikeln vorhanden ist. Das Endothel der Gefäße des *Plexus choroideus* ist fenestriert [90] und weist somit eine geringe Schrankenfunktion auf [40]. Durch die Fenestrierung des Endothels ist das Stroma gegenüber den Blutkomponenten exponiert. Die Blut-Liquor-Schranke wird durch das Epithel des *Plexus choroideus* gebildet, welches apikal durch Tight Junctions verbunden [91] ist. Das Epithel des *Plexus choroideus* ist einschichtig kubisch und besitzt, im Gegensatz zu den Ependymzellen der Ventrikel, eine Basallaminae [92]. Das Stroma des *Plexus choroideus* besteht aus kapillarreichem Bindegewebe, welches aus einer Fortsetzung der *Leptomeninges* besteht [93]. Innerhalb des Stromas lassen sich viele MHC II<sup>+</sup>-Zellen, wie dendritische Zellen und Makrophagen, finden [94,95]. Beide Zelltypen übernehmen Funktionen von APZ, was für eine Beteiligung des *Plexus choroideus* an einer immunologischen Kommunikation zwischen ZNS und Peripherie spricht [95]. Auf dem Epithel des *Plexus choroideus* aufgelagert befindet sich eine weitere Makrophagen-Population, welche durch W. Kolmer beschrieben wurde. Diese sogenannten Kolmer-Epiplexuszellen weisen Ähnlichkeiten mit Mikrogliazellen auf [96].

Als Nahtstelle zwischen dem vaskulären System und dem Liquor ist der *Plexus choroideus* für die Liquorproduktion zuständig. Durch apikal gelegene Natrium (Na<sup>+</sup>)-Kalium (K<sup>+</sup>)-Pumpen wird am Epithel des *Plexus choroideus* ein elektrochemischer Gradient aufgebaut [97,98]. Diesem, durch den Gradienten hervorgerufenem osmotischen Druck, folgt Wasser transzellulär durch den für den *Plexus choroideus* spezifischen Wasserkanal Aquaporin 1 (AQP1) [99]. Glucose wird mittels des insulinunabhängigen Glucosetransporters 1 über die Blut-Liquor-Schranke transportiert. Der Aufbau des *Plexus choroideus* und die Liquorproduktion sind in Abbildung 1.2.4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.2.4 Aufbau des Plexus choroideus**

(A) Schematische Darstellung der zellulären Strukturen des *Plexus choroideus*. (B) Schema der Liquorproduktion anhand einer repräsentativen Epithelzelle des *Plexus choroideus*, in violett: apikale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Pumpe, in grau: Glucosetransporter 1, in rot: der Wasserkanal (H<sub>2</sub>O) Aquaporin 1.

### 1.2.4 Immunzellmigrationsrouten in das Zentralnervensystem

Trotz der oben beschriebenen Schrankenfunktionen können bei diversen inflammatorischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der MS, periphere Immunzellen in das ZNS einwandern.

Der allgemeine Ablauf der Immunzellrekrutierung in Geweben außerhalb des ZNS beginnt mit der Phagozytose eines Antigens am Ort des Entzündungsgeschehens durch eine APZ. Nach der Migration über Lymphgefäße in einen lokalen Lymphknoten präsentiert die APZ das prozessierte Antigen über MHC II. Hierüber erfolgt die Aktivierung von B-Zellen, die wiederum durch den Kontakt mit T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Der erste Antigenkontakt der T-Zellen erfolgt im Lymphknoten über den T-Zellrezeptor mit dem, von der APZ präsentierten, Antigen. Die aktivierten T-Zellen verlassen das Lymphsystem und treten in die Blutbahn ein, um zum Infektionsort zu gelangen. Nach Anlagerung an spezifische Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen migrieren die T-Zellen über die Gefäßwand und treten ins Parenchym über. Nach einem zweiten Antigenkontakt erfolgt die Proliferation der T-Zelle und die Differenzierung zur Effektor-T-Zelle.

Die oben beschriebenen Schranken müssen bei der Immunzellrekrutierung in das ZNS umgangen werden. Die Verfügbarkeit von ZNS-Antigenen in der Peripherie, sowie die Migration von APZ und peripheren Immunzellen im Rahmen der physiologischen Immunüberwachung, sind auf ein Minimum beschränkt [75]. Da trotzdem Antigene aus dem

ZNS in Lymphknoten nachgewiesen werden konnten, wird ein Antigentransport innerhalb des ZNS über den Liquor und die PVS [100] vermutet. Dieser Antigentransport führt zu Lymphsystemen der *Dura mater* [67,68] und durch die *Lamina cribrosa* zu nasalen Lymphgefäßen [101]. Die erste Antigenpräsentation findet wahrscheinlich in den tiefen zervikalen Lymphknoten statt [102]. Mögliche Orte des zweiten Antigenkontaktes sind der PVS und der Subarachnoidalraum [103,104], sowie das Stroma des *Plexus choroideus* [105]. Dendritische Zellen [106,107], Mikroglia [108,109], Astrozyten [110], Makrophagen [29] und Endothelzellen [111,112] können die Funktion von APZ übernehmen.

Die genaue Route von peripheren Immunzellen in das ZNS nach Eintreten in die Blutbahn ist nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden drei Routen, die im Folgenden beschrieben werden sollen [113,114]. Eine schematische Darstellung dieser Migrationsrouten ist in Abbildung 1.2.5 zu finden.

(1) *Immunzellen migrieren über das Endothel postkapillärer Venolen in den PVS und weiter in das Parenchym.* Aktivierte T-Zellen können die BHS von postkapillären Venolen aufgrund der lockereren Tight Junction Formierung [85] sowie der Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel überqueren [85,115] und gelangen so in den PVS. Die Extravasation erfolgt in mehreren Schritten und beginnt zunächst mit einer Margination der Lymphozyten im Blutstrom. Bei der Margination kommt es zur Interaktion der Lymphozyten mit Adhäsionsmolekülen des Endothels. Die Geschwindigkeit der Lymphozyten wird dadurch verringert und die Lymphozyten „rollen“ entlang des Endothels. Nach einer festen Adhäsion über Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren kommt es zur Diapedese über das Endothel [114]. Die Expression und Sekretion der für die Transmigration der Lymphozyten essentiellen Adhäsionsmoleküle wie das Gefäßzelladhäsionsmolekül 1 (engl. vascular adhesion molecule 1, VCAM1), Interzellulär-Adhäsionsmolekül 1 (engl. intercellular adhesion molecule 1, ICAM1), P-Selectin und Chemokine wie zum Beispiel CCL2 [114] sind unter physiologischen Bedingungen deutlich geringer und die Moleküle selbst dem Blutstrom nicht ausgesetzt [75,116,117]. Unter inflammatorischen Bedingungen wie im Tiermodell der Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) induzierten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) ist die Expression der Adhäsionsmoleküle hingegen deutlich erhöht [116,117].

Durch den zweiten Antigenkontakt im PVS differenzieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu Effektorzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhöhen durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine die Durchlässigkeit der BHS [118,119]. Die Strukturen der Extrazellulärmatrix (EZM) werden durch die Sekretion von Metalloproteinasen aus Immunzellen aufgelockert und die Migration der Immunzellen somit ermöglicht [50,120,121]. Aus dem PVS können nun T-Zellen und andere Immunzellen über die *Glia limitans perivascularis* in das ZNS Parenchym übertreten.

(2) *Immunzellen migrieren über die postkapillären Venolen oberflächlicher leptomeningealer Gefäße in den äußeren Liquorraum.* Diese Migrationsroute ähnelt dem Weg über das Endothel zerebraler postkapillärer Venolen. Nach der Extravasation über das Endothel gelangen die Immunzellen in den Liquor-gefüllten Subarachnoidalraum. Über die Liquorräume können sich die Lymphozyten verteilen und letztendlich über die *Glia limitans superficialis* in das ZNS Parenchym übertreten [113,114]. Mittels eines kombinierten fluoreszierenden Sensors aus dem nukleären Faktor für T-Zell Aktivierung mit dem Histonprotein 2B, konnte eine Diapedese von T-Zellen auf Höhe der Leptomeningen in frühen Stadien der EAE gezeigt werden [119]. Die T-Zellen konnten im perivaskulären Raum und im Parenchym gefunden werden [119].

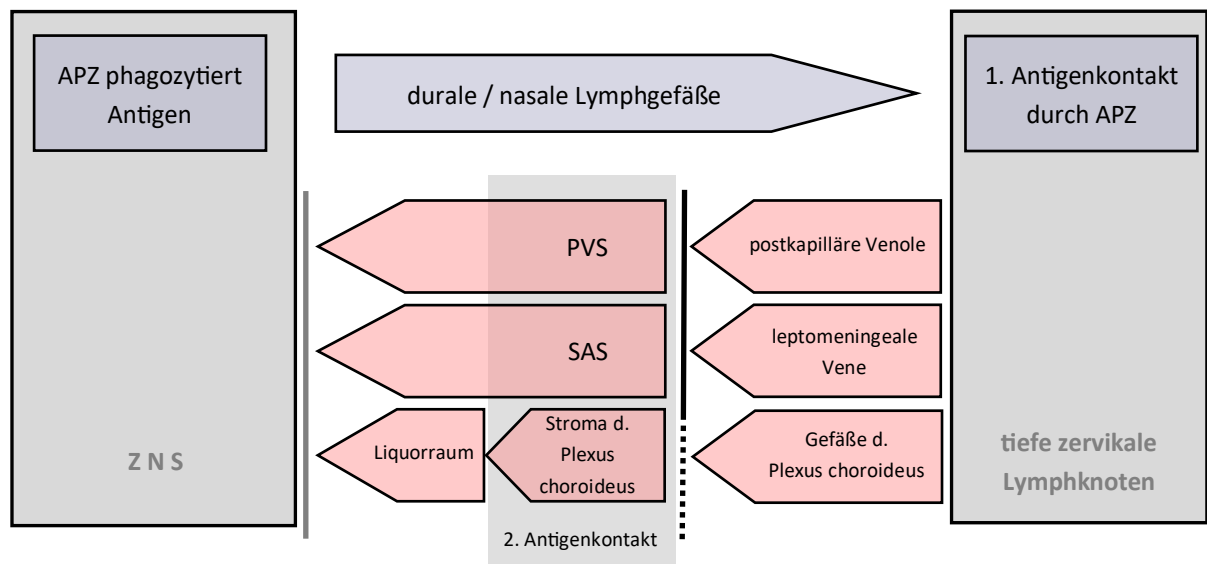
(3) *Immunzellen folgen dem physiologischen Weg der Liquorproduktion über das Epithel des Plexus choroideus.* Ein weiterer oft diskutierter Weg der Lymphozyten führt über das fenestrierte Endothel der Gefäße innerhalb des *Plexus choroideus* und folgt dem physiologischen Weg der Liquorproduktion über das Epithel des *Plexus choroideus*. Nach Überquerung des Epithels können sich die Lymphozyten über den Liquor im Ventrikelsystem verteilen und über das Ependym ins Parenchym übertreten. Das Ependym ist nicht durch Tight Junctions verbunden und stellt somit eine geringe Barriere zwischen dem Liquor und dem ZNS Parenchym dar.

Die Route über das Epithel des *Plexus choroideus* wird auch unter physiologischen Bedingungen für die Immunüberwachung des ZNS und die immunologische Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS genutzt. Für diese These spricht der Nachweis von etwa 3000 Leukozyten pro Milliliter Liquor eines gesunden erwachsenen Menschen nach der Verteilung der Zellen über den Liquor. [122]. Es konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Immunüberwachung durch eine Umstrukturierung der Tight Junctions das Epithel des *Plexus choroideus* für Immunzellen durchlässig wird und Immunzellen über dieses migrieren können [123,124]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass fluoreszenzmarkierte Lymphozyten nach intravenöser Injektion im Stroma des *Plexus choroideus* und den Meningen

gesunder Mäuse zu finden waren [65]. Auch im humanen *Plexus choroideus* konnten im Stroma unter physiologischen Bedingungen T-Zellen nachgewiesen werden [125].

Die bei MS-Patienten erhöhte Leukozyten-Anzahl im Liquor spricht für Immunzellmigration über das Epithel des *Plexus choroideus* und eine Beteiligung des *Plexus choroideus* an der Immunzellrekrutierung [91]. Unter inflammatorischen Bedingungen wie bei der MOG induzierten EAE konnte gezeigt werden, dass die Migration von Th17-Zellen über das Epithel des *Plexus choroideus* durch die Interaktion von  $\alpha$ -Chemokinrezeptor 6 und  $\alpha$ -Chemokinligand 20 möglich wird [126]. Der *Plexus choroideus* unterliegt im Laufe der MS einem Wandel. So konnte in *post mortem* Gehirnen eine Störung der Blut-Liquor-Schranke durch den Verlust des Tight Junction Proteins Claudin 3 nachgewiesen werden [127] und im Stroma des *Plexus choroideus* von MS-Gehirnen konnten signifikant mehr T-Zellen als in Kontroll-Gehirnen gefunden werden [128,129].

In einem Schlaganfall-Modell konnte außerdem gezeigt werden, dass nach intraventrikulärer Photoaktivierung Immunzellen im Infarktareal zu finden waren. Die detektierbare Zahl der Immunzellen wurde dabei nicht durch eine Blockade des Liquorflusses, mithilfe einer gallertartigen Proteinmischung, beeinflusst [130]. Llovera et al. stellen daher die Hypothese einer alternativen Route über die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* auf. Statt der Überquerung des Epithels des *Plexus choroideus* könnten Immunzellen entlang des Stromas des *Plexus choroideus* über seine Anheftungsstelle in das ZNS-Parenchym migrieren [130]. Diese Migrationsroute ist bislang wenig untersucht und theoretische weitere Grenzstrukturen an der Anheftung des *Plexus choroideus*, sowie die anatomische Struktur der Anheftung sind bislang nicht beschrieben.



**Abbildung 1.2.5 Schema der Immunzellrekrutierungsrouen**

Schematische Darstellung der möglichen Routen der Immunzellrekrutierung. Eine antigenpräsentierende Zelle (APZ) phagozytiert ein Antigen innerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) und gelangt über durale und nasale Lymphgefäße zu den tiefen zervikalen Lymphknoten, dem Ort des ersten Antigenkontaktes der T-Zelle. In violett dargestellt sind der Transport der ZNS-Antigene zu den zervikalen Lymphknoten, in rot dargestellt sind die möglichen Wege innerhalb der Blutbahn. Die schwarze Linie veranschaulicht das Endothel, die graue Linie veranschaulicht die *Glia limitans*; zur Veranschaulichung der Fenestrierung des Endothels des *Plexus choroideus* ist das Endothel gestrichelt dargestellt. Subarachnoidalraum (engl. subarachnoid space, SAS), perivaskulärer Raum (engl. perivascular space, PVS) und das Stroma des *Plexus choroideus* sind Ort des zweiten Antigenkontaktes.

### 1.3 Mausmodelle der Multiplen Sklerose

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung möglicher Migrationsrouen drei verschiedene MS-Mausmodelle verwendet. In Mausmodellen lassen sich unterschiedliche Aspekte der MS-Pathologie im Modell nachahmen. So können Demyelinisierungsvorgänge und entzündliche Vorgänge einzeln und in Kombination untersucht werden.

#### 1.3.1 Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches Demyelinisierungsmodell. Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon) ist ein Kupferchelator, dessen orale Gabe in einem Tierversuch an Mäusen von Carlton et al. 1967 erstmalig durchgeführt wurde [131]. Es wurden verschiedene Veränderungen des ZNS gefütterter Tiere wie ein Hydrozephalus, ein zerebelläres Ödem und Myelinverlust beschrieben. Durch die Fütterung mit Cuprizone-versetztem Futtermehl kommt es zu einem Untergang von Oligodendrozyten und einer Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia [132,133]. Zusätzlich zur Aktivierung der

Mikrogliazellen kommt es zu einer geringen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [134] und Makrophagen [135,136] in das ZNS. Eine Rekrutierung von Lymphozyten wurde in vielen Studien ausgeschlossen oder als gering erachtet [137,138]. Kürzlich konnte jedoch in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es, ausgelöst von der Cuprizone-Intoxikation, zu einer signifikanten Rekrutierung von CD3<sup>+</sup> Zellen in demyelinisierte Bereiche des ZNS kommt. Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der rekrutierten Lymphozyten ähnelt qualitativ den Infiltraten in MS-Läsionen [139].

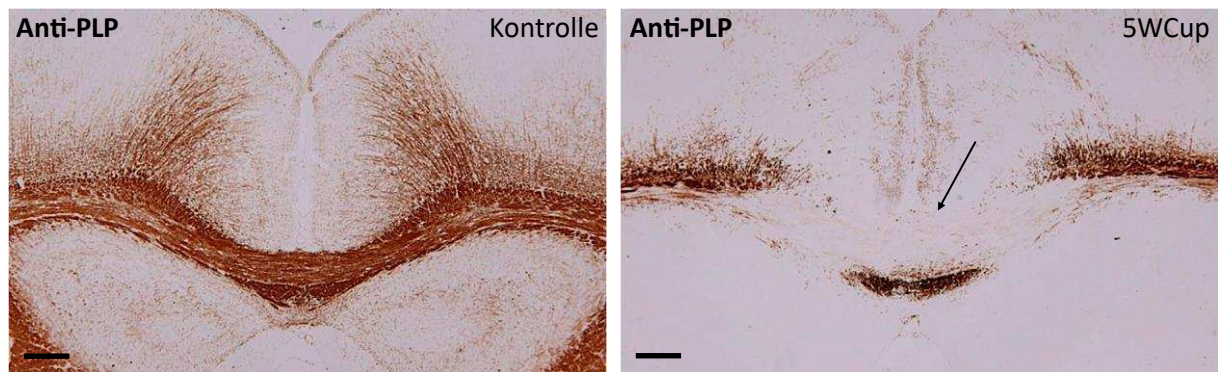
Die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung ist in der zerebralen weißen Substanz, besonders dem *Corpus callosum*, am stärksten [133]. Die Aktivierung der Mikroglia ist in den Bereichen der Demyelinisierung am stärksten ausgeprägt [140]. Nach fünf Wochen kommt es zu einem nahezu kompletten Myelinverlust in der Mittellinie des *Corpus callosum* auf der Höhe des rostralen *Hippocampus* [141]. Weitere betroffene Regionen der Demyelinisierung sind der *Hippocampus* [142], das *Cerebellum* [143], die Basalganglien [144], der *Thalamus* [145] und der Kortex [146]. Im murinen Rückenmark konnte keine Cuprizone-Pathologie festgestellt werden [147]. Der Myelinverlust nach fünfwöchiger Cuprizone-Intoxikation ist in Abbildung 1.3.1 in einer Anti-Proteolipid-Protein (PLP) Immunmarkierung zu erkennen.

Begleitet wird die Demyelinisierung und Gliaaktivierung von einer axonalen Schädigung, die sich über die Akkumulation des Amyloid-Vorläuferproteins nachweisen lässt. Diese Akkumulationen entstehen durch Unterbrechung der axonalen Transportprozesse [18].

Die BHS in Cuprizone-intoxikierten Tieren wird als unbeschädigt bis leicht permeabel [148,149] beschrieben und im Allgemeinen als intakt angenommen.

Der Wirkungsmechanismus der Cuprizone-Intoxikation ist nicht vollständig geklärt. Cuprizone greift als Kupferchelator in die Kupferhomöostase ein und verursacht Symptome eines Kupfermangels [150,151]. Der Kupfermangel verursacht Störungen in der Funktion von Atmungskettenenzymen [152]. Diese Störungen der Atmungskette führen zu oxidativem Stress, der besonders in Oligodendrozyten eine Degeneration des Perikaryons und folglich einen Untergang bewirkt [153]. Die selektive Vulnerabilität der Oligodendrozyten [154] kann durch ihren hohen oxidativen Metabolismus erklärt werden [155]. Das Cuprizone-Modell kann zu Studien der De- und Remyelinisierung verwendet werden [156].





**Abbildung 1.3.1 Darstellung der Demyelinisierung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation durch eine Anti-Proteolipid-Protein Immunmarkierung**

**links** Myelinisierung eines Kontrolltiers, Anti-Proteolipid-Protein (PLP) Immunmarkierung  
**rechts** Myelinisierung nach fünfwöchiger Cuprizone-Intoxikation (5WCup), der Pfeil deutet auf die nahezu vollständige Demyelinisierung in der Mittellinie des *Corpus callosum*, Maßstäbe 100  $\mu\text{m}$ .  
Mit freundlicher Genehmigung von Hannes Kaddatz, Institut für Anatomie Rostock.

### 1.3.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Das Modell der EAE ist das am häufigsten verwendete MS-Tiermodell [157]. Es gilt als Modell für die Phase der RRMS, da es zu fokalen Läsionen mit massiver Immunzellrekrutierung kommt. Die EAE kann entweder über eine Transplantation myelinreaktiver T-Zellen (passive Immunisierung) oder über eine Injektion von ZNS-spezifischen Myelinantigenen bei gleichzeitiger Stimulation des Immunsystems (aktive Immunisierung) ausgelöst werden [158]. Die verwendeten Myelinantigene sowie Tierart und -stamm bestimmen den Verlauf und die Ausprägung der EAE. Für diese Arbeit wurden C57BL/6-Mäuse mit MOG<sub>35-55</sub>-Antigenen immunisiert. Die MOG-Antigene werden in einem Adjuvans mit hitzeinaktivierten Mykobakterien (komplettes Freund-Adjuvans) injiziert und die Immunantwort zusätzlich durch zweimalige Injektion von Pertussis-Toxin (PTX) verstärkt [159]. Nach der Immunisierung werden die Antigene durch APZ phagozytiert. Die APZ migrieren zu den lymphatischen Organen, interagieren dort über die Präsentation der Antigene mit Lymphozyten und lösen die Proliferation von T-Helferzellen vorwiegend mit dem Phänotyp Th1 und Th17 aus. Diese verlassen die peripheren Lymphbahnen und sorgen im ZNS für eine Inflammation [157]. Etwa zehn Tage nach der Immunisierung kommt es zur Ausprägung eines monophasischen Krankheitsverlaufes und zum Auftreten einer vom Schwanz aufsteigenden Paralyse [160]. Histopathologisch ist die EAE durch Immunzellinfiltrate in Rückenmark, Hirnstamm und *Cerebellum* gekennzeichnet [161]. Diese Immunzellinfiltrate befinden sich überwiegend perivaskulär, sind aber auch periventrikulär und subpial zu finden [162]. In den Infiltraten dominieren CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen [163] mit den Phänotypen Th1 und Th17 [164].

Neben der Immunzellrekrutierung kommt es sekundär zu akutem axonalen Schaden [165] und Demyelinisierung. Die Demyelinisierung ist weniger stark ausgebildet als im Cuprizone-Modell und lässt sich vor allem ultrastrukturell nachweisen [166]. In EAE-Tieren wurden Defekte der BHS durch eine veränderte Organisation des Tight Junction Proteins ZO1 beschrieben [167]. Die Permeabilität der BHS korreliert dabei positiv mit der Schwere der EAE-Symptomatik [168].

### **1.3.3 Kombination aus Cuprizone und EAE**

---

Das Cuprizone und EAE Modell (Cup/EAE-Modell) ist eine Kombination aus dem toxisch zytodegenerativen Cuprizone-Modell und dem inflammatorischen EAE-Modell [169]. Nach drei Wochen Cuprizone-Intoxikation sowie einer zweiwöchigen Phase ohne Gabe von Cuprizone wird eine aktive EAE experimentell induziert. Zunächst wird dabei eine Cuprizone-induzierte Demyelinisierung und anschließend eine autoimmune Reaktion durch die Induktion einer MOG<sub>35-55</sub>-EAE ausgelöst. Die Tiere entwickeln die gleiche Symptomatik wie bei einer reinen EAE, häufig jedoch mit einem schwächerem Score als bei einer reinen EAE [170]. Im Cup/EAE Modell kommt es zusätzlich zu den charakteristischen Pathologien im Rückenmark und Hirnstamm auch zur Beteiligung des Vorderhirns. Die Bildung von perivaskulären Infiltraten peripherer Immunzellen erfolgt zusätzlich in Kortex, *Corpus callosum* und subkortikalen Strukturen. Die meisten Infiltrate finden sich in den Regionen der stärksten Cuprizone-induzierten Demyelinisierung. Zusätzlich findet sich auch eine höhere Zahl parenchymaler CD3<sup>+</sup> Zellen [169]. Histopathologisch zeigen sich neben den verstärkten EAE Merkmalen auch Merkmale einer Cuprizone-Läsion. In den Regionen der Immunzellinfiltration wurden eine erhöhte Immunreaktivität für das saure Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein, GFAP) und eine fokale Demyelinisierung beschrieben. Neben einer Mikrogliose und einer Rekrutierung von Monozyten wird auch ein akuter axonaler Schaden induziert [170].

In Cup/EAE Tieren zeigt sich an den Gefäßen eine verminderte Expression des Wasserkanals Aquaporin 4, einem Marker für Astrozytenendfüße [171]. Dies könnte auf einen Defekt der BHS im Cup/EAE-Modell hindeuten.

## 1.4 Fragestellung

---

Die Immunzellrekrutierung ist ein zentraler Aspekt der MS Pathologie. Die Migrationsroute der rekrutierten Immunzellen ist nicht geklärt. Diskutiert werden drei verschiedene Routen (Kapitel 1.2.4) [113,114]. In dieser Arbeit sollen zwei mögliche Migrationsrouten näher untersucht und beschrieben werden.

### 1.4.1 Die Migrationsroute innerhalb des PVS penetrierender Gefäße

---

Immunzellen können im aktivierten Zustand über die BHS postkapillärer Venolen [85] in den PVS übertreten. Treten Immunzellen auf der Höhe leptomeningealer postkapillärer Venolen aus, können sie sich über die äußeren Liquorräume verteilen [113,114]. Die erste Hypothese dieser Arbeit lautet: Periphere Immunzellen migrieren über das Endothel leptomeningealer Gefäße in den Subarachnoidalraum und migrieren dann entlang des perivaskulären Raumes penetrierender Gefäße, um auf Höhe bestehender inflammatorischer Läsionen in das Parenchym überzutreten. Diese Migrationsroute ist in Abbildung 1.4.1 schematisch dargestellt.

In Bezug auf diese Hypothese sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- > *Sind T-Zellen im PVS von Cup/EAE-Tieren zu finden, und wie verhält sich die Dichte der T-Zellen im PVS entlang von penetrierenden Gefäßen?*
- > *Ist in den Meningen eine inflammatorische Aktivität durch vermehrte proinflammatorische Zytokine nachweisbar?*

Anhand von Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen an Schnitten von Cup/EAE-Tieren wurde der PVS im Quer- und Längsanschnitt untersucht. Mittels einer quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion wurden nativ entnommene Meningenproben von unterschiedlichen Tierexperimentgruppen auf die Aktivität inflammatorischer Gene untersucht.

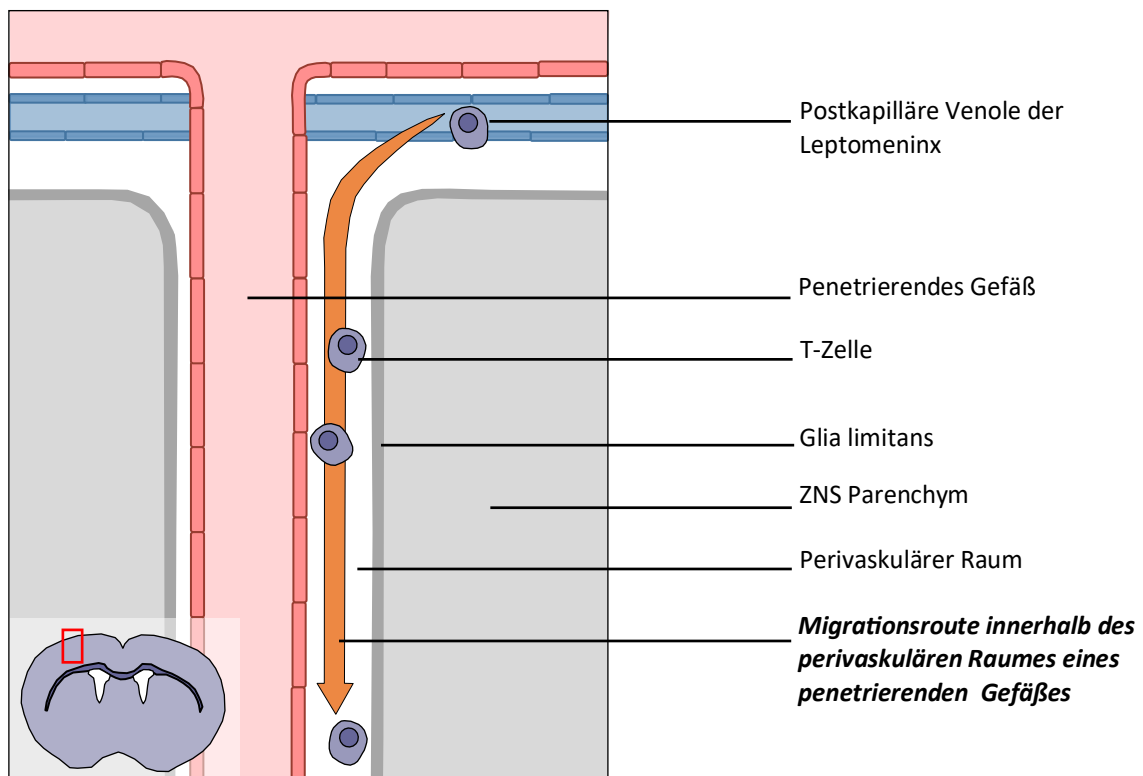


Abbildung 1.4.1 Schematische Darstellung der Migrationsroute entlang des perivaskulären Raumes

#### 1.4.2 Die Migrationsroute innerhalb des Stromas des Plexus choroideus

Der *Plexus choroideus* bietet über das gefensterte Endothel eine mögliche Eintrittspforte für Immunzellen, welche auch unter physiologischen Bedingungen zur Immunüberwachung genutzt wird [65,125]. In einer Studie zur Immunzellrekrutierung in Schlaganfall-Läsionen konnte gezeigt werden, dass Immunzellen über den *Plexus choroideus* rekrutiert werden. Die Migration erfolgte nicht über das durch Tight Junctions abgedichtete Epithel des Plexus choroideus [130]. Die zweite Hypothese dieser Arbeit lautet daher: Periphere Immunzellen migrieren über das gefensterte Endothel choroidaler Gefäße und innerhalb des Stromas des *Plexus choroideus* über dessen Anheftungsstelle in das ZNS Parenchym. Beide Migrationsrouten über den *Plexus choroideus* sind in Abbildung 1.4.2 schematisch dargestellt.

In Bezug auf diese Hypothese soll folgende Fragestellung bearbeitet werden:

- > *Wo ist der murine Plexus choroideus anatomisch am Parenchym des ZNS angeheftet?*

Die hier vermutete Migrationsroute über das Stroma und die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* umgeht die Barriere des Epithels des *Plexus choroideus*, daher soll folgendes untersucht werden:

- > Sind an der Anheftungsstelle des Plexus choroideus weitere Grenzstrukturen zum ZNS Parenchym vorhanden?

Diese Fragestellungen wurden über die Methoden der Immunhistochemie und Immunfluoreszenzdoppelmarkierung an Schnittserien von Kontrolltieren untersucht.

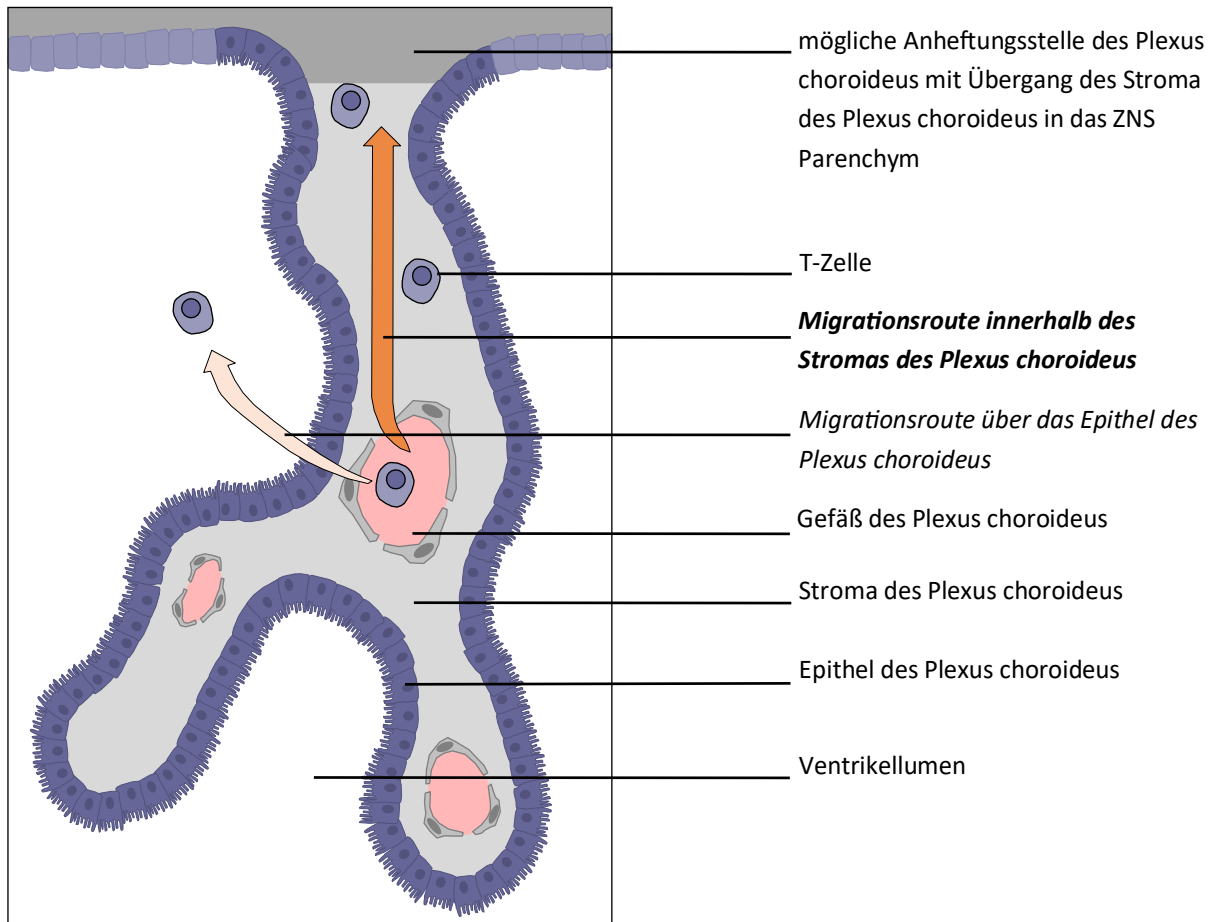


Abbildung 1.4.2 Schematische Darstellung der möglichen Migrationsrouten über den Plexus choroideus

## 2 Material und Methoden

---

Alle verwendeten Materialien, Chemikalien und Lösungen sind in Kapitel 8.3 und Kapitel 8.4 zu finden.

### 2.1 Tierversuchsaufbau

#### 2.1.1 Versuchstierhaltung

---

Die Haltung und Pflege der Versuchstiere erfolgte nach den Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA). Die Mäuse wurden in Polycarbonat-Käfigen mit mindestens 100 cm<sup>2</sup> Grundfläche pro Tier gehalten, die einmal wöchentlich gewechselt wurden. Die Käfige waren standardgemäß mit Einstreu, Versteckmöglichkeit, Nestbaumaterial, Kauholz, Standard-Haltungsfutter und frischem Wasser ausgestattet. Im Tierhaltungsraum herrschte ein festgelegter Tag-Nacht-Zyklus von jeweils zwölf Stunden und eine standardisierte Temperatur von 23 ± 2°C.

Jährlich wurde der Tierhygienestatus nach FELASA anhand von Sentineltieren kontrolliert. Im Versuchszeitraum wurden Sentineltiere positiv auf Helicobacter, Murines Norovirus, Oxyuren (*Syphacia* spp.) und Flagellen getestet.

Eine Genehmigung von den Landesbehörden für die Durchführung des Tierexperimentes gemäß § 8 Tierschutzgesetz lag vor (Regierung Mecklenburg-Vorpommern, Tierversuchsnummer 7221.3-1-001/19).

#### 2.1.2 Versuchsgruppen

---

##### 2.1.2.1 Cuprizone-Intoxikation

Für die Cuprizone-Intoxikation wurden elf Wochen alte weibliche C57BL/6J-Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Staint-Iles, Frankreich) verwendet. Jeweils fünf Mäuse wurden in 820 cm<sup>2</sup> Käfigen mit standardgemäßer Ausstattung, aber ohne Standard-Haltungsfutter gehalten. Die Mäuse erhielten stattdessen über fünf Wochen 0,25 % Cuprizone in Futtermehl. Das Cuprizone-Futtermehl-Gemisch wurde täglich frisch mit einer handelsüblichen Küchenmaschine (Kult X, WMF, Geislingen, Deutschland) eine Minute lang vermengt und dann in Petrischalen in die Käfige gegeben. Käfige und Einstreu wurden dreimal wöchentlich gewechselt.

Die Tiere wurden täglich gesundheitlich überprüft und wöchentlich gewogen. Kriterien der Gesundheitsprüfung waren Aktivität, Atmung, Bewegung, Fell, Konstitution und Dehydrierung.

### **2.1.2.2 EAE-Induktion**

Für die Induktion einer EAE wurden 16 Wochen alte weibliche C57BL/6J-Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Staint-Iles, Frankreich) verwendet. Jeweils fünf Mäuse wurden in 820 cm<sup>2</sup> Käfigen mit Standardausstattung gehalten.

Die EAE wurde durch Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub>-Antigenen, gelöst in komplettem Freund-Adjuvant mit hitzeinaktivierten Mykobakterien, und zusätzlicher Stimulation der Immunantwort durch zweimalige Injektion von PTX induziert. Die für die EAE-Induktion verwendete Antigenemulsion und die PTX-Stammlösung stammten aus einem kommerziellen EAE-Induktions-Kit von Hooke Laboratories (Lawrence, USA). Je 100 µl der Antigenemulsion wurden subkutan in Nacken und lumbalen Rückenbereich injiziert. Die PTX-Stammlösung wurde in Phosphatpufferlösung (engl. Phosphate-buffered-saline, PBS) auf 3 ng/µl verdünnt und zusätzlich intraperitoneal injiziert. Die PTX-Injektion wurde 24 h später einmalig wiederholt. Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine Antigen- oder PTX-Injektionen.

Die Gesundheit der Tiere wurde, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, täglich überprüft und die Tiere wurden wöchentlich gewogen.

### **2.1.2.3 Kombination aus Cuprizone-Intoxikation und EAE-Induktion**

Zur Kombination von Cuprizone-Intoxikation und EAE-Induktion wurden elf Wochen alte weibliche C57BL/6J-Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Staint-Iles, Frankreich) verwendet. Zunächst wurden die Tiere drei Wochen lang wie in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben mit 0,25 %igem Cuprizone-Futtermehlgemisch behandelt. Nach zwei Wochen mit Standard-Haltungsfutter erfolgte die EAE-Induktion der Mäuse wie in Kapitel 2.1.2.2 beschrieben.

## **2.1.3 Klinische Beurteilung der Mäuse**

---

Die klinische Symptomatik der EAE besteht aus einer aufsteigenden bis hin zu Tetraplegie. Nach der Injektion erfolgte eine tägliche, klinische Inspektion der Mäuse nach den Kriterien Aktivität, Atmung, Bewegung, Fell, Konstitution und Dehydrierung. In den ersten sieben Tagen erfolgte zur Minderung von Stress lediglich eine Sichtkontrolle. Ab Tag acht wurden

EAE-spezifische Lähmungserscheinungen durch tägliche Vergabe von Scoring-Werten von 0 bis 5 dokumentiert (Tabelle 2.1.1).

Offene Wunden an den Injektionsstellen wurden täglich mit Dexpanthenolsalbe behandelt. Erreichte ein Tier einen Score von 2,5 wurden zur Sicherstellung der Flüssigkeitsversorgung alle Käfige zusätzlich mit einem Wassergel ausgestattet. Ab einem Score von mindestens 3 erhielten die Tiere eine tägliche subkutane Injektion von 1 ml Ringer-Lösung. Bei einem Score von 4 sollte das betroffene Tier innerhalb von zwei Tagen finalisiert werden. Bei einem Score von 4,5 sollte das Tier am selben Tag finalisiert werden. Kein Tier hatte einen höheren Score als 2,5. Die Scores der EAE-Tiere sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst (Kapitel 8.6).

**Tabelle 2.1.1 Klinische Beurteilung der Mäuse**

Score	Klinische Beobachtungen
0,0	Keine Krankheitssymptome
0,5	Lähmung der Schwanzspitze
1,0	Lähmung des kompletten Schwanzes
1,5	Gelähmter Schwanz und beginnende Lähmung der hinteren Extremitäten
2,0	Gelähmter Schwanz, Schwäche der hinteren Extremitäten und Ataxie <i>oder</i> schwere Ataxie
2,5	Fast vollständige Lähmung beider hinterer Extremitäten <i>oder</i> komplette Lähmung eines Hinterbeines
3,0	Paraplegie <i>oder</i> schwerste Ataxie
3,5	Zusätzlich zu den Symptomen bei einem Score von 3,0 kann sich das Tier aus Rückenlage nicht selbstständig aufrichten
4,0	Zusätzlich partielle Lähmung der vorderen Extremitäten
4,5	Minimale Bewegung vorhanden, apathisch
5,0	<i>Exitus letalis</i> oder Tötung aufgrund schwerwiegender Lähmung



#### **2.1.4 Transkardiale Perfusion und Paraffineinbettung**

---

Zur Einleitung einer terminalen Narkose wurde den Mäusen eine Mischung aus drei Volumenanteilen Ketamin (10 %, 100 mg/kg) und einem Volumenanteil Xylazin (2 %, 10 mg/kg) injiziert. Dabei betrug die Dosis der Narkosemischung 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht der Maus. Die Schmerzreflexe wurden vom Schwanz aufsteigend bis zur Kornea und durch Kneifen mit einer Pinzette, beziehungsweise durch Auftropfen von 70 %igem Ethanol auf das Auge, überprüft. Bei Reflexlosigkeit wurde mit der Präparation fortgefahren.

Die Haut und anschließend das *Peritoneum* der Mäuse wurde von kaudal nach kranial eröffnet, das *Diaphragma* und die Rippen durchtrennt und das Herz freigelegt. Das rechte *Atrium* wurde angeschnitten und in den linken Ventrikel wurde eine gekürzte, stumpfe Flügelkanüle eingeführt. Manuell wurden zunächst 20 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) und nachfolgend mit 30 ml 3,7 %iger Paraformaldehydlösung (PFA) injiziert. Anschließend wurde die Maus an einer Schlauchpumpe (Ismatec IPC, Wertheim, Deutschland) für weitere 7 min mit 150 ml PFA perfundiert (Flussgeschwindigkeit ca. 22 ml/min). Zur Ermöglichung einer Immersionsfixierung wurde nach Abtrennung des Kopfes die Kalotte mit einer scharfen Schere vorsichtig eingeschnitten. Der gesamte Kopf wurde über Nacht in PFA bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gehirn herauspräpariert und in Einbettkassetten überführt.

Nach mindestens 6 h unter fließendem Leitungswasser wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und in Xylol und Paraffin inkubiert. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 2.1.2 zusammengefasst. Die Gehirne wurden anschließend in flüssigem Paraffin eingebettet. Nach vollständiger Aushärtung der Blöcke wurden an einem Rotationsmikrotom (Leica, RM 2255, Wetzlar, Deutschland) 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Jeweils zwei Paraffinschnitte wurden aus einem warmen Wasserbad (43°-45°C) auf einen Superfrost Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

**Tabelle 2.1.2 Dehydrierung von fixiertem Gewebe mit aufsteigender Ethanolreihe**

	Dauer
Laufendes Leitungswasser	6 h
50 % Ethanol	Über Nacht
70 % Ethanol	40 min
70 % Ethanol	40 min
96 % Ethanol	40 min
96 % Ethanol	40 min
100 % Ethanol	40 min
100 % Ethanol	40 min
100 % Ethanol	60 min
Xylol 1	40 min
Xylol 2	40 min
Xylol 3	40 min
Paraffin 1 (60°C)	60 min
Paraffin 2 (60°C)	60 min
Paraffin 3 (60°C)	2 Tage

## 2.2 Histologie und Immunhistochemie

### 2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) handelt es sich um eine Sukzedanfärbung. Die HE-Färbung besteht aus einer basophilen Färbung durch Hämatoxylin und einer acidophilen Färbung durch Eosin. Die Färbung beruht auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption.

Hämatoxylin ist eine Farbvorstufe, die durch Oxidation zu Hämatein umgesetzt wird. Hämatein bildet mit Aluminiumionen den positiv geladenen Farbstoff Hämalaun. Hämalaun lagert sich aufgrund seiner basischen Eigenschaften an negativ geladene Phosphatgruppen an und färbt dementsprechend negativ geladene Zellbestandteile wie Nukleinsäuren. Durch den hohen Gehalt an Desoxyribonukleinsäure im Zellkern erscheint dieser nach der Färbung blau. Hämalaun liegt in saurer Lösung vor. Negativ geladene Carboxylgruppen im Cytoplasma werden dadurch abgesättigt und es kommt zu einer nahezu selektiven Kernfärbung. Das

Eintauchen in Chlorwasserstoffsäure-Ethanol (HCl-Ethanol) bewirkt einen Umschlag der Farbe des Hämalaun zu blau. Durch anschließendes Spülen unter fließendem Leitungswasser, und die damit verbundene pH-Wert-Steigerung, wird das „Bläuen“ und die Stabilisierung des Farbstoffs unterstützt. Eosin färbt positiv geladene Proteine des Zytoplasmas und der extrazellulär Matrix (eosinophile Strukturen) rot. Die saure Lösung des EosinG bewirkt eine Positivierung des Zytoplasmas und fördert das Anlagern von EosinG im Zytoplasma.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (Tabelle 2.2.1). Die einzelnen Schritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sind in Tabelle 2.2.2 zusammengefasst. Die Schnitte wurden abschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (Tabelle 2.2.3). Da die Ethanolreihe Eosin entzieht, wurden die Schnitte leicht überfärbt. Das verbliebene Ethanol wurde mit Xylol entfernt und die Schnitte mit dem Xylol-löslichen Eindeckmedium Depex® eingedeckt. Im Ergebnis sind Zellkerne, Kalk, Bakterien und Knorpelgrundsubstanz blau und Zytoplasma, Kollagenfasern sowie Erythrozyten rot gefärbt.

**Tabelle 2.2.1 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 (100 %) 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

**Tabelle 2.2.2 Färbeschritte für HE-Färbung**

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Mayers Hämalaun Lösung	10 min
2	HCl-Ethanol	1-2 s
3	Laufendes Leitungswasser	15 min
4	Aqua dest.	2 min
5	EosinG-Lösung	2 min
6	Aqua dest.	30 s

**Tabelle 2.2.3 Dehydrierung nach der HE-Färbung**

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	70 % Ethanol	8-10 min, je nach gewünschtem Färbeergebnis
2	80 % Ethanol	2 min
3	90 % Ethanol	2 min
4	96 % Ethanol	2 min
5	100 % Ethanol	2 min
6	100 % Ethanol	2 min
7	Xylol 1	10 min
8	Xylol 2	10 min
9	Xylol 3	10 min

## **2.2.2 Indirekte Immunhistochemie**

### **2.2.2.1 Prinzip der Immunhistochemie**

Bei der Immunhistochemie erfolgt eine indirekte Darstellung spezifischer Antigene im Gewebeschnitt durch schrittweises spezifisches Binden zweier Antikörper. Dabei ist der primäre Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen und der biotinylierte sekundäre Antikörper gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet. Durch mehrfaches Binden sekundärer Antikörper an einen primären Antikörper kann eine Amplifikation des Signals erreicht werden.

An den biotinylierten sekundären Antikörper kann sich, aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin, ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC-Komplex) binden. Der

ABC-Komplex besteht aus Avidin (Reagenz A) und einer an Biotin gekoppelten Meerrettichperoxidase (engl. horse radish peroxidase, HRP) (Reagenz B). Durch Vermischen dieser beiden Teillösungen 30 min vor Applikation, bindet das Biotin mit hoher Affinität an eine der vier Bindungsstellen des Avidins.

In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) katalysiert die HRP die Umwandlung des phenolischen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Substrats in dessen unlösliche Form. Durch diese Umwandlung entsteht ein bräunliches Präzipitat. Das Prinzip der immunhistochemischen Markierung ist in Abbildung 2.2.1 dargestellt.

Im Rahmen einer Immunhistochemie kann es zu unspezifischen Bindungen der Antikörper kommen. Mögliche Ursachen dafür sind Sekundärantikörper, die endogene Immunglobuline binden, Primär- und Sekundärantikörper, die durch endogene Fc-Rezeptoren gebunden werden, oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Gewebsbestandteilen und Antikörpern. Vor dem Auftragen des primären Antikörpers wird mit einem Blockserum inkubiert. Das in dem Blockserum enthaltene Normalserum stammt aus der gleichen Spezies wie der Sekundärantikörper. Antikörper und Proteine aus dem Normalserum lagern sich im Gewebe an Immunglobulin-ähnliche Proteine und Strukturen mit unspezifischer Bindungsaffinität zu Immunglobulinen an. Für den Sekundärantikörper stehen dadurch weniger unspezifische Bindungsstellen zur Verfügung, da diese blockiert wurden. Um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu beurteilen, wurden in jeder immunhistochemischen Markierung Negativkontrollen mitgeführt. Das dafür verwendete Gewebe exprimiert das zu untersuchende Antigen. Negativkontrollen wurden nicht mit dem primären Antikörper inkubiert, aber zur gleichen Zeit und nach demselben Protokoll wie alle anderen Schnitte behandelt.

Ein weiterer Grund für ein unspezifisches Signal kann die gewebsintrinsische Peroxidase sein. Dieses endogene Enzym katalysiert die gleiche Reaktion wie die im ABC-Komplex enthaltene HRP. Dadurch kann es zu unspezifischen Ausfällungen des DAB-Substrats kommen. Um dies zu verhindern, werden die Schnitte in 0,35 % Wasserstoffperoxid in PBS (1x) für 30 min in einer Glasküvette inkubiert. Die endogene Peroxidase wird dadurch gesättigt, ihre Aktivität reduziert und das unspezifische Hintergrundsignal gesenkt.

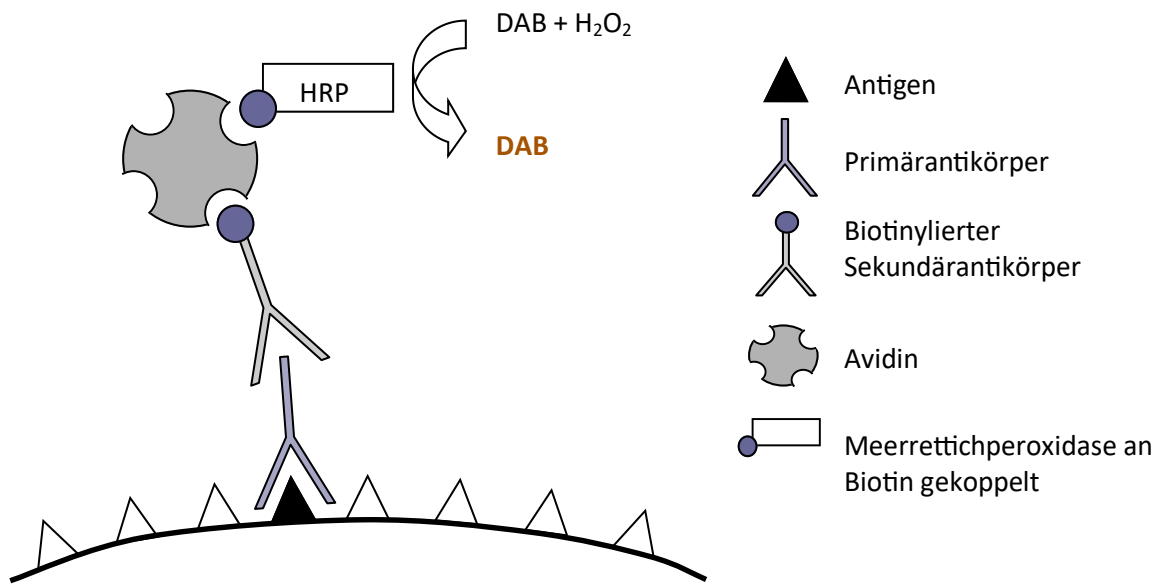


Abbildung 2.2.1 Prinzip der immunhistochemischen Markierung nach der ABC-Methode

### 2.2.2.2 Durchführung der immunhistochemischen Markierung

Im gesamten Verlauf der immunhistochemischen Markierung wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrocknen. Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert (Tabelle 2.2.1). Durch Einbettung und Fixierung des Gewebes kann es zu Quervernetzungen von Proteinen kommen. Einige Epitope können dadurch nicht mehr von ihrem zugehörigen Antikörper erkannt werden, dies wird als Maskierung bezeichnet. Eine Maskierung von Epitopen kann das Färbeergebnis beeinträchtigen. Daher erfolgte, abhängig vom primären Antikörper, eine Hitze-induzierte Antigenfreilegung (heat induced epitope retrieval, HIER) durch zehnmütiges Kochen in Citratpuffer (pH=6,0) oder Tris/EDTA-Puffer (pH=9,0). Nach Abkühlung der Schnitte auf Raumtemperatur wurden sie unter leichtem Schütteln dreimal für 5 min in PBS gewaschen. Nachfolgend wurde mit Blockserum 1 für 60 min bei Raumtemperatur geblockt.

Es folgte die Inkubation des primären Antikörpers in seiner jeweiligen Verdünnung in Blockserum 1 (siehe Tabelle 8.5.1) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Dabei wurden 100 µl pro Objektträger verwendet. Negativkontrollen wurden nicht mit dem primären Antikörper inkubiert sondern mit Blockserum 1.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal für fünf Minuten in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Dabei wurde die Negativkontrolle in einer separaten Küvette gewaschen. Anschließend erfolgte ein Blocken der gewebsintrinsischen Peroxidase für 30 min

im Dunkeln mit 0,35 % Wasserstoffperoxid in PBS. Es folgten erneut drei fünfminütige Waschschrte in PBS. Das Waschen der Schnitte in PBS wurde im weiteren Verlauf zwischen allen weiteren Färbeschrten wiederholt.

Der sekundäre Antikörper wurde 1:200 in Blockserum 1 verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Der ABC-Komplex wurde aufgetragen und für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Visualisierung mit dem DAB-Komplex erfolgte durch zehminütige Inkubation. Die Schnitte wurden anschließend dehydriert und mit dem xylollöslichen Eindeckmedium Depex® eingedeckt (Tabelle 2.2.3). Alle Schritte der immunhistochemischen Markierung sind in Tabelle 2.2.5 zusammengefasst. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur in Aufbewahrungskästen gelagert.

### **2.2.2.3 Etablierung primärer Antikörper**

Die primären Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert und genutzt wurden, sind im Anhang (Kapitel 8.5) zusammengefasst. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für den jeweiligen Antikörper fand eine zweistufige Etablierung statt. Im ersten Schritt wurde ermittelt, ob eine Demaskierung des Antigens notwendig ist. Dazu wurden vergleichbare Schnitte zum einen ohne HIER und zum anderen in Tris/EDTA- und in Citrat-Puffer gekocht und die immunhistochemische Markierung wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll mit der vom Hersteller empfohlenen Antikörperkonzentration durchgeführt. Für das HIER mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis wurde im zweiten Schritt die immunhistochemische Markierung mit dem Antikörper in verschiedenen Verdünnungen wiederholt, um die Konzentration mit optimalem Verhältnis zwischen starkem spezifischen Signal und geringer unspezifischer Hintergrundfärbung zu ermitteln.

**Tabelle 2.2.4 Dehydrierung nach der immunhistochemischen Markierung**

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

**Tabelle 2.2.5 Schritte der immunhistochemischen Markierung**

Schritt	Zusammenfassung
1	Entparaffinierung und Rehydrierung
2	Antigen-Demaskierung
3	Blocken mit Normalserum
4	Inkubation Primärantikörper
5	Waschen in PBS
6	Peroxidaseblock
7	Waschen in PBS
8	Inkubation Sekundärantikörper
9	Waschen in PBS
10	Inkubation ABC-Komplex
11	Waschen in PBS
12	Visualisierung mit DAB
13	Dehydrierung und Eindecken mit Depex®



### **2.2.3 Immunfluoreszenzdoppelmarkierung**

---

#### **2.2.3.1 Prinzip der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung**

Ein Nachteil der beschriebenen indirekten Immunhistochemie ist, dass nur ein Antigen während einer Markierung nachgewiesen werden kann. Um mehr als ein Protein, beziehungsweise Antigen, darzustellen, wurden daher Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen durchgeführt. Wie die beschriebene immunhistochemische Markierung, ist diese eine indirekte Nachweismethode.

Das Prinzip dieser Methode ähnelt dem Prinzip der chromogenen immunhistochemischen Markierung.

Primäre Antikörper aus verschiedenen Spezies binden an zwei verschiedenen gesuchten Antigenen. Die Sekundärantikörper binden an den Spezies-spezifischen Fc-Teil des Primärantikörpers. Somit ist eine Markierung zweier Antigene parallel möglich. Anders als bei der chromogenen immunhistochemischen Markierung, sind die Sekundärantikörper direkt mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt.

Zur topographischen Orientierung im Schnitt erfolgt eine universelle nukleäre Markierung mit dem ebenfalls fluoreszierenden DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol). In der jeweiligen Anregungswellenlänge des Fluorochroms erfolgt am Epifluoreszenzmikroskop (Leica CM6 B, Wetzlar, Deutschland) die Visualisierung der Markierung. Dort, wo der Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden konnte, entsteht bei Anregung ein Signal in Form von emittiertem Licht in der Emissionswellenlänge des Fluorochroms. Das Prinzip der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung ist in Abbildung 2.2.2 dargestellt.

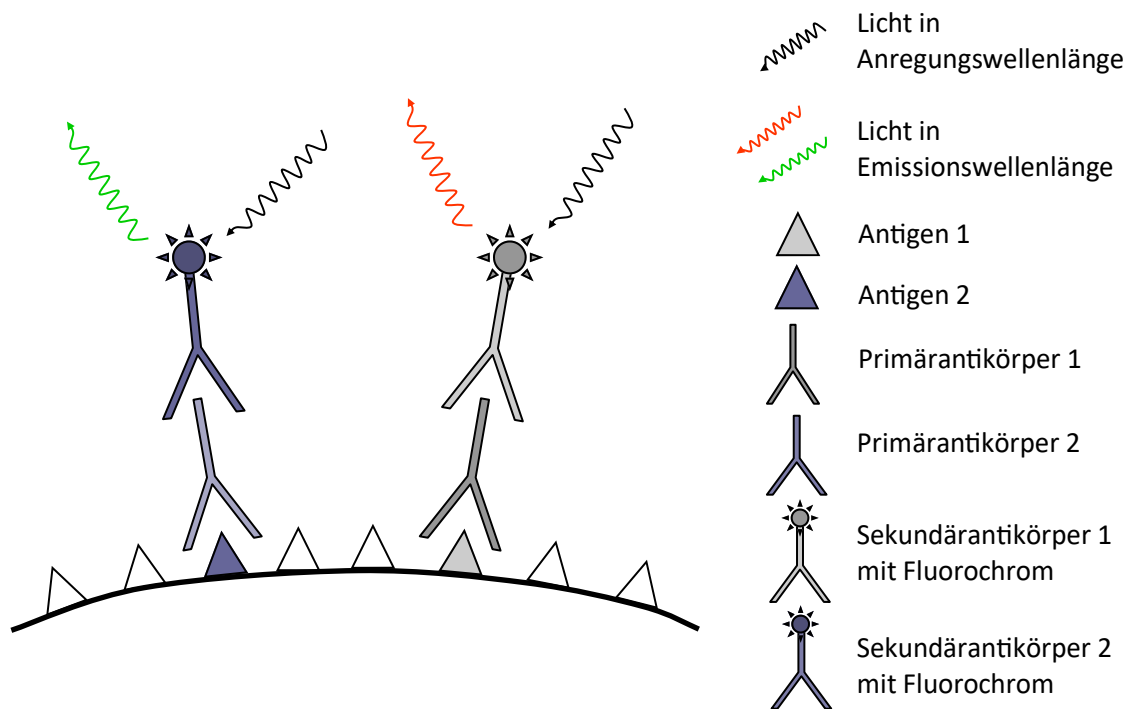


Abbildung 2.2.2 Prinzip der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung

### 2.2.3.2 Durchführung der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung

Die Immunfluoreszenzdoppelmarkierung beginnt, bis zum Blocken mit Blockserum 2, mit denselben Schritten wie das der chromogenen immunhistochemischen Markierung (Tabelle 2.2.5).

Nach dem Blocken mit Blockserum 2 für 60 min, wurden die Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in Blockserum 2 aufgetragen. Beide Antikörper wurden in einer gemeinsamen Lösung verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die genutzten Primär- und Sekundärantikörper sind im Anhang (Kapitel 8.5) zusammengefasst.

Am zweiten Tag wurden die Sekundärantikörper in Blockserum 2 verdünnt aufgetragen. Deren Verdünnung betrug bei der Immunfluoreszenzmarkierung stets 1:250. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über zwei Stunden in einer feuchten Kammer. Da die, an die Sekundärantikörper gekoppelten Fluorochrome, lichtempfindlich sind, wurden alle Schnitte nachfolgend unter möglichst wenig Lichteinfall behandelt. Ein frühzeitiges Ausbleichen der Fluorochrome wurde somit minimiert. Zwischen den Schritten wurden die Schnitte je drei Mal für fünf Minuten in PBS gewaschen.

Zum Eindecken der Schnitte unter einem Deckgläschen wurde Fluoroshield™ verwendet. Darin gelöstes DAPI sorgt für eine gleichzeitige Markierung der Zellkerne. Die Schnitte wurden nach dem Eindecken bei 4°C im Dunkeln gelagert.

**Tabelle 2.2.6 Schritte der Immunfluoreszenzmarkierung**

Schritt	Zusammenfassung
1	Entparaffinierung und Rehydrierung
2	Antigen-Demaskierung
3	Blocken mit Normalserum
4	Inkubation Primärantikörper
5	Waschen in PBS
6	Inkubation Sekundärantikörper
7	Waschen in PBS
8	Eindecken mit Fluoroshield mit DAPI

### **2.2.3.3 Negativkontrollen und Kreuzkontrollen der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung**

Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Antikörper-Paaren besteht bei der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung das potentielle Risiko, dass ein Sekundärantikörper an den falschen Primärantikörper bindet. Durch sogenannte Kreuzproben, die parallel zu den anderen Schnitten in der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mitgeführt wurden, wurde dies überprüft. Für die Kreuzproben wurden die Primärantikörper mit dem „falschen“ Sekundärantikörper inkubiert. Neben den Kreuzkontrollen wurden stets Negativkontrollen mitgeführt, um mögliche unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu beurteilen.

## **2.3 Histologische Auswertung**

### **2.3.1 Auswertung von HE-Färbungen**

Die Auswertung der HE-Färbungen erfolgte mit einem am Mikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) installierten Kamerasystem (DMC 6200, Leica, Wetzlar, Deutschland). Zur Darstellung größerer Areale eines Schnittes wurden einzelne Bilder durch die Software Leica Application Suite X (Wetzlar, Version 3.4.2) zusammengesetzt. Die Orientierung im Mausgehirn erfolgte mit Hilfe der Einteilung nach Bregma [172]. Als Bregma wird der Punkt des Zusammentreffens der *Sutura coronalis* und der *Sutura sagittalis* bezeichnet. Er dient als

Referenzpunkt. Areale rostral dieses Punktes werden als positive Entfernungen in Millimeter angegeben, Areale okzipital als negative Werte.

### **2.3.2 Auswertung der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung I**

---

Die Auswertung und Visualisierung von Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland). Es wurden von jedem Schnitt in allen drei Kanälen (blau: Exzitation 350/50 nm, Emission 460/50 nm: DAPI; rot: Exzitation 560/40 nm, Emission 645/75 nm: Anti-CD3; grün: Exzitation 480/40 nm, Emission 527/30 nm: Anti-Laminin) Bilder angefertigt. Die Einstellungen aller Kanäle wurden am ersten Schnitt angepasst und folgend für alle Schnitte beibehalten. Alle Bilder einer Immunfluoreszenzmarkierung wurden am selben Tag aufgenommen. Damit wurde ein Verblässen der Fluoreszenz verhindert und die Vergleichbarkeit der Bilder gewährleistet. Helligkeit und Kontrast wurden für die gedruckte Arbeit mit der Software Gimp (Version 2.10.18) optimiert.

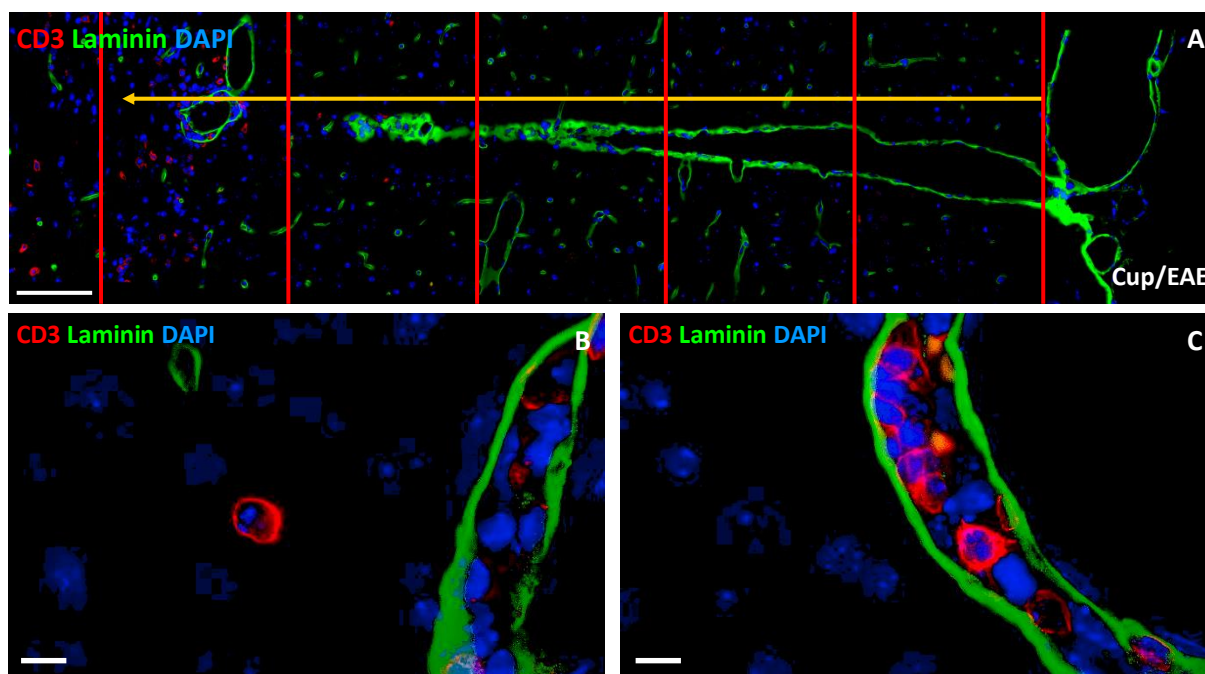
Zur Darstellung von T-Zellen im PVS wurde eine Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit einem Anti-CD3 und einem Anti-Laminin Antikörper durchgeführt. Es wurden Paraffinschnitte von acht Cup/EAE-Tieren verwendet. Laminin ist Bestandteil der Basallamina und dient als Marker sowohl für die vaskuläre als auch für die astrozytäre Basallamina. Unter dem Mikroskop sind die beiden Blätter der Basallamina im murinen Gehirn von Kontrolltieren nicht voneinander abzugrenzen. Durch Einwanderung von Immunzellen bildet sich ein Infiltrat zwischen den Basallaminae und damit ein unter dem Mikroskop sichtbarer Raum. Diese Immunfluoreszenzdoppelfärbung diente dem Nachweis von T-Zellen im PVS. Als PVS wurde jede Aufspaltung der Basallaminae gezählt. Im gesamten Gehirn wurden die PVS aufgesucht und dokumentiert. Die PVS, die CD3<sup>+</sup> Zellen enthielten, wurden manuell gezählt.

### **2.3.3 Auswertung der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung II**

---

Zur Darstellung von T-Zellen entlang eines penetrierenden Gefäßes wurde eine Anti-CD3/Anti-Laminin-Immunfluoreszenzdoppelmarkierung durchgeführt. Dazu wurden anhand von vorher angefertigten HE-Färbungen gezielt Schnitte mit penetrierenden meningealen Gefäßen von sechs Cup/EAE-Tieren gewählt. Am Epifluoreszenzmikroskop wurden mit dem 20-fach-Objektiv durch Zusammenfügen überlappender Teilbilder Aufnahmen vom gesamten Verlauf eines Gefäßes erstellt. Helligkeit und Kontrast wurden für die gedruckte Arbeit mit der Software Gimp optimiert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ (Version 1.53c, NIH, Bethesda, MD, USA). Die CD3<sup>+</sup> Zellen wurden gezählt und nach ihrer Lage zu den Basallaminae in *interlaminär* und *extravasal* eingeteilt. Als *extravasale* Zellen wurden CD3<sup>+</sup> Zellen bis zu einem Abstand von etwa fünf Zelldurchmessern von der astrozytären Basallamina gewertet (Abbildung 2.3.1-B). Anhand einer eigens für diese Arbeit geschriebenen ImageJ-Befehlszusammenfassung (im Folgenden als Macro bezeichnet) wurde der Kortex, ausgehend von den Meningen, in fünf 250 µm breiten Zonen eingeteilt (Abbildung 2.3.1-A). Für jede Zone wurde die Länge der angeschnittenen Gefäßwand gemessen und die Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die fünf Zonen wurden von 1 bis 5 durchnummeriert, dabei war Zone 1 die Zone direkt unter der Meningenoberfläche.



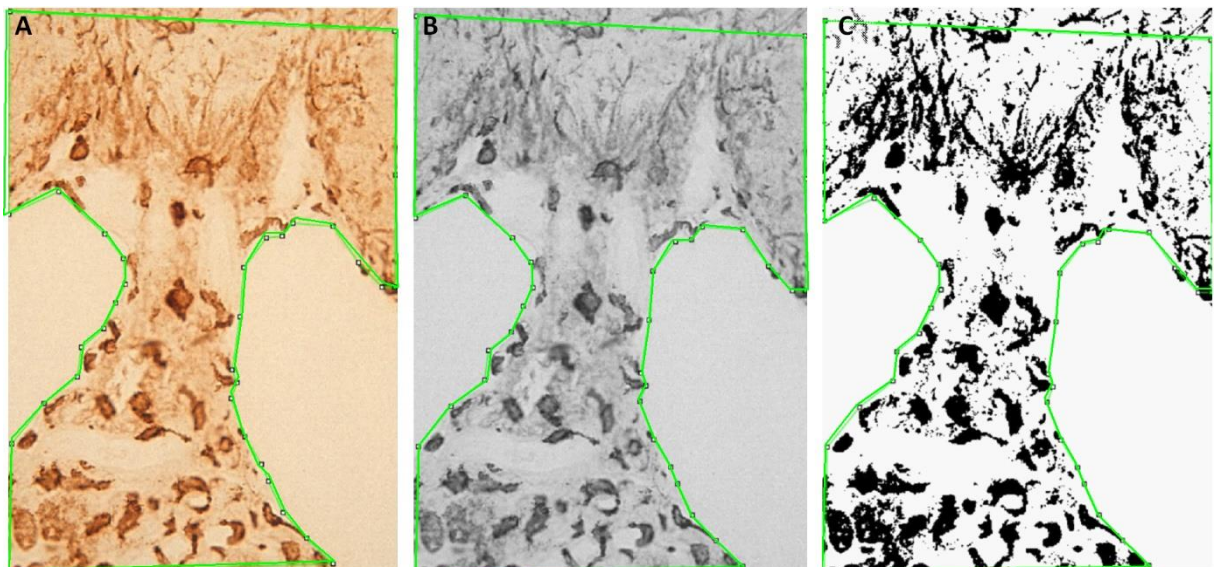
**Abbildung 2.3.1 Auswertung Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit einem Macro**  
Anti-Laminin (grün) - Anti-CD3 (rot) Immunfluoreszenzdoppelmarkierung, Kernfärbung durch 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau); (A) Einteilung des Gefäßes in Zonen durch regelmäßige Senkrechten auf einem Richtungspfeil mit Startpunkt an den Meningen; (B) extravasale CD3<sup>+</sup> Zelle; (C) interlaminäre CD3<sup>+</sup> Zellen; Maßstab (A) 100 µm; (B)-(C) 10 µm.

### 2.3.4 Auswertung der optischen Dichte

Histologische Bilder von Immunhistochemischen Markierungen wurden mit einem am Mikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) installierten Kamerasystem (DMC 6200, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einem 40-fach-Objektiv aufgenommen. Es wurden Bilder im zu untersuchenden Gebiet (engl. region of interest, ROI) und Bilder in einer gewählten Referenzregion aufgenommen. Als Referenzregion wurde eine gut reproduzierbare Region in

der weißen Substanz gewählt. Diese befand sich in den *Fimbriae hippocampi*. Helligkeit und Kontrast wurden für die gedruckte Arbeit mit der Software Gimp optimiert.

Zur Quantifizierung sehr eng liegender Zellen, wie Mikrogliazellen, wurde eine Messung der optischen Dichte durchgeführt. Dazu wurde die ROI mittels eines Polygons festgelegt. Das Bild wurde zunächst in Graustufen umgewandelt und anschließend über einen vorher gewählten Schwellenwert in ein binäres Format umgewandelt. Sowohl die ROI als auch die Referenzregion wurden mit demselben Schwellenwertalgorithmus ausgewertet. Ergebnis der optischen Dichtemessung ist die relative Dichte der schwarzen Pixel in der ROI, angegeben in Prozent. In Abbildung 2.3.2 sind die drei Schritte zur Vorbereitung der optischen Dichtemessung dargestellt.



**Abbildung 2.3.2 Vorbereitung der optischen Dichtemessung**

(A) Das grüne Polygon beschreibt das Untersuchungsgebiet (engl. region of interest, ROI) ("polygonale Auswahl"); (B) Umwandlung in Graustufen ("Image", "Type", "8 bit"); (C) Umwandlung in binäres Bild über einen Schwellenwert ("Image", "Adjust", "Threshold").

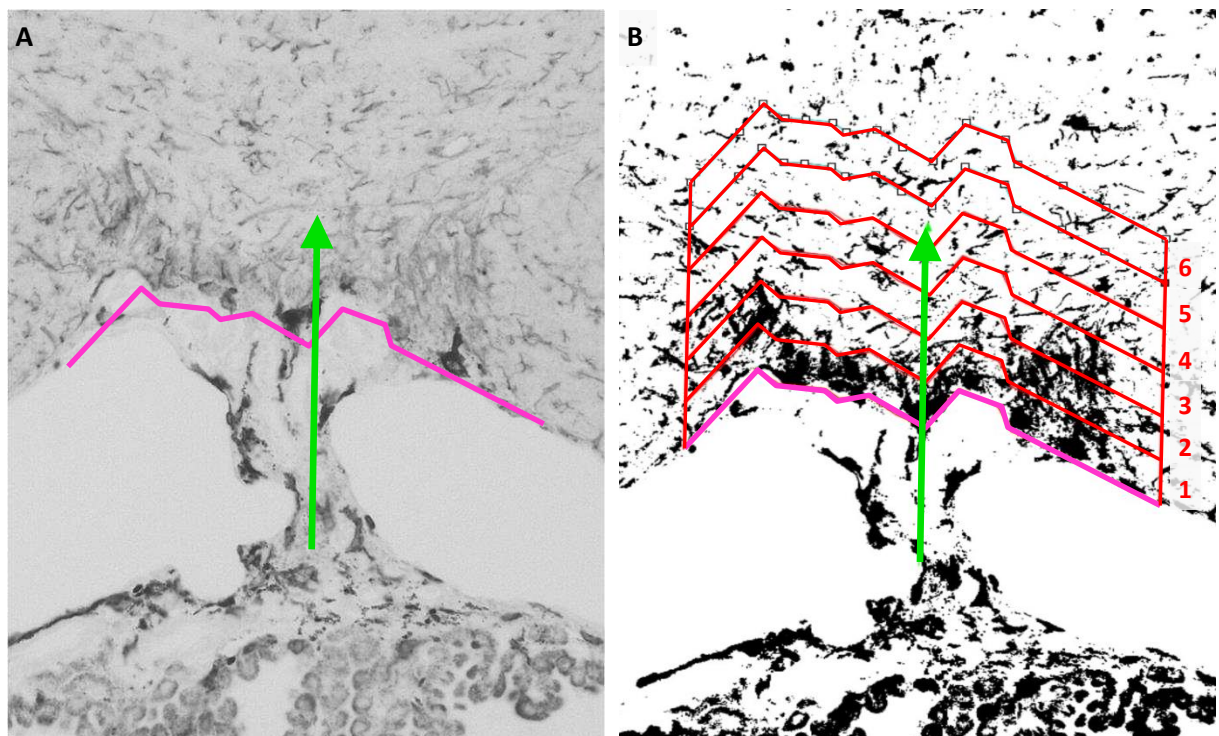
### **2.3.5 Auswertung der optischen Dichte in Schichten**

---

Zur Darstellung einer Änderung der optischen Dichte in Entfernung von einem bestimmten Punkt wurde ein eigens für diese Arbeit geschriebenes Macro verwendet. Die Bilder wurden mit einem 20-fach-Objektiv mit dem, in Kapitel 2.3.4 beschriebenem, Mikroskop und Kamerasystem aufgenommen. Helligkeit und Kontrast wurden für die gedruckte Arbeit mit der Software Gimp optimiert.



Die Bilder wurden zunächst in Graustufen umgewandelt. Es wurde eine polygonale Referenzlinie gezogen und ein Richtungspfeil angegeben. Anschließend wurde die Referenzlinie in der Richtung des Pfeils um eine bestimmte Entfernung sechsmal parallel verschoben. Zwischen den Kopien der Referenzlinie ergaben sich sechs gleich große ROI (Abbildung 2.3.3). Es erfolgte eine optische Dichtemessung anhand eines vorher gewählten Schwellenwerts in allen sechs ROI gleichzeitig. Die Angabe der optischen Dichte erfolgte als Anteil schwarzer Pixel zum Anteil weißer Pixel in Prozent.



**Abbildung 2.3.3 Zeichnen und Verschieben der Referenzlinie**

(A) Zeichnen der Referenzlinie und des Richtungspfeils in einem 8 bit Bild, dabei ist die Länge des Pfeils irrelevant; (B) Verschieben der Referenzlinie in Richtung des Pfeils um Entfernung  $x$  und Darstellung der 6 Untersuchungsgebiete (engl. region of interest, ROI).

## 2.4 Untersuchung von Genexpressionen

---

Ziel des Versuchs war es, die Expression von Genen proinflammatorischer Zytokine anhand der Menge der Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid, mRNA) in den Meningen verschiedener Versuchsgruppen zu vergleichen.

### 2.4.1 Gewebeaufbereitung

---

Zur Präparation der Meningen wurden die Tiere, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, transkardial mit PBS perfundiert. Es wurde keine Fixierung mit PFA durchgeführt. Nach Abtrennung des Kopfes wurde die Schädelbasis vom *Foramen magnum* aus mit einer scharfen Schere vorsichtig eröffnet und das Gehirn entnommen. Mithilfe eines Stereomikroskopes wurden die Meningen vorsichtig mit einer spitzen Pinzette von der Innenseite der Kalotte abgezogen. Die präparierten Meningen wurden dann in 1 ml PeqGold TriFast™, einem gebrauchsfertigem Reagenz für die Extraktion von RNA, überführt.

Zur Vergrößerung der RNA-Menge wurden die Meningen von je zwei Tieren in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Bei fünf Tieren pro Versuchsgruppe ergab dies zwei gemischte Proben und eine einzelne (siehe Anhang Kapitel 8.6).

### 2.4.2 RNA-Isolation

---

#### 2.4.2.1 Prinzip

Zur Isolation der RNA wurde die Single-Step-Methode nach Chromczynski und Sacchi angewendet [173]. Dazu wurde TriFast™ von PeqLab verwendet. Dieses enthält Guanidiniumthiocyanat und Phenol. Guanidiniumthiocyanat lysiert die Zellen und deaktiviert RNasen, sowie andere Enzyme. Phenol löst die RNA. Durch Zugabe von Chloroform und Zentrifugation kommt es zu einer Phasentrennung. Die obere wässrige Phase enthält die gelöste RNA. Die Interphase enthält die Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid, DNA), die untere Chloroformphase enthält Proteine. Die RNA wird mittels Isopropanol und Ethanol präzipitiert, gewaschen und anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst.

#### 2.4.2.2 Durchführung

Zu Beginn der RNA-Isolation wurden die Meningen mittels kleiner Keramikkügelchen (Precellys®-Keramik-Kit) in einem Schüttler (Minilys Personal Homogenizer, Bertin, Rockville, USA) homogenisiert. Auf einem gekühlten Metallständer erfolgte eine Inkubation bis zur



Auflösung des gebildeten Schaums. Durch weitere 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine komplette Aufspaltung von Kernproteinkomplexen sichergestellt.

Anschließend wurden 1000 µl der Probe in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In jedes Reaktionsgefäß wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben. Nach gründlichem Vibrationsmischen wurden die Reaktionsgefäße für 10 min auf einem eiskalten Metallständer inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Reaktionsgefäße für 20 min bei 20.000 g und 0°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur wässrigen Phase wurden 500 µl Isopropanol gegeben und gründlich vibrationsgemischt. Wegen der zu erwartenden geringen RNA Menge erfolgte eine Inkubation über Nacht bei -20°C.

Am zweiten Tag wurden die Reaktionsgefäße für 60 min bei 20.000 g und 0°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das RNA-Pellet wurde zum Waschen mit 1000 µl auf -20°C gekühltem 75 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei 20.000 g und 0°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet wurde bei 55°C für 60 min mit 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Reaktionsgefäße wurden abschließend kurz zentrifugiert. Es folgte eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.4.2.3 Quantifizierung der RNA**

Zur Quantifizierung der aufgereinigten RNA wurde die Methode der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung genutzt. Dazu wurde das NanoPhotometer® NP80 (Implen GmbH, München, Deutschland) verwendet. Es wurde je Reaktionsgefäß 1 µl auf den Sensor gegeben. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Durch Multiplikation der optischen Dichte mit 40 µg/ml ergibt sich die vorhandene RNA-Konzentration.

Eine Probenverunreinigung durch Phenole oder Proteine kann durch den Quotienten aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden, da das Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenolen bei 280 nm liegt. Bei einer reinen RNA-Probe liegt der Wert des Quotienten zwischen 1,8 und 2,0. Bei einer Kontamination mit Phenolen oder Proteinen ist der

Quotient deutlich geringer [173]. Der Quotient von 260 nm/280 nm lag bei den untersuchten Proben im Mittel bei  $1,7 \pm 0,06$ .

## **2.4.3 Reverse Transkription**

---

### **2.4.3.1 Prinzip**

Zur Ermöglichung von Analysen der RNA Menge mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR, siehe Kapitel 2.4.4) muss zunächst die RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) umgeschrieben werden, da die PCR mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase arbeitet. In dieser Arbeit wurde die reverse Transkriptase (RT) aus dem Moloney murinen Leukämie-Virus (M-MLV) mit einem Temperaturoptimum bei 37°C verwendet. Zunächst wird an der einzelsträngigen RNA durch Bindung komplementärer DNA-Bausteine, den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP), ein Hybrid-Doppelstrang synthetisiert. Dieser Schritt wird durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität des Enzyms katalysiert. Durch die RNase-H-Aktivität der M-MLV RT wird der RNA-Anteil des Hybridstrangs abgebaut. Der verbliebene DNA-Einzelstrang wird durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität der RT zu einem Doppelstrang synthetisiert. Als initiale Bindungsstellen für die M-MLV RT dienen zufällige Hexamerprimer (Random Primer). Diese hybridisieren an zufälligen Stellen der RNA, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass mRNA in cDNA umgeschrieben wird für alle Bereiche der mRNA gleich ist. Dithiothreitol (DTT) ist ein Reduktionsmittel, welches die Oxidation von Proteinen aus dem Zellinneren mit Luftsauerstoff verhindert. Somit wird die Funktion der Proteine konserviert. DTT ist ein Zusatz im Puffer der reversen Transkription und sichert die Funktion des Enzymes RT.

### **2.4.3.2 Durchführung**

Nach der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung der RNA wurde die RNA auf 1 µg in 11 µl Probenvolumen mit RNase freiem Wasser verdünnt. Die Proben wurden bei 90°C für 5 min im Thermomixer (ThermoMixer C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt.

Es wurde ein Mastermix mit Random Primern, Puffer (5x First Strand Buffer), DTT, dNTPs und M-MLV RT angesetzt. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 2.4.1 zu entnehmen.

Es wurden 8,1 µl vom Mastermix in jede Probe gegeben und gründlich durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt. Anschließend wurden die Proben bei 37°C im Thermomixer für 50 min inkubiert. Durch anschließende 15 min Inkubation bei 90°C wurde die M-MLV RT inaktiviert. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Als Positivkontrolle wurde eine Probe mitgeführt, aus der in einer vorangegangenen reversen Transkription erfolgreich cDNA synthetisiert werden konnte.

**Tabelle 2.4.1 Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkriptase**

Reagenz	Volumen/ 1 Probe [µl]
5x First Strand Buffer	4
DTT	2
dNTP	1
Random Primer	0,1
M-MLV RT	1

### **2.4.4 Kontroll-Polymerase-Ketten-Reaktion**

Um zu überprüfen, ob sich in den Reaktionsgefäßen nach der reversen Transkription cDNA befindet, wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt.

Als Kontrolle wurden Primer für das Gen der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt*) verwendet. *Hprt* ist ein konstitutiv exprimiertes Gen (Haushaltsgen, engl. Housekeeping gene). Es hat eine konstante Expression unabhängig von der Behandlung des Tiers und wird ubiquitär exprimiert.

#### **2.4.4.1 Prinzip**

Bei der PCR wird die cDNA anhand von zwei passenden Oligonukleotidprimern und einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase vervielfältigt.

Die PCR läuft in drei Schritten ab, die sich zyklisch wiederholen. Im Ansatz für die PCR enthalten sind:

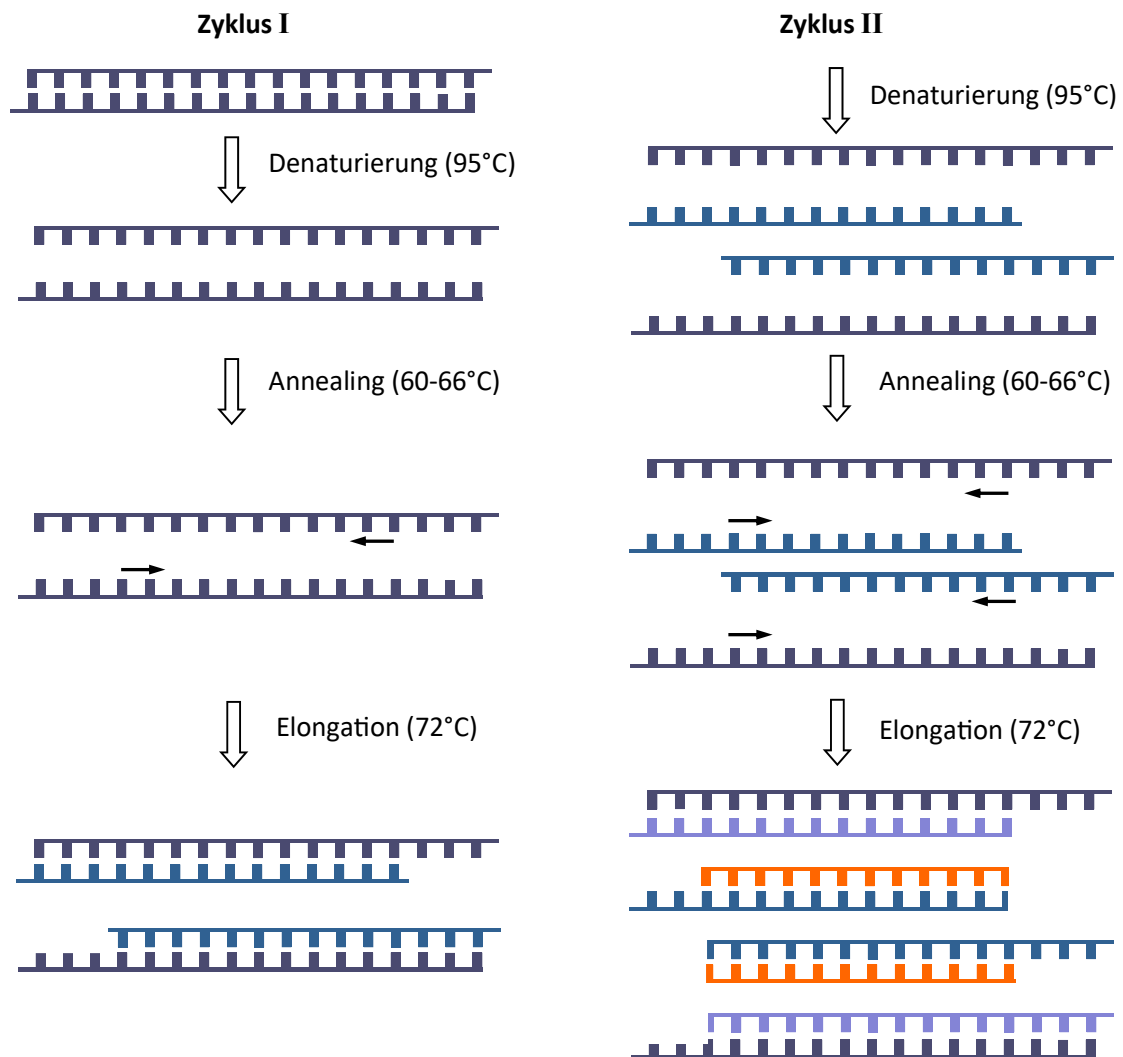
- > cDNA-Vorlage mit der zu amplifizierenden Zielregion
- > zwei Primer, die komplementär zum 3`-Ende des Matrizenstrangs (Reverse Primer) und des Nichtmatrizenstrangs (Forward Primer) der Zielregion binden

- > hitzestabile Polymerase (Taq-Polymerase) mit einem Temperaturoptimum bei 72°C
- > Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)
- > Puffer-Lösung für optimale Umgebung für Aktivität und Stabilität der Polymerase, enthält zweiwertiges Magnesium, welches ein wichtiger Kofaktor für die Polymerase ist
- > Reinstwasser

Zu Beginn des Programms des Thermozyklers wird die Taq-Polymerase bei 95°C aktiviert. Dieser sogenannte Heißstart bewirkt eine Reduktion unspezifischer DNA-Amplifikationen. Im nächsten Schritt erfolgt eine Denaturierung der cDNA bei ebenfalls 95°C. Es kommt zur Aufspaltung der Doppelhelix, durch Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren. Dies ermöglicht die Hybridisierung der Primer (Annealing) an die komplementären DNA-Basen der Einzelstränge der cDNA. Die optimale Annealing-Temperatur wurde für jedes Primer-Paar im Rahmen von Vorexperimenten empirisch ermittelt (siehe Kapitel 2.4.4.4) und liegt zwischen 60°C und 66°C (siehe Tabelle 2.4.6). Die für die Elongation verwendete thermostabile Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C. Die Polymerase bindet an das Primer-DNA-Hybrid und verlängert den Primer in 5'-3'-Strich Richtung zu einem komplementären DNA-Strang. Dabei verknüpft die Polymerase die 5'-Phosphatgruppe der dNTP mit der Hydroxylgruppe am wachsenden 3'-Ende des cDNA-Strangs. Nach dem ersten Zyklus sind somit die Stränge der ursprünglichen cDNA und cDNA-Kopien vorhanden, die deutlich länger sind als die Zielregion. Erst im zweiten Zyklus entstehen cDNA-Produkte der gewünschten Länge, und erst nach vier bis fünf Zyklen nehmen diese überhand. Der Ablauf der ersten zwei Zyklen ist in Abbildung 2.4.1 dargestellt.

Die PCR durchläuft 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Nach dem letzten Zyklus werden die Proben für 2 min bei 72°C inkubiert, um eine vollständige Amplifizierung sicherzustellen. Abschließend werden die Proben bei 10°C gekühlt, bis sie aus dem Thermozykler entnommen werden.

Eine Amplifikation der cDNA findet nur statt, wenn ausreichend Nukleotide und Primer vorhanden sind. Bei steigender Anzahl von Amplifikationsprodukten nimmt die Vermehrungsrate stark ab. Es kommt zu einer Stagnation.



**Abbildung 2.4.1 Prinzip der Polymerasenkettenreaktion**

Schematische Darstellung der Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid, DNA)-Amplifikation während der Polymerasenkettenreaktion (PCR), Forward und Reverse Primer sind durch unterschiedlich orientierte Pfeile dargestellt, DNA Stränge aus unterschiedlichen Zyklen sind farblich gekennzeichnet, nach dem zweiten Elongationsschritt ist erstmals das PCR-Produkt in erwarteter Länge vorhanden (orange).

#### 2.4.4.2 Durchführung

Die Proben wurden aufgetaut, vibrationsgemischt und kurz zentrifugiert. Der Mastermix wurde gemäß Tabelle 2.4.2 vorbereitet.

In jedes PCR-Röhrchen wurden 11,5 µl Mastermix und je 1 µl cDNA-Probe gegeben. Die Negativkontrolle der PCR enthielt, statt cDNA, 1 µl RNase-freies Wasser. Zusätzlich zur Negativkontrolle der PCR wurde stets eine Positivkontrolle der PCR und die Negativ- und Positivkontrolle der reversen Transkription mitgeführt. Als Positivkontrolle für die

Kontroll-PCR wurden Proben aus Vorexperimenten verwendet, die die gleiche DNA enthielten.

Die PCR-Röhrchen wurden kurz zentrifugiert und dann im Thermozykler (Mastercycler, Nexus Gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) platziert. Das Programm wurde wie in Tabelle 2.4.3 beschrieben gewählt. Eine Gelelektrophorese wurde anschließend durchgeführt.

**Tabelle 2.4.2 Mastermixzusammensetzung für die PCR**

Reagenz	Volumen/ 1 Probe [ $\mu$ l]
Reinstwasser	8,25
5x PCR Buffer	2,5
Forward Primer	0,25
Reverse Primer	0,25
MyTaq Red DNA-Polymerase	0,25

**Tabelle 2.4.3 PCR Programm**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1 Initialisierung	95°C	3 min	
2 Denaturierung	95°C	40 s	30 Zyklen
3 Primerhybridisierung	55-65°C	40 s	
4 Elongation	72°C	45 s	
5 finale Elongation	72°C	2 min	
6 kurzzeitige Lagerung	10°C	bis zu 1 h	

#### **2.4.4.3 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, bei der cDNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden und mit bekannten Größen verglichen werden. Die Trennung erfolgt in einem Agarosegel durch ein elektrisches Feld. Die cDNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden durch das Gel abhängig von ihrer Größe unterschiedlich stark aufgehalten. Im Ergebnis wandern kurze Fragmente weiter als längere Fragmente. Mit der Gelelektrophorese kann überprüft werden, ob während der PCR das erwartete cDNA Produkt amplifiziert wurde.

Dazu wurde ein Gel aus 4 g Agarose und 200 ml TRIS-Acetat-EDTA-Puffer angesetzt. Nach Aufkochen der Agarosemischung in der Mikrowelle wurden 4 µl eines interkalierenden DNA-Farbstoffs (Midori Green) hinzugegeben. Mit einem Kamm wurden Taschen für die PCR-Produkte erzeugt. In diese wurden 10 µl des PCR-Produkts pipettiert. In eine Tasche in der Mitte des Gels wurden 5 µl eines Markers gegeben, der cDNA-Fragmente mit bekannten Längen (100 bp, 250 bp, 500 bp, 1000 bp, 2000 bp) enthält.

Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer (Sub-Cell GT Cell, BioRad, Hercules, USA) mit einer Spannung von 160 V für 45 min durchgeführt. Zur Spannungsversorgung diente pegPower 300 (peqLab, Erlangen, Deutschland). Die DNA-Banden im Gel wurden auf einem Ultraviolett-Licht-Transilluminator (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) sichtbar gemacht und fotografiert.

#### **2.4.4.4 Gradienten PCR**

Zur Etablierung der optimalen Annealing-Temperatur für das jeweilige Primerpaar wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dies ist eine Variante der PCR, bei der der Thermocycler an jeder Position eine andere Annealing-Temperatur anwendet. Als Temperaturbereich werden etwa 10°C unterhalb des Schmelzpunktes der Primer gewählt, da die optimale Annealing-Temperatur in diesem Bereich erwartet wird. In einer anschließenden Gelelektrophorese können die unter verschiedenen Annealing-Temperaturen entstandenen DNA-Banden verglichen und die optimale Temperatur bestimmt werden.

#### **2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR**

---

##### **2.4.5.1 Prinzip**

Nachteil der herkömmlichen Kontroll-PCR ist, dass nur eine qualitative Endpunktanalyse durch eine Gelelektrophorese möglich ist. Eine quantitative Auswertung, im Sinne eines Vergleichs von Expressionsstärken, ist nicht bzw. nur bedingt möglich.

Bei der quantitativen Echtzeit PCR (engl. quantitative realtime PCR, qRT-PCR) wird der interkalierende fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green® genutzt. DNA-interkalierende Farbstoffe lagern sich in doppelsträngige DNA ein und werden dadurch aktiviert. Nach jeder Elongation eines Zyklus wird die Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzeinheiten (eng. relative fluorescence units, RFU) gemessen und in Abhängigkeit der Zyklusanzahl dargestellt. Der Zyklus, bei dem die sigmoidale Kurve einen festgelegten Schwellenwert übersteigt, wird als

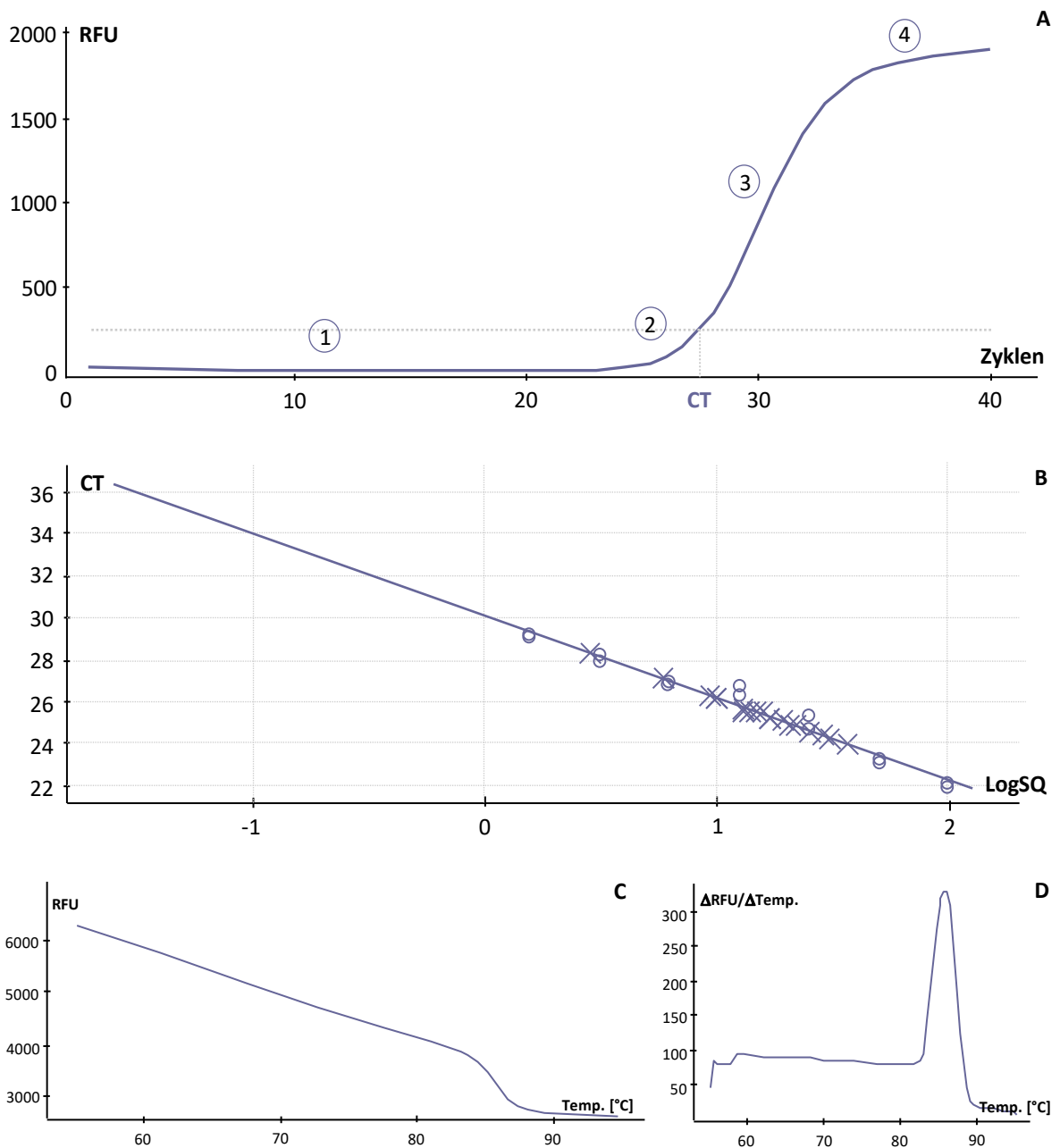
Schwellenwertzyklus (engl. für threshold cycle, CT-Wert) bezeichnet und ist ein theoretischer Wert. Der CT-Wert wird so gewählt, dass sich das Signal klar über den Hintergrund abhebt, sich aber noch im exponentiell verlaufenden Bereich der Kurve befindet.

Die qRT-PCR lässt sich anhand der sigmoidalen Kurve in vier Phasen einteilen (siehe Abbildung 2.4.2-A). In der ersten Phase hebt sich das Fluoreszenzsignal nicht vom Hintergrund ab. Das System ist nicht sensitiv genug, um die cDNA-Amplifikation in den ersten Zyklen festzustellen. Während der exponentiellen Phase bewirkt die theoretische Verdopplung der cDNA-Menge einen exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Während der linearen Phase werden Reaktionskomponenten weniger, und die Effizienz der Reaktion fällt. Das Signal wächst nicht mehr exponentiell. In der Plateauphase findet keine weitere Amplifikation statt, da die Reaktionskomponenten verbraucht sind. Das Signal wächst nicht weiter.

Zur quantitativen Auswertung wurde zunächst die relative Menge der eingesetzten cDNA durch Abgleich mit einer internen Standardreihe bestimmt. Dann wurden die cDNA-Mengen zueinander ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression der untersuchten Gene zu bestimmen (siehe Kapitel 2.4.5.2).

Die Qualität des amplifizierten Produktes wurde im Anschluss an die qRT-PCR durch eine Schmelzkurvenanalyse geprüft. Dafür wurde die Temperatur alle 30 Sekunden von 55°C bis auf 95°C in 0,5°C-Schritten erhöht, um den Schmelzpunkt des PCR-Produkts zu ermitteln. Nach jedem Temperaturschritt wird die Fluoreszenzstärke gemessen. Im Bereich der Schmelztemperatur des cDNA-Produkts kommt es zu einem starken Abfall des Fluoreszenzsignals, da die Doppelhelix denaturiert (Abbildung 2.4.2-C). Die erste Ableitung dieser Schmelzkurve stellt diesen Abfall des Fluoreszenzsignals als deutliche Spitze dar (Abbildung 2.4.2-D). Ist mehr als ein Maximum in der Ableitung der Schmelzkurve zu erkennen, können Nebenprodukte entstanden sein. Proben mit einem Nebenprodukt wurden aus der Quantifizierung ausgeschlossen. Für eine vollständige qualitative Kontrolle erfolgt zusätzlich eine Gelelektrophorese. Dadurch wird das PCR-Produkt in Bezug auf seine Schmelztemperatur und seine Länge untersucht.





**Abbildung 2.4.2 Übersicht zur Auswertung der qRT-PCR**

(A) Darstellung der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) in Abhängigkeit von der Zyklanzahl, Abschnitt 1 – Grundlinienphase, Abschnitt 2 – exponentielle Phase, Abschnitt 3 – lineare Phase, Abschnitt 4 – Plateauphase; (B) Darstellung des Schwellenwertzyklus (CT-Wert) in Abhängigkeit vom Logarithmus der eingesetzten cDNA (Starting Quantity, SQ), Kreise verdeutlichen die Werte der Standardreihe, durch die die Regressionsgerade gelegt wurde, repräsentativ sind CT-Werte von Proben dargestellt (Kreuze); (C) Schmelzkurve, dargestellt durch RFU in Abhängigkeit von der Temperatur, ein erkennbares Abfallen des Fluoreszenzsignals ist bei ca. 85°C zu sehen; (D) Schmelzspitze, Darstellung des Betrags der ersten Ableitung der Schmelzkurve.

#### **2.4.5.2 Quantifizierung der Genexpression**

Die relative Menge der eingesetzten cDNA wurde über eine interne Standardreihe aus sieben 1:1 Verdünnungsstufen ermittelt. Die relativen Mengen der internen Standardreihe sind demnach definiert als 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 % und 1,56 %. Der 100 %-Ansatz besteht zu gleichen Anteilen aus allen Proben.

Zwischen dem Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge und dem CT-Wert besteht ein linearer, umgekehrt proportionaler Zusammenhang [174]. Dieser kann in einer Eichgerade dargestellt werden. Dazu wird eine Regressionsgerade aus den Werten der Standardreihe errechnet. Über diese Regressions- beziehungsweise Eichgerade kann für unbekannte Proben der Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge (engl. Starting Quantity, SQ) errechnet werden (Abbildung 2.4.2-B).

Zur Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse wurden die relativen DNA-Mengen ins Verhältnis gesetzt. Dazu wurden die über die Eichgerade errechneten SQ-Werte normiert, indem der SQ-Wert des untersuchten Gens mit dem SQ-Wert der internen Kontrolle ins Verhältnis gesetzt wurde. Als interne Kontrolle diente *Hprt*. Dieser gemittelte normierte Wert der Versuchsgruppe wurde mit dem entsprechenden Wert der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis beschreibt die Expression des Versuchsgens der Versuchsgruppe im Verhältnis zur Expression in der Kontrollgruppe.

Die gesamte Rechnung ist in folgender Formel zusammengefasst.

$$\frac{(SQ(\text{Versuchsgen})/SQ(\text{Hprt}))_{\text{Versuchsgruppe}}}{(SQ(\text{Versuchsgen})/SQ(\text{Hprt}))_{\text{Kontrollgruppe}}} = n$$

Eine Expressionsinduktion des Versuchsgens entspricht  $n > 1$ , eine Expressionsreduktion  $n < 1$ .

#### **2.4.5.3 Durchführung**

Zur Vorbereitung der internen Standardreihe wurde aus allen Proben das gleiche Volumen entnommen und gemischt. Aus diesem internen Standard wurde dann eine siebenfache 1:1 Verdünnungsreihe erstellt. Das verbleibende Probenvolumen wurde 1:10 verdünnt und so in der qRT-PCR eingesetzt.

Ein Mastermix wurde wie in Tabelle 2.4.4 beschrieben angesetzt. Jeweils 8 µl Mastermix und 2 µl Probe (in 1:10 Verdünnung) wurden in den vorgesehenen Positionen einer 96-Well-

Mikrotiterplatte gemischt. Die Position der Proben wurde protokolliert und die PCR-Mikrotiterplatte kurz zentrifugiert. Zur Mittelung von Pipettier-Ungenauigkeiten wurden die Proben und die Verdünnungsstufen der Standardreihe in Dubletten gemessen. Negativ- und Positivkontrollen von der reversen Transkriptase und für die qRT-PCR wurden in jeder qRT-PCR mitgeführt. Die Messung erfolgte im CFX Connect Thermozykler (BioRad, Hercules, USA) mit der CFX Maestro Software. Das Programm der qRT-PCR ist in Tabelle 2.4.5 zusammengefasst. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2.4.6 zusammengefasst.

**Tabelle 2.4.4 Mastermixzusammensetzung qRT-PCR**

Reagenz	Volumen/ 1 Probe [ $\mu$ l]
SensiMix	5
Forward primer (10 $\mu$ M)	0,5
Reverse primer (10 $\mu$ M)	0,5
UP-H <sub>2</sub> O	2

**Tabelle 2.4.5 Programm der qRT-PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95°C	10 min	Initialisierung
2	95°C	15 s	40 Zyklen
3	60-66°C	30 s	
4	72°C	30 s	
5	95°C	1 min	Schmelzpunktanalyse
6	55 + 0,5°C	30 s	
7	95°C	1 min	

**Tabelle 2.4.6 Verwendete Primer**

	5'-3'	Annealing Temp.	Produktlänge
<i>Hprt_forward</i>	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	62°C	142 bp
<i>Hprt_reverse</i>	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG		
<i>Cxcl10_forward</i>	CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC	66°C	157 bp
<i>Cxcl10_reverse</i>	GGCTCGCAGGGATGATTTC		
<i>Ccl2_forward</i>	TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA	65°C	120 bp
<i>Ccl2_reverse</i>	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT		
<i>Il6_forward</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	66°C	76 bp
<i>Il6_reverse</i>	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC		
<i>Il1beta_forward</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	60°C	89 bp
<i>Il1beta_reverse</i>	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT		

## 2.5 Statistische Auswertungen

Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 8.0.2, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Alle Datensätze wurden initial unter Verwendung des Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung geprüft. Die angewendeten statistischen Tests sind jeweils in der Abbildungsunterschrift angegeben. Es wurden keine Ausreißer aus den Analysen ausgeschlossen. Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als Sterne gekennzeichnet (\* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Meningeale Migrationsroute

---

Die erste übergeordnete Arbeitshypothese lautet: " Periphere Immunzellen migrieren über das Endothel leptomeningealer Gefäße in den Subarachnoidalraum und migrieren dann entlang des perivaskulären Raumes penetrierender Gefäße, um auf Höhe bestehender inflammatorischer Läsionen in das Parenchym überzutreten.". Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurden T-Zellen im PVS von quer und längs angeschnittenen Gefäßen im Kortex und die Genexpression verschiedener migrationsfördernder Gene in den Meningen untersucht.

#### 3.1.1 T-Zellen im perivaskulären Raum

---

Wenn die Arbeitshypothese zutrifft, müssen CD3<sup>+</sup> Zellen im PVS zu finden sein. Der PVS wird von der vaskulären und von der astrozytären Basallamina begrenzt. Diese Basallaminae können, aufgrund ihres hohen Anteils an Laminin, durch eine Anti-Laminin Markierung dargestellt werden.

Die Hirnschnitte der Mäuse aus dem kombinierten Cup/EAE-Mausmodell wiesen eine starke perivaskuläre Infiltration durch periphere Immunzellen auf. Es wurde eine Anti-CD3/Anti-Laminin Immunfluoreszenzdoppelmarkierung an Cup/EAE-Hirnschnitten durchgeführt. In der Anti-Laminin-Markierung, welche die Basallaminae entlang aller angeschnittenen Gefäße darstellt, wiesen die Tiere einige Gefäße mit zwei getrennten Basallaminae und einem dazwischenliegenden Raum, dem PVS, auf. Die CD3-Markierung ergab ein membranöses Färbemuster der T-Zellen (Abbildung 3.1.1-A). Die manuelle Zählung wurde wie in Kapitel 2.3.2 durchgeführt und ergab, dass 92 % aller PVS CD3<sup>+</sup> Zellen enthielten ( $92 \pm 7,3$  %) (Abbildung 3.1.1-B).

#### 3.1.2 T-Zellen entlang des perivaskulären Raums penetrierender Gefäße

---

Wenn die oben genannte Arbeitshypothese zutrifft, müssen CD3<sup>+</sup> Zellen im PVS auf der gesamten Länge eines von den Meningen ausgehenden penetrierenden Gefäßes zu finden sein. Die Hypothese besagt, dass die Immunzellen auf Höhe der Läsion aus dem Gefäß austreten. Die Läsionen mit der stärksten Inflammation in den Cup/EAE-Gehirnen sind im *Corpus callosum* lokalisiert. Daher sollten extravasale CD3<sup>+</sup> Zellen überwiegend in den tieferen

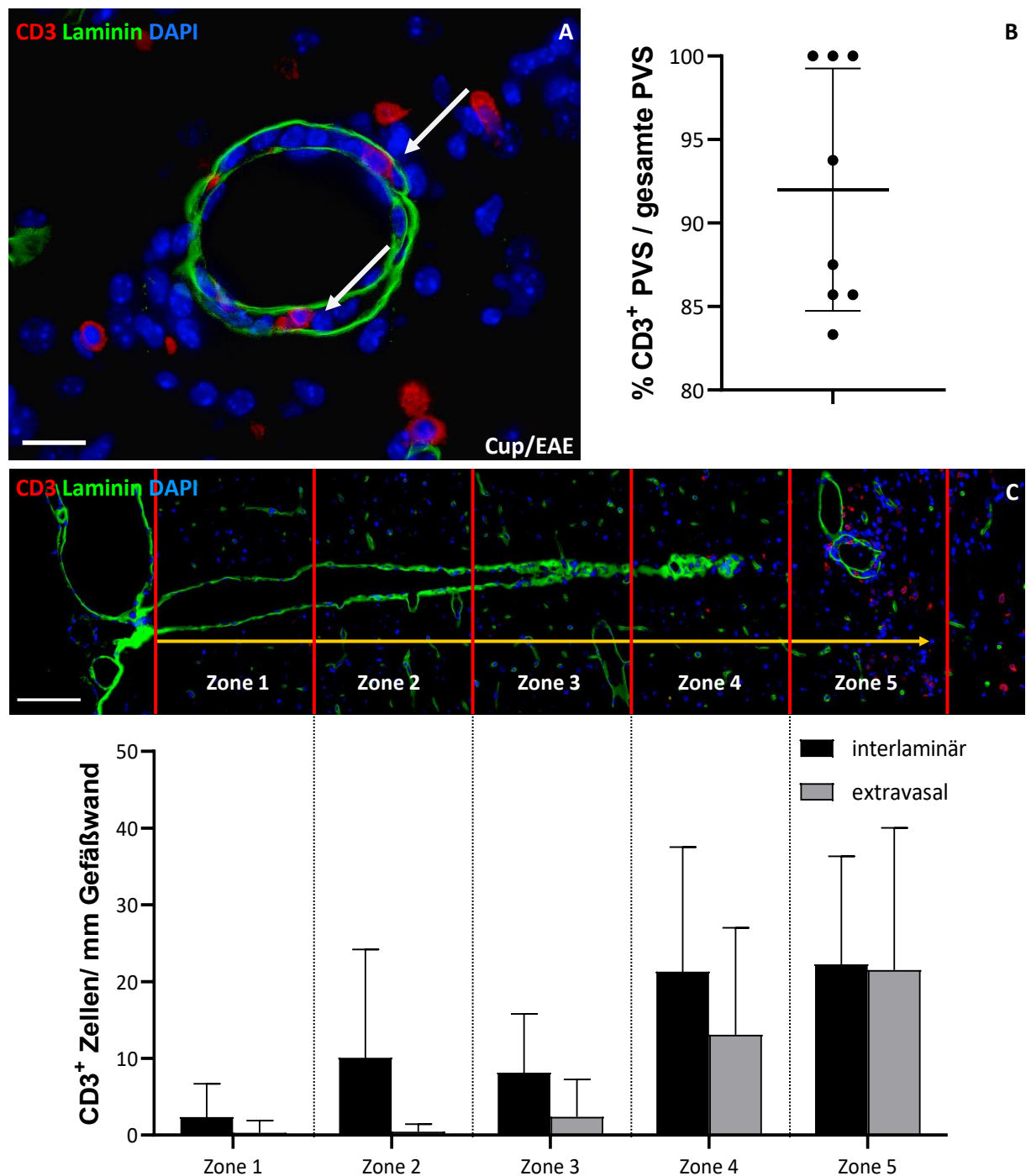
Kortex-Schichten zu finden sein. Die Gesamtanzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen müsste, entsprechend der Arbeitshypothese, von der Hirnoberfläche bis in die tieferen Schichten des Kortex zunehmen.

Anhand von HE-Übersichtsfärbungen wurden gezielt Cup/EAE-Gehirnschnitte mit längs angeschnittenen penetrierenden Gefäßen ausgewählt. Es wurde eine Anti-CD3/Anti-Laminin Immunfluoreszenzdoppelmarkierung durchgeführt. Insgesamt wurden 37 Gefäße von 5 unterschiedlichen Tieren untersucht. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben.

Die Immunfluoreszenzdoppelmarkierung zeigte das bereits beschriebene Färbemuster von Laminin und CD3 (Abbildung 3.1.1). Die Auftrennung der Basallaminae bestand entlang der gesamten Länge des angeschnittenen Gefäßes. Die Werte der mittleren Zelldichten der CD3<sup>+</sup> Zellen in Bezug zur Länge der angeschnittenen Gefäßwand sind in Tabelle 3.1.1 zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.1-C dargestellt. In allen fünf Zonen sind CD3<sup>+</sup> Zellen zwischen den zwei Basallaminae im PVS zu finden. Die Anzahl der interlaminären Zellen steigt, mit zunehmender Entfernung von den Meningen, an und erreicht in Zone 5 einen Maximalwert. CD3<sup>+</sup> Zellen, die extravasal liegen, sind erst ab Zone 3 zu finden. Die Anzahl der extravasalen CD3<sup>+</sup> Zellen steigt von Zone 3 zu Zone 5 und ist in Zone 5 maximal.

**Tabelle 3.1.1 Zelldichten bezogen auf die Länge der angeschnittenen Gefäßwand**

	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	Zone 5
interlaminär	2,4 ±	10,1 ±	8,1 ±	21,3 ±	22,2 ±
	4,3/mm	14,1/mm	7,6/mm	16,2/mm	14,1/mm
extravasal	0,3 ±	0,4 ±	2,4 ±	13,1 ±	21,5 ±
	1,6/mm	0,9/mm	4,8/mm	13,9/mm	18,5/mm



**Abbildung 3.1.1 T-Zellen im PVS quer und längs angeschnittener Gefäße**

(A) Repräsentatives Gefäß eines Cup/EAE Tieres im Querschnitt, Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit Anti-CD3 (rot) und Anti-Laminin (grün), nukleär markiert mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blau), die weißen Pfeile deuten auf CD3<sup>+</sup> Zellen im perivaskulären Raum (engl. perivascular space, PVS); (B) in acht Cup/EAE Tieren wurden die PVS gezählt, die CD3<sup>+</sup> Zellen enthielten; (C) Repräsentatives penetrierendes Gefäß eines Cup/EAE Tieres im Längsschnitt, Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit Anti-CD3 (rot) und Anti-Laminin (grün), nukleär markiert mit DAPI (blau), Veranschaulichung der Zoneneinteilung durch rote Linien, darunter: Ergebnis der Auszählung der CD3<sup>+</sup> Zellen in den Zonen, insgesamt wurden 37 Gefäße von fünf Cup/EAE Tieren ausgewertet. Maßstab: (A) 20 μm, (C) 100 μm.

### 3.1.3 Genexpressionsuntersuchung der Meningen

---

Zur Migration der Immunzellen entlang eines Gefäßes innerhalb des PVS, müssen die Immunzellen zunächst über das mit Tight Junctions abgedichtete Endothel aus dem Gefäßlumen migrieren. Dieser Prozess wird durch proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie CXCL10, CCL2, IL6 und IL1-beta unterstützt. Der Hypothese nach findet dieser Übertritt aus dem Gefäß in den PVS auf Höhe der Meningen statt. Daher wären, entsprechend der Arbeitshypothese, eine erhöhte Expression von oben genannten Zytokinen und Chemokinen zu erwarten. Die Aufbereitung und Gewinnung der Meningen erfolgte wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Aus den Meningen wurde die RNA isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Anschließend wurden qRT-PCRs durchgeführt (Kapitel 2.4), um die RNA-Expression von *Il6*, *Il1beta*, *Ccl2* und *Cxcl10* zu ermitteln. Untersucht wurden die Meningen von EAE-Tieren, Cup/EAE-Tieren und von Tieren nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation (5WCup).

Alle Proben zeigten eine sigmoidale Fluoreszenzintensitätszunahme des SYBR-Green® in der qRT-PCR. In der Schmelzpunktanalyse wiesen alle Proben eine eindeutige Schmelzspitze (siehe Kapitel 2.4.5) auf. Die anschließende Gelelektrophorese zeigte eindeutige Banden wie in Abbildung 3.1.2 dargestellt. Die Auswertung der CT-Werte erfolgte wie in Kapitel 2.4.5.2 beschrieben. Alle Daten sind in Prozent der Kontrollgruppe angegeben und in Tabelle 3.1.2 zusammengefasst, sowie die Ergebnisse in Abbildung 3.1.2 graphisch dargestellt. Es wurde wie in Kapitel 2.5 beschrieben, auf Signifikanzen zwischen Versuchsgruppe und Kontrolle geprüft.

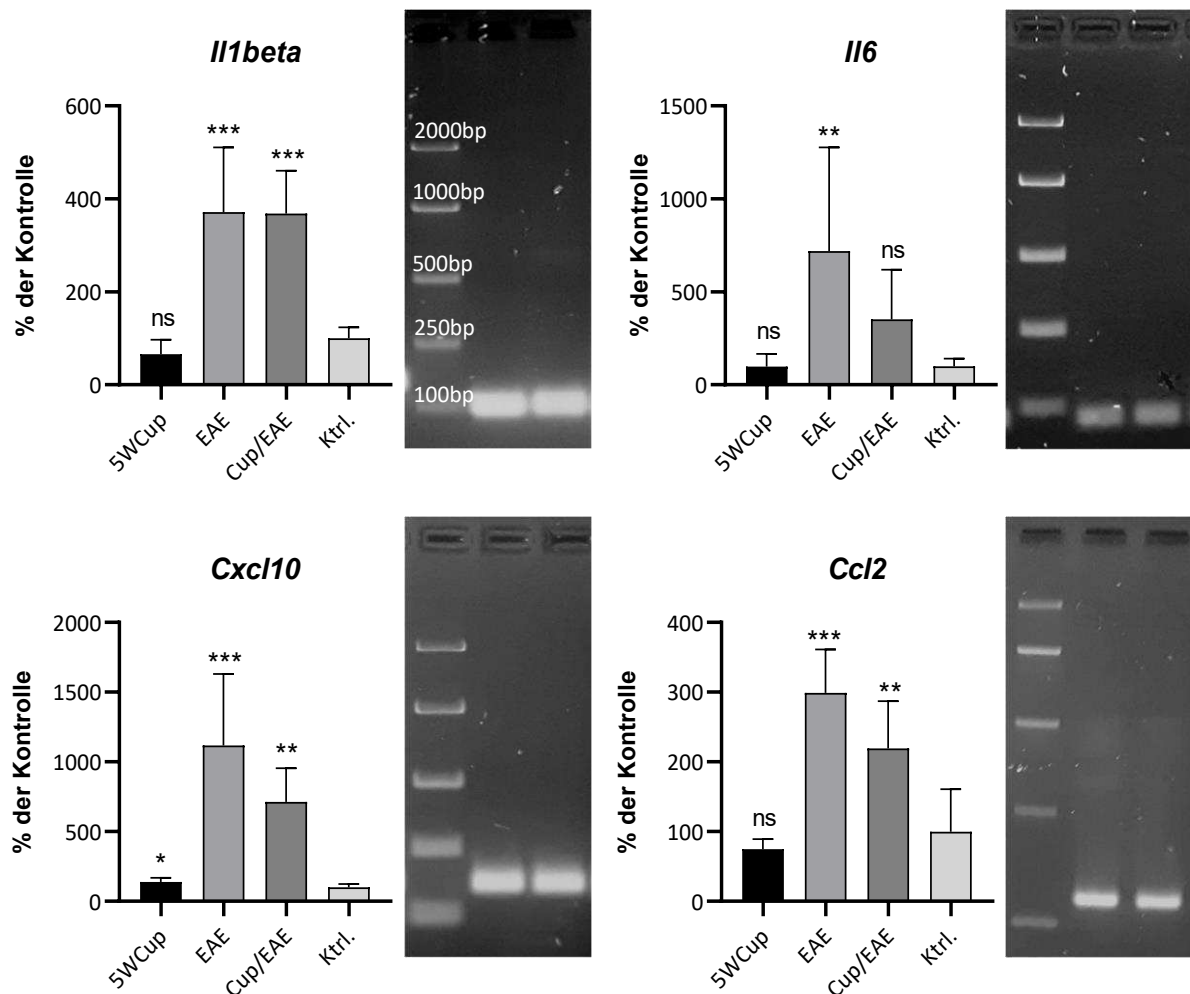
Für *Il1beta* ergab sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe in der EAE- und in der Cup/EAE-Gruppe. Die Expression von *Il1beta* war in beiden Gruppen etwa um das drei- bis vierfache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Zwischen der Kontrollgruppe und der 5WCup-Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied. Für *Il6* ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der EAE-Gruppe und der Kontrollgruppe. Die *Il6*-Expression war in der EAE-Gruppe im Mittel siebenfach im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der 5WCup-Gruppe, sowie zwischen der Kontrollgruppe und der Cup/EAE-Gruppe. Trotzdem war die IL-6-Expression in der Cup/EAE-Gruppe etwa dreifach im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Für *Cxcl10* ergab sich ein signifikanter Unterschied aller Experimentgruppen zur



Kontrollgruppe. Die Expression von *Cxcl10* war in der EAE-Gruppe etwa zehnfach und in der Cup/EAE-Gruppe etwa siebenfach im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Für *Ccl2* ergab sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe in der EAE- und in der Cup/EAE-Gruppe. Die *Ccl2*-Expression war in der Cup/EAE- und in der EAE-Gruppe etwa zwei- bis dreifach gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Zwischen der Kontrollgruppe und der 5WCup-Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied.

**Tabelle 3.1.2 Ergebnisse der qRT-PCR Untersuchung der Meningen verschiedener Versuchsgruppen**

	5WCup	EAE	Cup/EAE
<i>Il1beta</i>	65,9 ± 31,3 %	371,6 ± 138,9 %	368,4 ± 92,0 %
<i>Il6</i>	97,3 ± 68,2 %	719,2 ± 557,4 %	351,8 ± 266,6 %
<i>Cxcl10</i>	137,8 ± 30,8 %	1116,6 ± 512,9 %	712,4 ± 243,1 %
<i>Ccl2</i>	74,8 ± 14,5 %	298,9 ± 62,2 %	219,3 ± 67,73 %



### Abbildung 3.1.2 Ergebnisse der qRT-PCR Untersuchung auf Zytokine in den Meningen

Graphische Darstellung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Cuprizone-Modell (5WCup), EAE-Modell und Cup/EAE-Modell in Prozent der Kontrolle; rechts neben jedem Graph ein representatives Bild der zugehörigen Gelelektrophorese; statistische Signifikanz der Unterschiede zur Kontrollgruppe wurden mit dem Dunn's-Test für Interleukin-6 (*Il6*) und dem Dunnett's-Test für Interleukin-1beta (*Il1beta*),  $\alpha$ -Chemokinligand 2 (*Ccl2*) und  $\beta$ -Chemokinligand 10 (*Cxcl10*) ermittelt, auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft.

## 3.2 Choroidale Migrationsroute

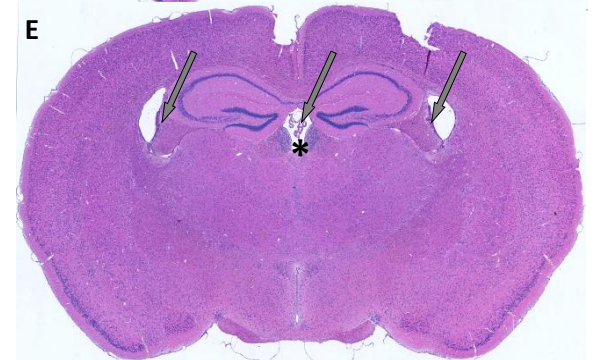
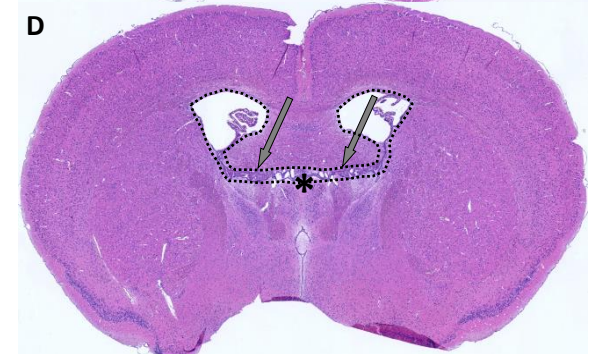
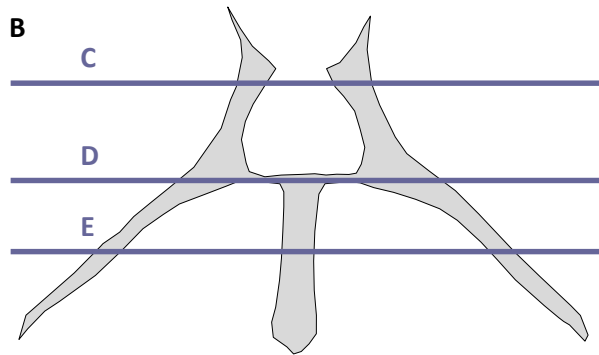
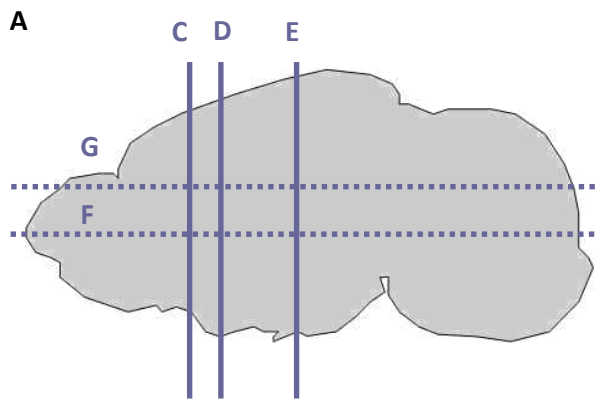
Die zweite übergeordnete Arbeitshypothese lautet „Periphere Immunzellen migrieren über das gefensterte Endothel choroidaler Gefäße und innerhalb des Stromas des *Plexus choroideus* über dessen Anheftungsstelle in das ZNS Parenchym.“. Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurde zunächst die Morphologie des *Plexus choroideus* und seiner Anheftung genauer charakterisiert und anschließend anliegende Grenzstrukturen, bestehend aus Gliazellen, densitometrisch untersucht.

### **3.2.1 Morphologie des murinen Plexus choroideus**

Der *Plexus choroideus* bietet durch das gefensterte Endothel seiner Gefäße eine mögliche Eintrittspforte für Immunzellen in das ZNS. Gemäß der formulierten Hypothese migrieren die Immunzellen innerhalb des Stromas des *Plexus choroideus* über dessen Anheftungsstelle in das Parenchym des ZNS. Die anatomische Struktur der Anheftung des *Plexus choroideus* und dort vorliegende Grenzstrukturen sind jedoch bisher nicht detailliert beschrieben. Auf Basis der Arbeitshypothese sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die Morphologie des murinen *Plexus choroideus* untersucht werden. Besonders relevant sind die Lage der Anheftungsstellen des *Plexus choroideus* und die Verbindungen der einzelnen Teile des *Plexus choroideus* in den Ventrikeln untereinander.

Zur morphologischen Untersuchung des *Plexus choroideus* wurden Serienschnitte gesunder adulter C57BL/6J-Mäuse in koronarer Schnittebene, zwischen Bregma 0,14 mm und Bregma -1,34 mm, und in horizontaler Schnittebene angefertigt. Zur Übersicht wurde an jedem zehnten Schnitt eine HE-Färbung durchgeführt.

Das Ventrikelsystem der Maus besteht, wie das des Menschen, aus zwei Seitenventrikeln, dem dritten und dem vierten Ventrikel. Die Seitenventrikel sind über das *Foramen interventrikulare* mit dem dritten Ventrikel verbunden (Abbildung 3.2.1-B, D, F). Durch eine Anti-Vimentin Immunmarkierung konnte das durchgehende Ependym innerhalb des *Foramen interventrikulare* dargestellt werden (Abbildung 3.2.2-C). Auf der Höhe des *Foramen interventrikulare* stellt sich zusätzlich der erste Abschnitt des Subfornikalorgans (SFO) am Dach des dritten Ventrikels dar (Abbildung 3.2.2-C). Das SFO ist durch die enthaltenen Tanyzyten, eine spezialisierte Form von Ependymzellen, ebenfalls in der Anti-Vimentin Immunmarkierung markiert (Abbildung 3.2.2-C). Der dritte Ventrikel verläuft länglich nach dorso-okzipital. Nach dorsal grenzt er an den Subarachnoidalraum, welcher sich von dorso-okzipital nach ventral unter den Kortex zieht. Der Subarachnoidalraum zieht sich bis zum SFO, sodass dieses nach dorsal-okzipital an den Subarachnoidalraum grenzt.



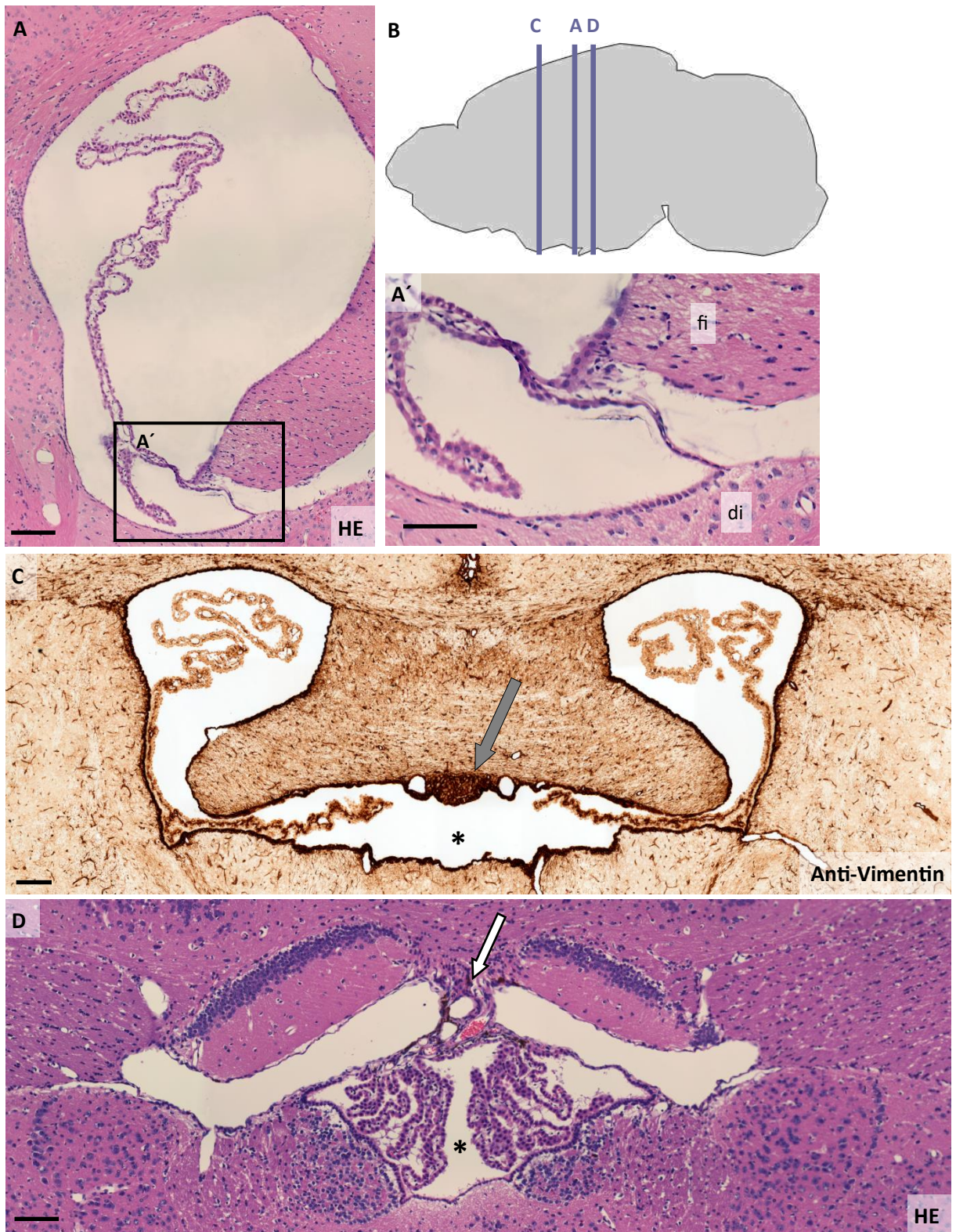
**Abbildung 3.2.1 Übersicht über das murine Ventrikelsystem**

(A) Übersicht über die verwendeten Schnittebenen; (C-E) koronare Schnittebene; (F-G) horizontale Schnittebene; (B) Projektion des Seitenventrikels und des dritten Ventrikels in eine Ebene mit Kennzeichnung der Schnittebenen C-E; (C) erster Anschnitt des *Plexus choroideus* (Pfeil) auf Höhe der *Commissura anterior* (gekennzeichnet durch gestrichelte Umrandung) (Bregma 0,14 mm); (D) *Foramen interventrikulare* (gekennzeichnet durch gestrichelte Umrandung) mit dem hier durchlaufenden *Plexus choroideus*, Pfeile deuten auf den *Plexus choroideus* im *Foramen interventrikulare* (Bregma -0,46 mm); (E) Anschnitt des *Hippocampus*, Pfeile deuten auf *Plexus choroideus* im Seitenventrikel und drittem Ventrikel; (F) horizontale Schnittebene auf Höhe des *Foramen interventrikulare* (Pfeil), *Plexus choroideus* im Seitenventrikel sowie im dritten und vierten Ventrikel (IV); (G) horizontale Schnittebene, Anschnitt des Seitenventrikels und des dritten Ventrikels; (C-G) Hämatoxylin-Eosin Färbung. Der dritte Ventrikel ist in allen Schnitten mit einem Stern gekennzeichnet.

Der *Plexus choroideus* ist in allen vier Ventrikeln vorhanden, dabei befindet sich der vom Volumen größte Anteil im vierten Ventrikel. In dieser Arbeit wurde sich auf die Morphologie des *Plexus choroideus* in den Seitenventrikeln und im dritten Ventrikel konzentriert. Der erste Anschnitt des *Plexus choroideus* in der koronaren Schnittreihe kann bereits auf Höhe der *Commissura anterior* (Bregma 0,14 mm) im Seitenventrikel zu finden sein (Abbildung 3.2.1-C). Von dort zieht das Konvolut des *Plexus choroideus* innerhalb des Seitenventrikels nach okzipital ohne eine Anheftung aufzuweisen. Auf Höhe von Bregma -0,46 mm verläuft ein Teil des *Plexus choroideus* durch das *Foramen interventrikulare* vom Seitenventrikel in den dritten Ventrikel (Abbildung 3.2.1-D, F). Der weitere Teil verbleibt im Seitenventrikel und verläuft nach okzipital. Auf Höhe des anterioren *Hippocampus* schlägt sich an den *Fimbriae hippocampi* und am *Diencephalon* das Ependym in das Epithel des *Plexus choroideus* um (Abbildung 3.2.2-A). An dieser Stelle ist der *Plexus choroideus* im Seitenventrikel angeheftet.

Im Bereich des dritten Ventrikels hat der *Plexus choroideus* eine Anheftungsstelle am Ventrikeldach. Diese beginnt am rostralen Ende des dritten Ventrikels zunächst zweigeteilt beidseits lateral des SFO und vereinigt sich mit der Gegenseite nach okzipital medial hin zu einer Anheftungsstelle am dorso-okzipitalen Rand des SFO (Abbildung 3.2.2-D). Die Anheftungsstelle am SFO befindet sich etwa auf Höhe von Bregma -0,94 mm am Dach des dritten Ventrikels. Eine Auswahl der wichtigsten Schnittebenen ist in Abbildung 3.2.2 dargestellt. Der *Plexus choroideus* zieht bis zum okzipitalen Ende des dritten Ventrikels.





### **Abbildung 3.2.2 Morphologie des murinen Plexus choroideus**

Übersicht über die Morphologie des murinen *Plexus choroideus* in den Seitenventrikeln und im dritten Ventrikel; **(A)** Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im Seitenventrikel, Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE); **(A')** Vergrößerung von **(A)**, sichtbarer Umschlag des Ependyms in das Epithel des *Plexus choroideus* an den *Fimbria hippocampi* (fi) und *Diencephalon* (di); **(B)** Übersicht über genutzte Schnittebenen **(C)** Anti-Vimentin Immunmarkierung auf Höhe des *Foramen interventrikulare*, Markierung der Ependymzellen und Zellen mesenchymaler Herkunft, am Dach des dritten Ventrikels (Stern) ist das Subfornikalorgan zu erkennen (grauer Pfeil) **(D)** HE-Färbung der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel (Stern), links und rechts der Anheftungsstelle befindet sich Subarachnoidalraum; Maßstäbe 50 µm.

### **3.2.2 Grenzstrukturen an der lateralen Anheftungsstelle**

---

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass der *Plexus choroideus* im Seitenventrikel eine Anheftungsstelle am *Diencephalon* und den *Fimbriae hippocampi* aufweist. Zur Untersuchung der Hypothese, dass Immunzellen über die Anheftungsstelle migrieren, wurden mögliche gliale und extrazelluläre Grenzstrukturen an dieser Anheftungsstelle über Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen mit Anti-Laminin und Anti-AQP1 sowie mit Anti-GFAP und Anti-AQP1 dargestellt. AQP1 ist ein Markerprotein für das Epithel des *Plexus choroideus*. GFAP ist ein Intermediärfilament, das vor allem von Astrozyten exprimiert wird.

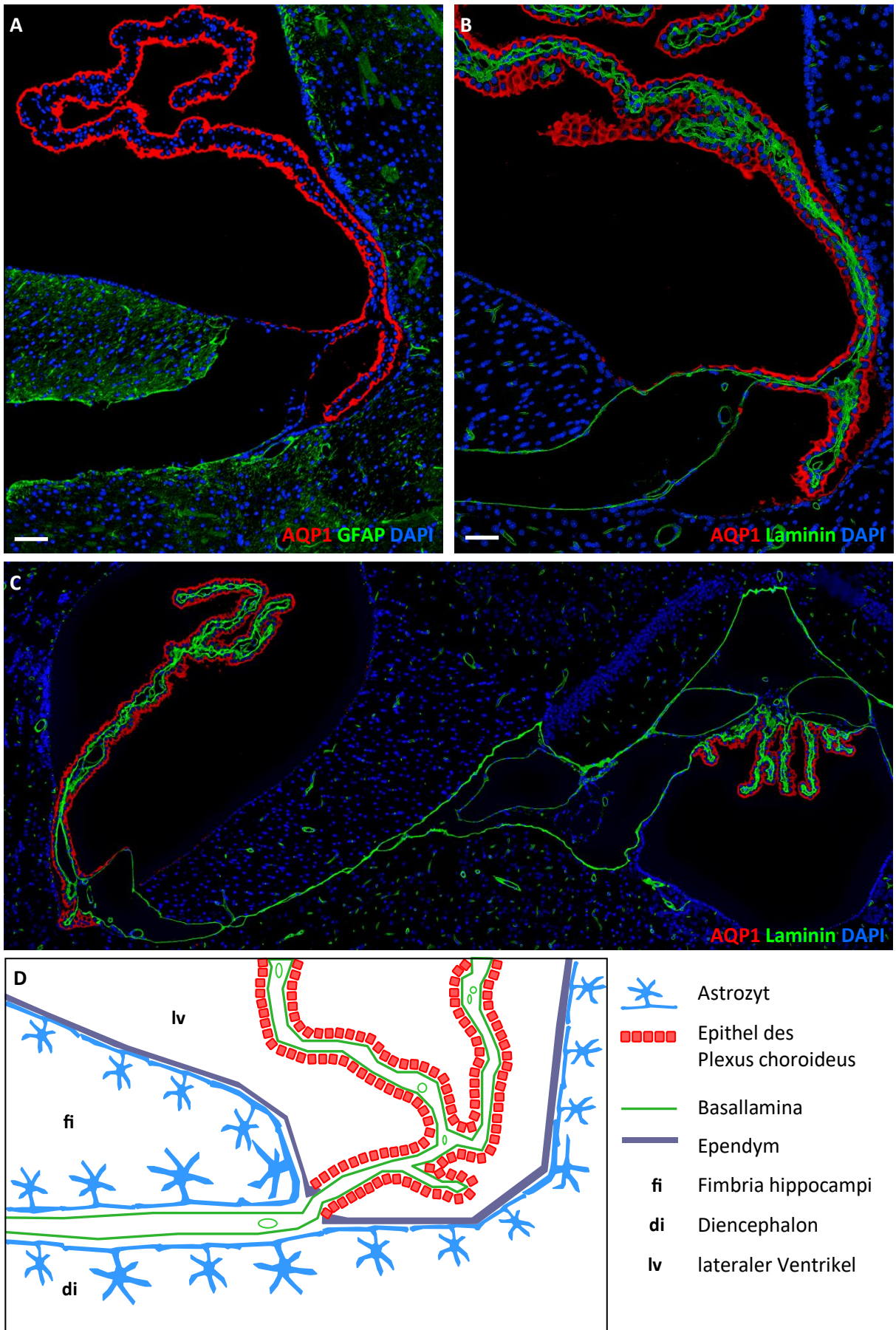
In der Anti-Laminin/Anti-AQP1 Immunfluoreszenzdoppelmarkierung zeigt sich anliegend an das Epithel des *Plexus choroideus* eine durchgehende Basallaminae. Innerhalb des Stromas des *Plexus choroideus* zeigen sich Basallaminae des Gefäßkonvolutes. Zwischen dem *Diencephalon* und den *Fimbriae hippocampi* zieht die Basallamina des Epithels des *Plexus choroideus* in zwei Schichten bis in den dritten Ventrikel. Im dritten Ventrikel setzt sich die dem *Diencephalon* anliegende Schicht als Basallamina des Epithels des *Plexus choroideus* fort. Die hippocampale Schicht der Basallamina verläuft entlang des Dachs des dritten Ventrikels und bildet dort eine Abgrenzung zum ZNS Parenchym (Abbildung 3.2.3-B, C). Der Spalt zwischen den Basallaminae des *Plexus choroideus* ist dem Subarachnoidalraum zugehörig. Das Stroma des *Plexus choroideus* steht demnach in direkter Verbindung zum Subarachnoidalraum.

In der Anti-GFAP/Anti-AQP1 Immunfluoreszenzdoppelmarkierung ist eine Zunahme des Anti-GFAP-Fluoreszenzsignals medial des Umschlags von Ependym in Epithel des *Plexus choroideus* zu erkennen. Dies betrifft den Randbereich medial der Anheftungsstelle des *Diencephalon* und der *Fimbriae hippocampi* (Abbildung 3.2.3-A). Zusammengefasst sind an der lateralen Anheftungsstelle sowohl eine Basallaminae als auch eine durch Astrozytenfortsätze

gebildete Grenzschicht vorhanden. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 3.2.3-D zu finden.

Im Bezug zur Hypothese bedeutet dies: Würden Immunzellen über das Endothel choroidaler Gefäße und innerhalb des Stromas des *Plexus choroideus* über dessen laterale Anheftungsstelle in das ZNS Parenchym migrieren, so müssten sie sowohl die Basallaminae als auch die durch Astrozytenfortsätze gebildete Grenzschicht überqueren.





**Abbildung 3.2.3 Laterale Anheftungsstelle des murinen Plexus choroideus mit vorhandenen Grenzstrukturen**

(A) Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit Anti-Aquaporin 1 (AQP1, rot) und Anti-saures Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein, GFAP, grün), Markierung des Epithels des *Plexus choroideus* mit Anti-AQP1 und Markierung der Astrozyten durch Anti-GFAP, Umschlagen des Epithels in Ependym erkennbar, sichtbar stärkeres GFAP Signal am Rand der *Fimbria hippocampi* und *Diencephalon*; (B) Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit Anti-AQP1 und Anti-Laminin (grün), Markierung der Basallamina durch Anti-Laminin, die choroidale Basallamina verläuft zwischen den *Fimbria hippocampi* und dem *Diencephalon* und ist wie in (C) sichtbar mit der Basallamina des *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel verbunden. Der Raum lateral des dritten Ventrikels, zwischen den Basallaminae, gehört zum Subarachnoidalraum. (D) schematische Darstellung der an der Anheftungsstelle beteiligten Strukturen; (A-B) Maßstäbe 50  $\mu\text{m}$ .

---

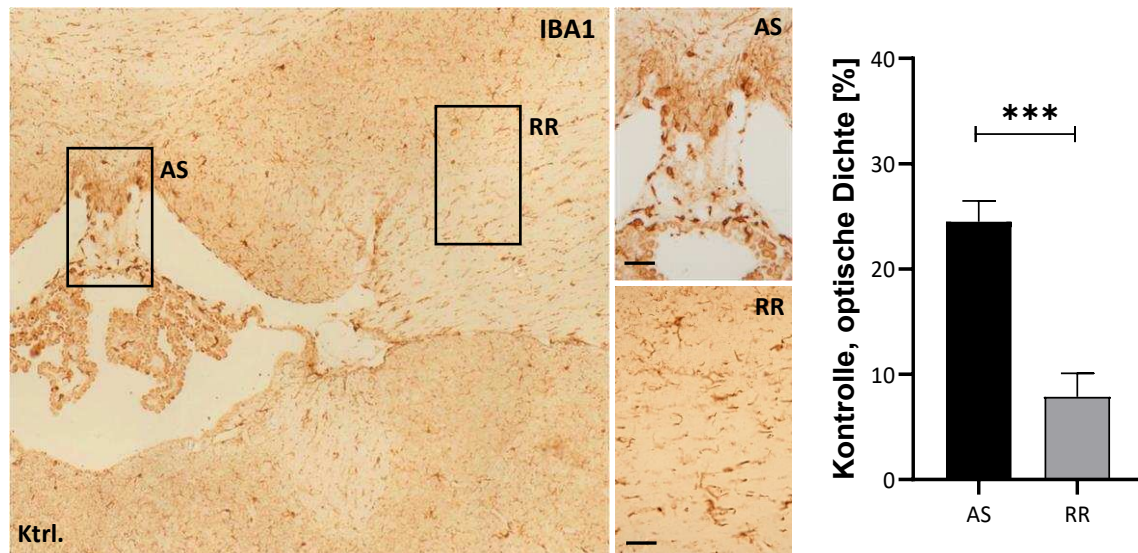
### 3.2.3 Grenzstrukturen an der medialen Anheftungsstelle

---

#### 3.2.3.1 Bestimmung glialer Grenzstrukturen durch densitometrische Untersuchungen

Der *Plexus choroideus* ist, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, unter anderem medial am Dach des dritten Ventrikels angeheftet. Zur Untersuchung der Arbeitshypothese wurde eine denkbare Barriere, durch eine Verdichtung von Mikroglia an der Anheftungsstelle zum ZNS Parenchym über eine immunhistochemische Markierung mit Anti-ionisiertes-Kalzium-bindendes Adaptermolekül 1 (engl. ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA1), dargestellt. Es erfolgte eine Auswertung der optischen Dichte wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Es wurden Gehirnschnitte von Kontrolltieren ausgewertet. Als Referenzregion wurden aufgrund der guten Reproduzierbarkeit eine mediale Region innerhalb *Fimbriae hippocampi* gewählt (Abbildung 3.2.4).

Die Anti-IBA1 immunhistochemische Markierung zeigt in den Kontrolltieren ramifizierte Mikrogliazellen. Im Mittel ergab sich eine relative optische Dichte von  $24,5 \pm 1,9 \%$  an der Anheftungsstelle und  $7,9 \pm 2,2 \%$  in der Referenzregion. Die optische Dichte an der Anheftungsstelle ist damit signifikant höher als in der Referenzregion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.4 dargestellt.



**Abbildung 3.2.4** Optische Dichte an der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel

Repräsentative Abbildung einer Anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) Immunmarkierung, Vergrößerungen der Anheftungsstelle (AS) und der definierten Referenzregion (RR), die optische Dichte der Anti-IBA1 Immunmarkierung ist an der Anheftungsstelle signifikant höher als in der Referenzregion, die Daten wurden zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft, Unterschiede zwischen den untersuchten Regionen wurden mit einem unpaaren T-Test festgestellt, Maßstab 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3.2 Bestimmung und Charakterisierung glialer Grenzstrukturen durch densitometrische Untersuchungen in Zonen

In Kapitel 3.2.3.1 konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte optische Dichte von IBA1 an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel im Vergleich zu einer Referenzregion vorliegt.

Zur weiteren Analyse dieser potentiellen glialen Grenzstruktur wurde die optische Dichte in Abhängigkeit von der Entfernung zu der Anheftungsstelle untersucht. Dazu wurde eine immunhistochemische Markierung mit Anti-IBA1 als auch mit Anti-GFAP an vier Kontrolltieren durchgeführt. Analog zu der astrozytären Komponente der Bluthirnschranke wurde, zusätzlich zur Anti-IBA1, eine Anti-GFAP Immunmarkierung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben in sechs 25  $\mu\text{m}$  breiten Zonen, nummeriert von ROI1 bis ROI6 ausgehend von der Anheftungsstelle (Abbildung 3.2.5-A). Zusätzlich zur Anheftungsstelle wurde eine Referenzregion untersucht, dazu diente erneut die Ventrikelwand im Bereich der *Fimbriae hippocampi*. Die ROI1 der Referenzregion ist direkt an den Ventrikel angrenzend.

Die Auswertung der Anti-IBA1 und Anti-GFAP immunhistochemischen Markierungen zeigte eine höhere optische Dichte von IBA1 und GFAP in der ROI1 an der Anheftungsstelle im Vergleich zur Referenzregion. Sowohl in der Anti-IBA1, als auch in der Anti-GFAP Immunmarkierung ist die größte optische Dichte am Rand des Ventrikels und in der Nähe zur Anheftungsstelle zu erkennen. Alle Werte der optischen Dichte sind in Tabelle 3.2.1 angegeben und in Abbildung 3.2.5 dargestellt.

Benachbarte ROI wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben hinsichtlich signifikanter Unterschiede überprüft. An der Anheftungsstelle sinkt die optische Dichte der Anti-IBA1 Immunmarkierung (Abbildung 3.2.5-B) von ROI1 auf ROI2 signifikant um ~20 %. Darüber hinaus sinkt die optische Dichte an der Anheftungsstelle im Verlauf von ROI1 bis ROI6. Erst in ROI4 ist die optische Dichte kleiner als die Hälfte der optischen Dichte in ROI1. An der Anheftungsstelle zeigte sich zwischen ROI1 und ROI2, sowie zwischen ROI2 und ROI3 und zwischen ROI3 und ROI4 ein signifikanter Unterschied. Erst ab ROI4 gibt es keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den ROI. Die optische Dichte der Anti-IBA1 Immunmarkierung in der Referenzregion sinkt bereits von ROI1 auf ROI2 signifikant um die Hälfte und verändert sich zwischen ROI3 und ROI6 nicht. Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den ROI3 bis ROI6. Der Bereich, in der die optische Dichte der Anti-IBA1 Immunmarkierung erhöht ist, beschränkt sich demnach in der Referenzregion auf ROI1. Im Vergleich der Anheftungsstelle mit der Referenzregion ist der Bereich der erhöhten optischen Dichte an der Anheftungsstelle breiter.

In der Anti-GFAP Immunmarkierung (Abbildung 3.2.5-C) sinkt die optische Dichte an der Anheftungsstelle zwischen ROI1 und ROI2 nicht signifikant. Die optische Dichte der Anti-GFAP Immunmarkierung in der Referenzregion sinkt dagegen von ROI1 zu ROI2 signifikant um etwa 40 %. Im Verlauf von ROI1 zu ROI3 sinkt die optische Dichte in der Referenzregion um rund 43 %, an der Anheftungsstelle jedoch nur um rund 23 %. An der Anheftungsstelle wurde zwischen ROI2 und ROI3 sowie zwischen ROI4 und ROI5 ein signifikanter Unterschied festgestellt. In der Referenzregion wurden signifikante Unterschiede zwischen den ROI von ROI1 bis ROI5 festgestellt. Die optische Dichte an der Anheftungsstelle fällt erst ab der zweiten ROI signifikant ab, während die optische Dichte in der Referenzregion direkt von ROI1 an absinkt. Im Vergleich des Verlaufs der optischen Dichte an der Anheftungsstelle und der Referenzregion wird deutlich, dass der Bereich der

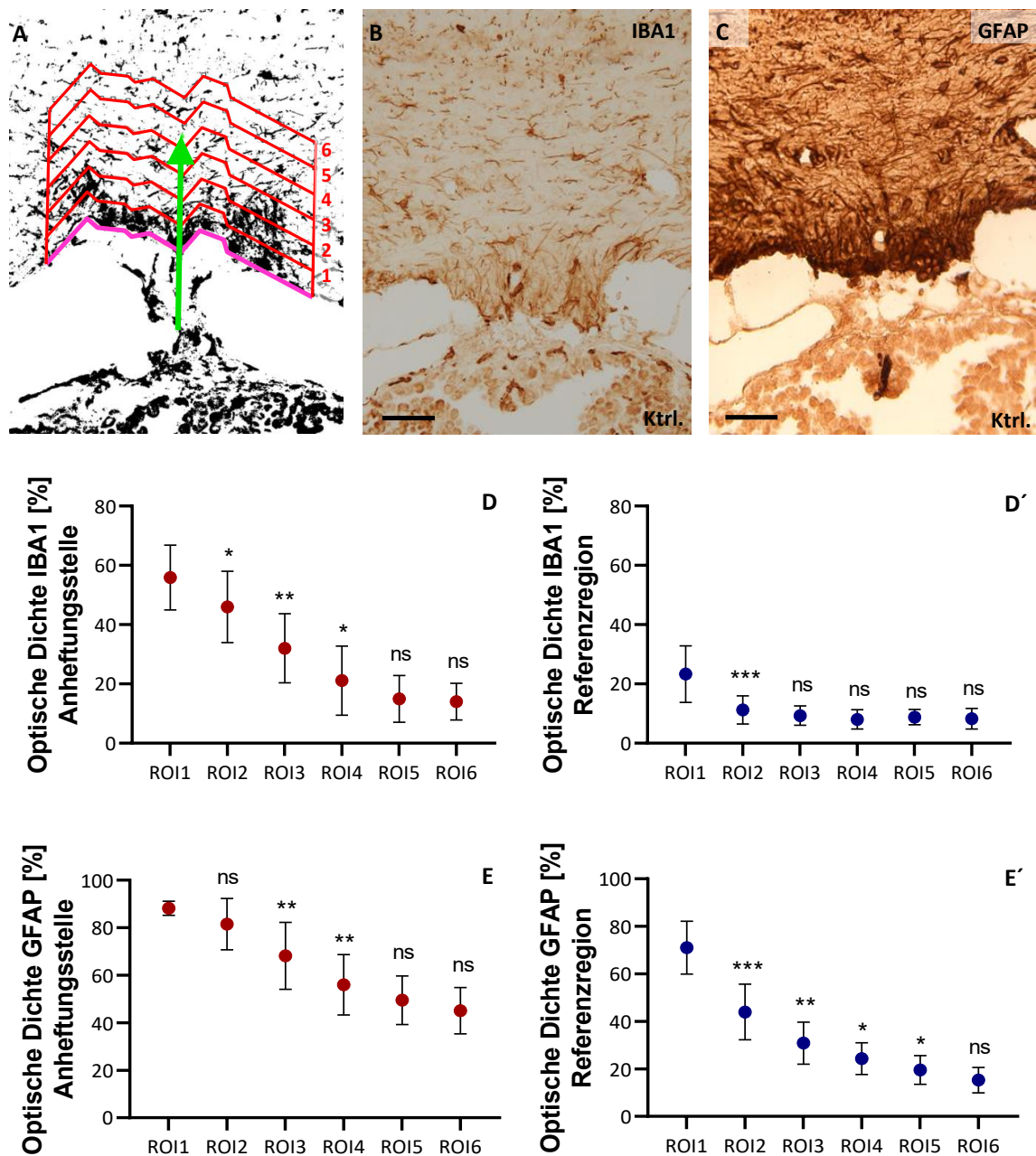
erhöhten optischen Dichte in der Anti-GFAP Immunmarkierung an der Anheftungsstelle zum einen breiter und die optische Dichte zusätzlich höher ist.

Die Ergebnisse legen eine Barriere aus Astrozyten und IBA1<sup>+</sup>-Zellen, womöglich Mikroglia, nahe. Im Bezug zur Hypothese bedeutet dies: Würden Immunzellen über das Endothel choroidaler Gefäße und innerhalb des Stromas des *Plexus choroideus*, über dessen mediale Anheftungsstelle im dritten Ventrikel in das ZNS Parenchym migrieren, so müssten sie an der Anheftungsstelle eine Zone erhöhter Dichte IBA1<sup>+</sup> Zellen als auch GFAP<sup>+</sup> Zellen überqueren.

**Tabelle 3.2.1 Ergebnisse der densitometrischen Auswertung in Zonen in Prozent**

	Anti-GFAP		Anti-IBA1	
	Anheftungsstelle	Referenzregion	Anheftungsstelle	Referenzregion
ROI1	88,2 ± 2,9 %	71,1 ± 11,1 %	55,9 ± 10,9 %	23,3 ± 9,5 %
ROI2	81,5 ± 10,8 %	43,9 ± 11,7 %	45,9 ± 12,1 %	11,2 ± 4,7 %
ROI3	68,2 ± 12,7 %	30,8 ± 8,9 %	32,0 ± 11,7 %	9,3 ± 3,3 %
ROI4	56,0 ± 12,7 %	24,3 ± 6,7 %	21,1 ± 11,6 %	8,0 ± 3,3 %
ROI5	49,48 ± 10,2 %	19,5 ± 6,0 %	14,9 ± 7,9 %	8,8 ± 2,6 %
ROI6	45,1 ± 9,8 %	15,3 ± 5,4 %	14,0 ± 6,2 %	8,3 ± 3,5 %





**Abbildung 3.2.5 Untersuchung der glialen Grenzstrukturen an der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel**

(A) Darstellung der Verschiebung der polygonalen Startlinie und Entstehung der 6 untersuchten Regionen (engl. region of interest, ROI) im binären Bildformat; (B) repräsentatives Bild einer Anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) Immunmarkierung eines Kontrolltiers (Ktrl.) an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel; (C) repräsentatives Bild einer Anti glial fibrillary acidic protein (GFAP) Immunmarkierung eines Kontrolltiers an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel; (D-D') optische Dichte der Anti-IBA1 Immunmarkierung an der Anheftungsstelle und der Referenzregion (*Fimbria hippocampi*); (E-E') optische Dichte der Anti-GFAP Immunmarkierung an der Anheftungsstelle und der Referenzregion, mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung geprüft, Unterschiede zwischen benachbarten ROI wurden durch den Mann-Whitney Test ermittelt, n=4; Maßstab (B-C) 50  $\mu$ m.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

---

Im folgenden Abschnitt sollen die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Tiermodelle hinsichtlich ihrer Vorteile und Nachteile diskutiert werden.

#### **4.1.1 Tiermodelle**

---

Die MS entsteht aus einem komplexen Zusammenspiel überwiegend unbekannter auslösender Faktoren und dem Immunsystem des menschlichen Körpers. Im Vergleich zur MS ist der auslösende Faktor im Mausmodell bekannt und wird aktiv induziert. In Tiermodellen können außerdem nur bestimmte Teilaspekte der pathologischen Veränderungen bei der MS dargestellt werden. Die Ergebnisse aus Experimenten mit Tiermodellen haben folglich eine eingeschränkte Übertragbarkeit auf den Menschen, bieten aber die Möglichkeit, Teilaspekte einer Pathologie zu erforschen.

##### **4.1.1.1 Cuprizone-Modell**

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches Mausmodell, dessen Wirkungsweise nicht abschließend geklärt ist. Die beobachtbaren Auswirkungen der Cuprizone-Intoxikation sind eine zentrale Demyelinisierung [18,175], die Apoptose reifer Oligodendrozyten [175,176], axonaler Schaden [18] und eine Mikrogliose [133,136]. Im Cuprizone-Modell lassen sich De- und Remyelinisierungsvorgänge und deren Einflüsse besonders gut untersuchen [153]. Die ausgelöste Demyelinisierung betrifft vorhersagbar bestimmte Hirnregionen [133,177] und ist bei einfacher Anwendung gut reproduzierbar [175,177]. Das Cuprizone-Modell weist zahlreiche histopathologische Ähnlichkeiten zu zerebralen Läsionen progressiver MS Patienten auf. Zu diesen Ähnlichkeiten gehören eine kortikale Demyelinisierung [178,179], axonaler Schaden [18,180], ein nur geringer Schaden der BHS [38,39,148,149] und eine nur geringe Immunzellrekrutierung [136,139,181]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten bietet sich das Cuprizone-Modell zur Erforschung der progressiven Verlaufsformen an, für die es zur Zeit nur wenige adäquate Therapieansätze gibt [13]. Die autoimmune Komponente der RRMS lässt sich durch die geringe Immunzellrekrutierung [136,139,181] im Cuprizone-Modell nicht untersuchen.

Wie bei allen anderen Tiermodellen sind Ergebnisse des Cuprizone-Modells nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Zusätzlich ist der Vergleich der Ergebnisse verschiedener

Arbeitsgruppen nur begrenzt möglich. Die Wirkung des Cuprizone ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie der Applikationsdauer, der Dosis [179], dem Alter der Tiere [177], dem Mausstamm [182] sowie dem Geschlecht und Gewicht der Tiere [179]. Die Vielzahl der Einflussfaktoren variiert von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe und dadurch auch die Cuprizone Auswirkungen und die Ergebnisse.

Die wesentlichen Unterschiede des Cuprizone-Modells zur MS sind die Ätiologie, der Auslöser und der zeitliche Ablauf der Pathologien. Während die MS sich über Jahre entwickelt, sind bei Cuprizone-behandelten Mäusen schon in den ersten Tagen pathologische Veränderungen nachweisbar [156,175]. Die langjährigen Prozesse vor Ausbruch der Erkrankung lassen sich in Tiermodellen im Allgemeinen und im Cuprizone-Modell im Speziellen demnach nicht untersuchen.

#### **4.1.1.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis**

Die EAE ist eine durch Immunisierung induzierte, inflammatorische Erkrankung des ZNS. Im ZNS der EAE-Tiere kommt es zu massiven Infiltraten vor allem in Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark. Die EAE ist das am häufigsten verwendete Tiermodell der MS und kann aufgrund der starken autoimmunen Komponente vor allem zur Untersuchung der RRMS und deren Therapieansätzen verwendet werden [157,183]. Die EAE dient außerdem der Untersuchung von Immunzellrekrutierung und deren Einflüssen, kann aber im Vergleich zum Cuprizone-Modell weniger zur Studie von Demyelinisierungsprozessen verwendet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine Demyelinisierung in den meisten EAE-Modellen nur ultrastrukturell nachweisbar ist [166]. Die EAE ist eine sehr heterogene Erkrankung und kann durch unterschiedliche Antigene, sowie durch aktive und passive Immunisierung, ausgelöst werden [184]. Der Verlauf der EAE wird durch verschiedene Einflussfaktoren bestimmt. Neben unterschiedlichen Antigenen zur Immunisierung sind der Mausstamm [157,185], das Alter [186] und das Geschlecht der Mäuse [187] zu diesen Faktoren zu zählen.

Die für diese Arbeit verwendete MOG-EAE wird durch eine Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub>-Antigenen in Mäusen vom C57BL/6 Stamm ausgelöst. Die MOG-EAE in C57BL/6 Tieren ist die meist genutzte EAE und gilt als zuverlässig und gut reproduzierbar [159]. Es kommt zu einem monophasischen chronischen Verlauf [157]. Die rekrutierten T-Zellen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung von Infiltraten in der MS. In der MOG<sub>35-55</sub>-EAE kommt es zu einer durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen dominierten Inflammation [163]. In den inflammatorischen



Infiltraten der MS-Läsionen dominieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den CD4<sup>+</sup> T-Zellen [30,32]. Durch die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub>-Antigenen kommt es zur Bildung von MOG-reaktiven T-Zellen, diese überwiegen in MS-Patienten gegenüber PLP- oder basischen Myelinprotein (engl. myelin basic protein, MBP)-reaktiven T-Zellen [188]. In anderen Mausstämmen kann durch die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub>-Antigenen ein anderer EAE-Verlauf induziert werden. So kann in PL/J-Mäusen eine chronisch-schubförmige EAE und in nicht fettleibigen Diabetes (engl. non-obese diabetic, NOD) Mäusen eine initiale akute EAE mit folgender sekundär progressiver Phase ausgelöst werden [158]. In verschiedenen Mausstämmen können durch unterschiedliche Gene verschiedene Verläufe induziert werden. Dies schränkt Vergleichbarkeit und Verständnis der Ergebnisse ein.

Die Grenzen der EAE liegen, wie in jedem anderen Tiermodell, in der Übertragbarkeit der Ergebnisse, insbesondere von Therapieoptionen, auf den Menschen. Die in der EAE zu einer verminderten EAE-Symptomatik führenden Applikation des transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta$ -2 (engl. transforming growth factor  $\beta$ -2, TGF $\beta$ -2) [189], führte in MS-Patienten zum Beispiel weder zu einer verminderten Symptomatik, noch zu einer verringerten Anzahl von Läsionen im MRT [190]. Als Positivbeispiel ist dagegen die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers gegen Alpha-4-Integrin (engl. verylate antigen 4, VLA-4) Natalizumab zu nennen. VLA-4 wird auf der Zelloberfläche aktivierter Lymphozyten und Monozyten exprimiert. Das Binden von Natalizumab verhindert die Adhäsion der aktivierten Lymphozyten an das Endothel über VCAM1 und damit die Migration in das ZNS-Parenchym [191]. Natalizumab wurde im EAE-Modell entwickelt [192] und wird zur Monotherapie der RRMS eingesetzt [193].

### **4.1.1.3 Kombiniertes Cup/EAE-Modell**

Das kombinierte Cup/EAE-Modell vereint Aspekte der EAE und des Cuprizone-Modells. In den Gehirnen der Cup/EAE-Mäuse kommt es sowohl zu einer Cuprizone-induzierten Demyelinisierung als auch zur Infiltration durch periphere Immunzellen. Im Gegensatz zur reinen EAE kommen diese Infiltrate auch vermehrt im Vorderhirn vor. Im Cup/EAE-Modell können somit Demyelinisierung, akute Infiltration durch periphere Immunzellen und deren Zusammenhang elegant untersucht werden [157]. Durch signifikant höhere Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen wie *Cxcl10*, *Ccl2* und *Ccl3* in der Cup/EAE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe [170] sowie der starken Immunzellrekrutierung eignet sich das

Cup/EAE-Modell auch zur Untersuchung der Mechanismen der Immunzellrekrutierung. Studien zur Immunzellrekrutierung am murinen Vorderhirn im Cup/EAE-Modell bieten eine vergleichsweise gute Übertragbarkeit auf die humane Situation, da Studien und Bildgebung der MS-Pathologie in Patienten auch hauptsächlich am Vorderhirn durchgeführt werden und so Vergleiche gezogen werden können [170].

Die Pathogenese der MS ist nicht geklärt. Hinsichtlich der MS-Pathogenese wurden zwei unterschiedliche Hypothesen aufgestellt [194]. Die eine Hypothese geht von einer primär inflammatorischen Störung aus, welche sekundär einen zytodegenerativen Schaden auslöst. Die zweite Hypothese geht von einem primär zytodegenerativen Schaden aus, der sekundär zu einer Immunzellrekrutierung führt [195]. Im Cup/EAE-Modell kann eine zytodegenerativ induzierte Immunzellrekrutierung untersucht werden, da gezeigt werden konnte, dass ein primär degenerativer Prozess innerhalb des ZNS zur Ausweitung der Immunzellinfiltration durch eine sekundäre MOG-Immunsierung führt [169].

#### **4.1.2 Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und histologische Färbungen**

---

Die Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und histologische Färbungen sind bewährte Möglichkeiten zur Auswertung von Gewebeschnitten. In der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz lassen sich gezielt ein oder mehrere Antigene im Gewebeschnitt darstellen. In histologischen Färbungen können bestimmte Strukturen oder Zelltypen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften sichtbar gemacht werden.

Bei der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz kann es durch verschiedene Faktoren zu unspezifischen Bindungen der Antikörper kommen. Dadurch wird das Ergebnis und die Auswertung der markierten Gewebeschnitte verfälscht. Mögliche Fehlerquellen und durchgeführte Kontrollen sind in Kapitel 2.2 beschrieben.

Die Quantifizierung der Ergebnisse sorgt für eine Objektivierbarkeit und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Die Anfertigung der Bilder erfolgte für alle Schnitte einer Markierung oder Färbung mit denselben Einstellungen am Mikroskop und am selben Tag. Dadurch wurde die Variabilität zwischen den Bildern, durch Alter der Markierung oder Färbung sowie durch Unterschiede in den Einstellungen zu Belichtung, Blende und Intensität möglichst gering gehalten. Das Verhältnis des Signals spezifisch markierter Antigene zum Hintergrundsignal ist für jede immunhistochemische Markierung unterschiedlich. Mit einem

Schwellenwert wurde festgelegt, welche Pixel von der Software als schwarz, beziehungsweise weiß, gewertet und somit dem spezifischen Signal oder dem Hintergrundsignal zugeordnet wurden. Die Wahl eines unpassenden Schwellenwertes kann die Ergebnisse verfälschen, da Pixel fälschlicherweise dem Hintergrundsignal oder dem spezifischen Signal zugeordnet werden. Alle Markierungen eines Antigens wurden daher mit demselben Schwellenwert ausgewertet, sodass der Einfluss durch den Schwellenwert gleichbleibt. Die Bestimmung der ROI und der Referenzlinie, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, erfolgte durch den Experimentator und kann durch dessen Erwartungshaltung beeinflusst sein. Es wurden stets zwei Schnitte eines Gehirns eines Tieres ausgewertet und der daraus gebildete Mittelwert als Ergebnis verwendet, um den Einfluss durch den Experimentator möglichst gering zu halten. Die Verschiebung der Referenzlinie erfolgte automatisiert durch ein selbstgeschriebenes Macro, sodass die entstandenen ROIs alle dieselbe Form und Größe hatten. Im Gewebeschnitt enthaltene Löcher oder Gefäße wurden in der ROI nicht ausgeschlossen. Da die optische Dichte als durchschnittliche Pixeldichte in der jeweiligen ROI angegeben wird, führt dies zu einer Verringerung der optischen Dichte in den ROIs. Die Wahl der Referenzregion kann das Ergebnis beeinflussen, da die unspezifischen Markierungen des Hintergrunds und Zellzahlen zwischen den unterschiedlichen Hirnarealen variieren. Als Referenzregion wurde die mediale Region der *Fimbriae hippocampi* gewählt. Die Referenzregion wurde so gewählt, dass sie gut reproduzierbar ist und die ventrikelnaher Lage diese mit der Anheftungsstelle vergleichbar macht.

Die Quantifizierung der Zellzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen im längs angeschnittenen PVS erfolgte, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, ebenfalls mit der Software ImageJ. Übersichtsbilder, die das gesamte längs geschnittene Gefäß abbilden, wurden durch Zusammenrechnen überlappender Teilbilder erstellt. Durch diese Überlappung kann ein systematischer Fehler entstanden sein. Durch das Zusammenrechnen der Überlappung können Bildanteile verloren gehen oder verdoppelt werden, dadurch könnten Zellen doppelt oder gar nicht in die Zählung mit eingegangen sein. Zur Zählung der Zellen wurden durch ein Macro Zonen erzeugt. Diese Zonen wurden in gleichmäßigen Abständen rechtwinklig zu einem Richtungspfeil durch das Macro erstellt. Dieser Richtungspfeil wurde vom Experimentator festgelegt und möglichst radial zu den Meningen gezogen. Die Festlegung des Richtungspfeiles ist demnach vom Experimentator abhängig und bereits eine geringe Änderung des Winkels hat Einfluss auf die

Bildung der Zonen. Innerhalb der gebildeten Zonen wurde die Zelldichte pro Länge der angeschnittenen Gefäßwand ausgewertet. Dazu wurden die angeschnittenen Gefäßwände durch den Experimentator ausgemessen und die Zellen innerhalb des PVS und in einem vom Experimentator festgelegten Abstand außerhalb des Gefäßes gezählt. Fehlerquellen ergaben sich hierbei durch persönliche Zählkriterien, eine mögliche Erwartungshaltung des Experimentators und Abweichungen in der Intensität der Immunmarkierung zwischen den markierten Zellen.

#### **4.1.3 Genexpressionsuntersuchungen mittels qRT-PCR**

---

Die Methode der qRT-PCR ermöglicht eine semiquantitative Aussage über die Menge der in einem Gewebe enthaltenen mRNA eines Gens im Vergleich zu einem Kontrollgen. Somit können Rückschlüsse auf die Aktivität dieses Gens gezogen werden. Die Ergebnisse der Analyse lassen eine Aussage über die RNA-Menge eines Gens in den Proben treffen. Die tatsächliche Menge des jeweiligen aktiven Proteins kann nicht beurteilt werden, da die Möglichkeit einer alternativen Proteinregulation durch Signaltransduktionen und Proteinabbau besteht.

Der zeitliche Aufwand einer qRT-PCR ist vergleichsweise gering und eine objektive Auswertung ist möglich. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten während der qRT-PCR wurde durch den Thermozykler durchgeführt und ist nicht durch den Experimentator beeinflussbar. Mögliche Pipettierfehler wurden durch die Mittelung von Doubletten minimiert. Proben mit zu großen Abweichungen der Doubletten wurden ausgeschlossen. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte standardisiert. Erwartungshaltungen des Experimentators haben daher keinen Einfluss. Das PCR-Produkt wurde durch zwei unabhängige Methoden (Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese) auf Spezifität geprüft. Positiv- und Negativkontrollen der reversen Transkription und der PCR wurden stets mitgeführt und so die Validität der qRT-PCR geprüft.

Die Grenzen dieser Methode liegen in der Aufbereitung der Proben. Die Gewebeaufbereitung und Präparation erfolgten wie in 2.4 beschrieben. Die Gewebeproben enthalten durch die Präparation Gewebeteile der *Dura mater* und der *Arachnoidea* sowie leptomeningeale Gefäße in unbekanntem relativen Anteil. Nach Aufbereitung der mRNA und Synthese der cDNA enthalten die Proben unter anderem die cDNA von Endothelzellen, Fibrozyten und in den Meningen ansässigen Immunzellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen. Die n-Zahl

verwendeter Proben pro Experimentalgruppe war durch die Anzahl der Tiere gering und wurde durch das Zusammenführen der Gewebeproben von je zwei Tieren zur Erhöhung der Ausbeute zusätzlich verringert. Im Laufe des Experiments stellte sich heraus, dass diese Erhöhung der Ausbeute nicht nötig war und Proben der einzelnen Tiere eine ausreichende mRNA-Ausbeute boten. Durch die kleine n-Zahl haben Ausreißer einen größeren Einfluss auf die Analyse. In der Analyse wurden die Experimentgruppen jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Methode ist aufgrund der großen Sensitivität und der vielen Schritte in der Gewebeaufbereitung, RNA-Isolation und cDNA-Synthese zusätzlich anfällig für Kontaminationen.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

---

Die Kenntnis und das Verständnis der Immunzellmigrationsrouten in das ZNS sind von grundlegender Bedeutung für zukünftige therapeutische Entwicklungen bei der MS. In der vorliegenden Arbeit konnte folgendes gezeigt werden:

- > Innerhalb des gesamten PVS penetrierender Gefäße sind CD3<sup>+</sup> Zellen vorhanden. In tieferen Zonen des Kortex ist die Dichte der CD3<sup>+</sup> Zellen dabei pro angeschnittene Gefäßwand deutlich höher, als in den oberflächlicheren Schichten des Kortex.
- > In den Tiermodellen der EAE und des Cup/EAE-Modells ist eine höhere Expression der Gene der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL1beta, CCL2 und CXCL10 auf Höhe der Meningen vorhanden.
- > Der *Plexus choroideus* ist sowohl im Seitenventrikel als auch im dritten Ventrikel am parenchymalen Gehirngewebe angeheftet und an der Anheftungsstelle des dritten Ventrikels liegen gliale Grenzstrukturen vor.

Diese Erkenntnisse sollen im Folgenden unter Bezug zur aktuellen Literatur diskutiert werden.

### 4.2.1 Meningeale Migrationsroute

---

#### 4.2.1.1 T-Zellen im perivaskulären Raum

Die perivaskuläre Infiltration peripherer Immunzellen ist eine der frühesten pathologischen Veränderungen in MS Läsionen [196]. Zwischen der vaskulären und der parenchymalen Basallamina, im PVS, akkumulieren Plasmazellen, Makrophagen und Lymphozyten vor ihrem Übertritt in das Parenchym [121,196]. Die anatomische Definition des PVS ist, je nach Autor, unterschiedlich [82,197]. In dieser Arbeit wurde der PVS als Raum zwischen den zwei Basallaminae eines Gefäßes definiert [77].

Der PVS, begrenzt durch die vaskuläre und parenchymale Basallamina, ist unter Kontrollbedingungen in histologischen Schnitten von murinen Gehirnen, nicht nachweisbar. In humanen Gehirnen ist der PVS unter physiologischen Bedingungen im MRT nachweisbar [198]. Durch die Infiltration peripherer Immunzellen im Cup/EAE-Modell wird der perivaskuläre Raum aufgedrängt und sichtbar. Anhand einer Immunmarkierung des Proteins Laminin lassen sich beide Basallaminae darstellen. Der CD3-Komplex ist als Ko-Rezeptor des T-Zellrezeptors auf allen T-Zellen exprimiert und kann als Pan-T-Zellmarker verwendet

werden. Der PVS von den Kortex penetrierenden Gefäßen in Cup/EAE-Tieren wurde auf enthaltene CD3<sup>+</sup> Zellen untersucht. In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass in 90 % der PVS quer angeschnittener Gefäße CD3<sup>+</sup> Zellen enthalten sind. Die Untersuchung des PVS längs angeschnittener penetrierender Gefäße konnte zeigen, dass in allen Schichten des Kortex CD3<sup>+</sup> Zellen im PVS vorhanden sind. Die Dichte der vorhandenen *interlaminären* CD3<sup>+</sup> Zellen steigt in der Tiefe des Kortex. *Extravasale* CD3<sup>+</sup> Zellen sind dagegen erst in der dritten Zone 3 des Kortex zu finden. Die Zahl *extravasaler* CD3<sup>+</sup> Zellen steigt ebenfalls in den tieferen Schichten an und ist in der letzten Zone ähnlich hoch wie die Zahl der *interlaminären* CD3<sup>+</sup> Zellen. Eine gerichtete Bewegung der CD3<sup>+</sup> Zellen im PVS, wie in der Arbeitshypothese formuliert, lässt sich durch die verwendete Methode nicht unmittelbar zeigen, da es sich um eine Momentaufnahme handelt. Die in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Erwartungen wurden jedoch durch die Ergebnisse bestätigt. Der Nachweis der CD3<sup>+</sup> Zellen im Verlauf des gesamten PVS deutet auf eine mögliche Route der Immunzellen im PVS hin. Der, im Vergleich zu den *interlaminären* CD3<sup>+</sup> Zellen, in tieferen Schichten einsetzende Anstieg der Dichte extravasaler CD3<sup>+</sup> Zellen lässt sich mit einem Übertritt in das Parenchym der CD3<sup>+</sup> Zellen auf Höhe der Läsion deuten.

In der Literatur ist beschrieben, dass in EAE-Tieren die ersten Lymphozyten-Ansammlungen noch vor klinischem Beginn in den spinalen Meningen zu finden sind [199]. Durch die passive Induktion einer EAE durch MOG- und MBP-reaktive T-Zellen, welche über einen gekoppelten Fluoreszenzstoff nachverfolgt wurden, konnte gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen aus den leptomeningealen Gefäßen in das Parenchym migrieren und nicht aktivierte T-Zellen im Liquor verbleiben [200]. Die Extravasation von T-Zellen aus leptomeningealen Gefäßen konnte über intravitale Multiphotonenmikroskopie in Echtzeit nachgewiesen werden [118]. Die *Leptomeninx* sind außerdem, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, an der Immunüberwachung des ZNS beteiligt [65,125]. Die aufgeführten Studien unterstützen die Hypothese der Arbeit, dass T-Zellen aus meningealen Gefäßen austreten, und lassen auf eine Beteiligung der meningealen Gefäße an einer Migrationsroute der Lymphozyten in das ZNS schließen.

Die begleitenden anatomischen Schichten entlang penetrierender Gefäße sind nicht in allen Regionen des humanen ZNS gleich. Penetrierende Gefäße der Basalganglien an der Basis des Gehirns sind von zwei Schichten der *Leptomeninx* umgeben und der zwischen den Schichten der *Leptomeninx* entstehende Raum steht direkt mit dem Subarachnoidalraum in Verbindung

[198]. Penetrierende Gefäße innerhalb des Kortex sind nur von einer leptomeningealen Schicht umgeben. Ob eine Verbindung zum Subarachnoidalraum oder lediglich zum Subpialraum besteht, wird diskutiert [197,201,202]. Durch Injektion eines Indikators in die *Cisterna magna* von Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Verbindung des kortikalen PVS zum Subarachnoidalraum existieren muss, da sich der Indikator sowohl im PVS der kortikalen als auch der basalen Gefäße sammelte [203]. Ähnliches konnte im Menschen durch Gadolinium-Injektion in den lumbalen Liquor nachgewiesen werden [204]. Diese Studien zeigen, dass eine Verbindung des Subarachnoidalraums zu den PVS existiert. Diese Verbindung ist eine Voraussetzung für die in der Arbeitshypothese formulierte Migrationsroute. Diskutiert wird weiterhin die Existenz eines, sogenannten, glymphatischen Systems [205]. Das glymphatische System beschreibt den Austausch zwischen interstitieller Flüssigkeit und dem Liquor über den von Astrozytenendfüßen exprimierten Wasserkanal Aquaporin 4 [171]. Über den PVS werden neuronale und gliale Endprodukte zu den äußeren Liquorräumen wie dem Subarachnoidalraum abtransportiert. Inwieweit Immunzellen über das glymphatische System migrieren, ist bisher nicht bekannt [205,206].

#### **4.2.1.2 Proinflammatorische Zytokine in den Meningen**

Proinflammatorische Zytokine, wie IL6, IL1beta, CCL2 und CXCL10 sind an der Ausbildung inflammatorischer MS-Läsionen beteiligt [41,42,207]. Es wurde untersucht, ob in den verwendeten Tiermodellen ein inflammatorisches Milieu in den Meningen vorliegt. Dazu wurde das meningeale Genom auf RNA-Ebene in den drei Experimentalgruppen 5WCup, Cup/EAE und EAE im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mittels einer qRT-PCR analysiert. Die mRNA Konzentration aller getesteten Zytokine war im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Cup/EAE und der EAE Gruppe signifikant erhöht. Die hohe Standardabweichung kann unter anderem auf die kleine Anzahl der Proben in den Gruppen zurückgeführt werden.

Am Endothel induziert IL6 eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen [59] und ermöglicht so die Extravasation von Immunzellen. Ein hoher IL6-Spiegel fördert demnach die lokale Rekrutierung von Immunzellen. Für die Ausbildung einer EAE ist IL6 von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass sich in *Il6<sup>-/-</sup>* Knockout-Mäusen keine EAE induzieren lässt und weniger Adhäsionsmoleküle in der Knockout-Maus im Vergleich zum Wildtyp gebildet wurden [59]. Der Effekt von Antikörpern gegen IL6 ist ungewiss, so konnte sowohl eine



Linderung der EAE [208], als auch ein Ausbleiben eines protektiven Effektes [209] beschrieben werden.

Die durch IL1beta ausgelöste Signalkaskade bewirkt eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen für migrierende Leukozyten am Endothel und damit eine stärkere Durchlässigkeit der BHS [56,57]. Ein hoher IL1beta-Spiegel fördert daher, ähnlich wie IL6, die Transmigration von Immunzellen über das Endothel der BHS. Die Bedeutung von IL1beta für die Entwicklung der EAE zeigt sich auch dadurch, dass eine Neutralisierung von IL1beta eine Minderung der EAE Symptomatik bewirkt [210]. In IL1-Rezeptor Knockout Mäusen konnte nur eine schwächere EAE ausgelöst werden [211] und die BHS zeigte nach EAE-Induktion eine geringere Durchlässigkeit als in Wildtypen [57]. In MS-Gehirnen konnte in Läsionen der grauen Substanz subpial eine erhöhte Gen Aktivität von *IL1beta* nachgewiesen werden [212].

Durch die chemotaktische Wirkung auf T-Zellen [47,48] fördert CCL2 die Rekrutierung von Immunzellen in das ZNS und ist besonders bei der Transmigration über das Endothel von Bedeutung. In *CCR2<sup>-/-</sup>* Knockout-Mäusen fehlt der Rezeptor für CCL2 und die Rekrutierung von Immunzellen findet nicht statt [49,213]. CCL2 ist bei der Bildung inflammatorischer Läsionen in Cup/EAE-Tieren involviert, und im *Corpus callosum*, *Cerebellum* sowie im Rückenmark konnten erhöhte *Ccl2*-Level nachgewiesen werden [170]. In MS-Gehirnen konnte sowohl in Läsionen der weißen Substanz, als auch in subpialen Läsionen der grauen Substanz, eine erhöhte Genaktivität von *CCL2* nachgewiesen werden [212].

CXCL10 hat eine starke chemotaktische Wirkung auf T-Zellen [43] und fördert damit die Rekrutierung von Immunzellen. Bei Gabe von Antikörpern gegen CXCL10 ist die Ausbildung einer EAE und die Menge der akkumulierenden T-Zellen im Mausmodell verringert [214]. In Cup/EAE-Tieren ist die Expression von *Cxcl10* und *Ccl2*, in *Corpus callosum*, *Cerebellum* sowie im Rückenmark erhöht [170]. Im Cuprizone-Modell induziert CXCL10 die frühe Aktivierung von Mikroglia in Cuprizone-Läsionen [215]. In post mortem humanen Meningenproben von RRMS-Patienten und in subpialen Läsionen der grauen Substanz, konnte eine erhöhte Genaktivität *CXCL10* nachgewiesen werden [212,216].

Die untersuchten proinflammatorischen Zytokine werden, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, von Immunzellen wie Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen und teilweise von Endothelzellen synthetisiert. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen

zusammengefasst eine inflammatorische Aktivität mit einer erhöhten Genaktivität proinflammatorischer Zytokine in den Meningen. Dies unterstützt die Arbeitshypothese, dass periphere Immunzellen über das Endothel leptomeningealer Gefäße migrieren. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie sich diese inflammatorische Aktivität im Verlauf der EAE beziehungsweise der Cup/EAE verhält. Die Tiere wurden an unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen EAE-Scores perfundiert. Die Cup/EAE-Tiere wiesen bei der Finalisierung einen höheren EAE-Score als die reinen EAE-Tiere auf. Weitere Versuche mit einer größeren Versuchstier-Anzahl und unterschiedlichen Finalisierungszeitpunkten nach den EAE-Scores wären notwendig, um eine genauere Aussage über den Verlauf der inflammatorischen Aktivität der Meningen in Bezug zum EAE-Score zu treffen. Würde die inflammatorische Aktivität auf Höhe der Meningen bereits vor der Ausbildung eines höheren EAE-Scores nachweisbar sein, würde dies eher für eine Rekrutierung der Immunzellen über die meningeale Route sprechen.

#### **4.2.2 Choroidale Migrationsroute**

---

Die Barriere der Blut-Liquor-Schranke liegt, wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, nicht auf Höhe des Endothels, sondern erst auf Höhe des Epithels des *Plexus choroideus*. Immunzellen können über das fenestrierte Endothel der choroidalen Gefäße in das Stroma des *Plexus choroideus* migrieren. So konnten sowohl im murinen als auch im humanen *Plexus choroideus* T-Zellen unter physiologischen Bedingungen gefunden werden [65,125]. Für eine Beteiligung des *Plexus choroideus* an der Immunüberwachung des ZNS spricht außerdem die Vielzahl an Makrophagen und dendritischen Zellen im Stroma des *Plexus choroideus* [95].

Nach Eintritt in das Stroma des *Plexus choroideus* gibt es für die T-Zellen zwei mögliche Routen, um in das Parenchym des ZNS zu gelangen. Gut beschrieben ist die Überquerung des Epithels des *Plexus choroideus*, die anschließende Verteilung über den Liquor und Invasion des ZNS Parenchyms [217,218]. Gegen die Migration über das Epithel spricht die Ausrichtung der Adhäsionsmoleküle. Die für die Transmigration notwendigen Adhäsionsmoleküle wie VCAM1 und ICAM1 [219] sind auf der apikalen Seite des Epithels exprimiert [220] und somit für zirkulierende T-Zellen nicht zugänglich. Gegen die Migration über das Epithel und die Verteilung über den Liquor spricht weiterhin, dass in einem Modell der zerebralen Ischämie durch ein Blocken des Liquorflusses die Infiltration von Lymphozyten in das ZNS Parenchyms aus dem *Plexus choroideus* nicht verhindert werden konnte [130]. In Tabelle 4.2.1 findet sich

eine Zusammenfassung der Argumente für die Migrationsroute über das Epithel des *Plexus choroideus* beziehungsweise über die Anheftungsstellen des *Plexus choroideus*.

Die seltener beschriebene Alternative zur Migration über das Epithel ist die Migration der T-Zellen entlang des Stromas des *Plexus choroideus* über die Anheftungsstelle in das ZNS Parenchym [130].

In dieser Arbeit wurde die allgemeine Morphologie des murinen *Plexus choroideus* und der Grenzstrukturen an der Anheftungsstelle untersucht. Die Kenntnis über die genaue Morphologie und vorhandene Grenzstrukturen ist die Grundlage zur Erforschung möglicher Migrationsrouten. Wie bereits von Llovera et al. beschrieben [130], konnte gezeigt werden, dass der *Plexus choroideus* im Seitenventrikel über die Weiterführung der Basallaminae und den Umschlag des Epithels ins Ependym angeheftet ist. Im dritten Ventrikel ist der *Plexus choroideus* über eine Gewebebrücke am Dach des dritten Ventrikels angeheftet. Die Anheftung im dritten Ventrikel wurde densitometrisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine dichtere Expression von IBA1 und GFAP an der Anheftungsstelle, im Vergleich zur gewählten Referenzregion, vorliegt. Dies deutet auf das Vorhandensein einer glialen Grenzstruktur hin. In den angefertigten Serienschnitten wurde die Nähe der Anheftung zum SFO deutlich. Diese Lagebeziehung wurde bereits beschrieben [221–223]. Am dorso-okzipitalen Ende des SFO geht das Epithel des *Plexus choroideus* in das Ependym über dem SFO über [222]. Über den an das SFO angrenzenden Subarachnoidalraum wird der *Plexus choroideus* vaskulär versorgt [221]. Die nachgewiesene gliale Grenzstruktur an der Anheftungsstelle kann durch die enge Lagebeziehung zum SFO aus dem SFO entstanden sein. Llovera et al. halten weitere Grenzstrukturen an der Anheftungsstelle für möglich, gehen aber von keinen Grenzstrukturen durch Tanyzyten aus [130]. Aufgrund der engen Lagebeziehung der Anheftungsstelle zum SFO, besteht jedoch die Möglichkeit einer Beteiligung der Tanyzyten an der Grenzstruktur. Da Tanyzyten GFAP exprimieren [88], sind sie in der optischen Dichte Messung der Anti-GFAP Immunmarkierung mit enthalten.

In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, wie sich die gliale Grenzstruktur unter inflammatorischen Bedingungen, wie dem Cup/EAE-Modell, verändert und ob eine Migration von T-Zellen durch diese Struktur nachweisbar ist.

**Tabelle 4.2.1 Zusammenfassung von Argumenten für die Immunzellmigrationsroute über das Epithel oder die Anheftungsstelle des Plexus choroideus**

Argumente <i>pro</i> Migration über das Epithel des Plexus choroideus	Argumente <i>pro</i> Migration über die Anheftungsstelle des Plexus choroideus
→ Unter physiologischen Bedingungen ist es Immunzellen möglich, das Epithel des <i>Plexus choroideus</i> zu überqueren [122–124].	→ Notwendigen Adhäsionsmoleküle wie VCAM1 und ICAM1 sind auf der apikalen Seite des Epithels exprimiert [219,220] und damit für Immunzellen im Stroma des <i>Plexus choroideus</i> nicht zugänglich.
→ Im Liquor von MS-Patienten findet sich eine erhöhte Leukozyten-Anzahl [91].	→ Durch Blocken des Liquorflusses kann die Infiltration von Lymphozyten in das ZNS Parenchyms aus dem <i>Plexus choroideus</i> nicht verhindert werden [130].
→ Wie in Kapitel 3.2.2 und in Kapitel 3.2.3 beschrieben, befinden sich sowohl an der Anheftungstelle des <i>Plexus choroideus</i> im dritten, als auch im lateralen Ventrikel Grenzstrukturen durch gliale Strukturen und Basallaminae.	→ Das Epithel des <i>Plexus choroideus</i> ist apikal durch Tight Junctions verbunden und bildet die eigentliche Barriere der Blut-Liquor-Schranke [91].

### 4.3 Fazit

---

Die Immunzellrekrutierung ist ein essentieller Bestandteil der MS-Pathologie. Die genaue Migrationsroute der Immunzellen ist nicht bekannt und Gegenstand vieler Studien [100,114,224,225]. In dieser Arbeit wurden zwei mögliche Routen genauer untersucht und beschrieben.

Es konnte erstmals die genauere Morphologie der Anheftung des murinen *Plexus choroideus* beschrieben werden. An der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* wurde eine gliale Grenzstruktur charakterisiert. Wie sich diese unter inflammatorischen Bedingungen verändert und ob eine Immunzellmigration in dieser Region nachweisbar ist, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

Die Arbeit liefert Hinweise auf eine mögliche Immunzellmigrationsroute entlang des PVS penetrierender Gefäße. Inwieweit diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sind, sollte an humanem Gewebe überprüft werden und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Erkenntnisse der Immunzellrekrutierung ermöglichen ein besseres Verständnis der Pathogenese der MS, was unerlässlich für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist.

## 5 Zusammenfassung

---

Hintergrund: Die anatomischen Routen der Immunzellmigration über die Barrieren des Zentralnervensystems (ZNS) bei der Multiplen Sklerose sind nicht abschließend geklärt. Detaillierte Kenntnis dieser Routen ist aber essentiell, um durch spezifische Modulation der Immunzellmigration Therapieoptionen zu entwickeln und zu optimieren.

Hypothesen: (1) Periphere Immunzellen migrieren über das Endothel leptomeningealer Gefäße in den Subarachnoidalraum und migrieren dann entlang des perivaskulären Raumes penetrierender Gefäße, um auf Höhe bestehender inflammatorischer Läsionen in das Parenchym überzutreten.

(2) Periphere Immunzellen migrieren über das gefensterte Endothel choroidaler Gefäße und innerhalb des Stromas des *Plexus choroideus* über dessen Anheftungsstelle in das ZNS Parenchym.

Methoden: In autoimmun-inflammatorischen sowie zytodegenerativen murinen Modellen der Demyelinisierung wurde die Expression proinflammatorischer Gene (*Il1beta*, *Il6*, *Ccl2* und *Cxcl10*) in den Meningen und die Verteilung von T-Zellen im perivaskulären Raum penetrierender Gefäße analysiert. Des Weiteren wurde durch histologische, immunhistologische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen die Morphologie der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im Seitenventrikel und dritten Ventrikel kartiert.

Ergebnisse: (1) Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren unter autoimmun-neuroinflammatorischen Bedingungen eine erhöhte inflammatorische Aktivität der Meningen, sowie Akkumulation von T-Zellen im perivaskulären Raum penetrierender Gefäße und mit steigender Dichte der T-Zellen in der Tiefe der Gefäße.

(2) Der *Plexus choroideus* ist im Seitenventrikel an *Fimbriae hippocampi* und *Diencephalon* und im Dach des dritten Ventrikels hinter dem Subfornikalorgan angeheftet. An diesen Lokalisationen liegen Barrieren aus Basallaminae, Astrozyten und Mikroglia vor.

Ausblick: Weitere Studien sollten die ultrastrukturelle Beschaffenheit der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*, sowie die Immunzellmigration über die Anheftungsstelle unter inflammatorischen Bedingungen untersuchen. Für die Immunzellmigrationsroute über penetrierende Gefäße sind Studien notwendig, die den zeitlichen Verlauf der Immunzellmigration darstellen, um nachzuweisen, dass die Immunzellen innerhalb des perivaskulären Raumes in die Tiefe des Gehirns zur Läsion migrieren.

## 6 Thesen

---

1. Die Multiple Sklerose ist eine Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), bei der es zur Infiltration peripherer Immunzellen in den immunprivilegierten Raum des ZNS kommt.
2. Derzeit diskutierte Immunzellmigrationsrouten führen über postkapilläre Venolen im Hirnparenchym, über postkapilläre Venolen der Leptomeninx oder über das fenestrierte Endothel und das Epithel des *Plexus choroideus*.
3. Weitere Immunzellmigrationsrouten sind die Route entlang des perivaskulären Raumes (PVS) penetrierender Gefäße und die Route innerhalb des Stroma und über die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*.
4. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine erhöhte Expression von Genen proinflammatorischer Zytokine und Chemokine und damit eine erhöhte inflammatorische Aktivität in den Meningen von Tieren unter autoimmuninflammatorischen Bedingungen.
5. Entlang penetrierender Gefäße können bei Mäusen des kombinierten autoimmuninflammatorischen und zytodegenerativen Modells im gesamten PVS T-Zellen gefunden werden. Die Dichte der T-Zellen steigt mit der Entfernung zur Hirnoberfläche.
6. Die Kenntnis über die Anatomie des murinen *Plexus choroideus* ist essentiell zur Untersuchung der Immunzellmigrationsroute über das Stroma und die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*.
7. Der *Plexus choroideus* ist in allen vier Ventrikeln der Maus vorhanden. Der *Plexus choroideus* der Seitenventrikel steht mit dem des dritten Ventrikels über das *Foramen interventrikulare* in Verbindung.
8. Der *Plexus choroideus* ist im Seitenventrikel an *Fimbria hippocampi* und *Diencephalon* angeheftet. Es liegt eine Barriere aus Basallamina und Astrozyten vor.
9. Der *Plexus choroideus* ist im dritten Ventrikel dorso-okzipital hinter dem Subfornikalorgan angeheftet. Es besteht eine Barriere aus Mikroglia und Astrozyten.
10. Zukünftige Untersuchungen sollten sich mit der ultrastrukturellen Beschaffenheit der Anheftungsstellen des *Plexus choroideus* beschäftigen und mit einer Echtzeitverfolgung der Immunzellmigration auf Höhe der penetrierenden Gefäße.

## 7 Literatur

---

1. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 2014;83:1022–1024.
2. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine* 2018;378:169–180.
3. Stuke K, Flachenecker P, Zettl UK, Elias WG, Freidel M, Haas J, et al. Symptomatology of MS: results from the German MS Registry. *Journal of neurology* 2009;256:1932–1935.
4. Sawcer S, Franklin RJM, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology* 2014;13:700–709.
5. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology* 2015;14:263–273.
6. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology* 2017;13:25–36.
7. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science (New York, N.Y.)* 2022. Epub 21. Januar 2022.
8. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996;46:907–911.
9. Saleem S, Anwar A, Fayyaz M, Anwer F, Anwar F. An Overview of Therapeutic Options in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *Cureus* 2019;11:e5246.
10. Solari A, Giovannetti AM, Giordano A, Tortorella C, Torri Clerici V, Bricchetto G, et al. Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis: Patient Awareness and Needs. Results From an Online Survey in Italy and Germany. *Frontiers in neurology* 2019;10:916.
11. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014;83:278–286.
12. Keegan BM, Noseworthy JH (eds). Multiple sclerosis, Vol 53. *Annu Rev Med*; 2002.



13. Tsang BK-T, Macdonell R. Multiple sclerosis- diagnosis, management and prognosis. *Australian family physician* 2011;40:948–955.
14. Marcus JF, Waubant EL. Updates on clinically isolated syndrome and diagnostic criteria for multiple sclerosis. *The Neurohospitalist* 2013;3:65–80.
15. Katz Sand I. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology* 2015;28:193–205.
16. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 2018;17:162–173.
17. Filippi M, Preziosa P, Banwell BL, Barkhof F, Ciccarelli O, Stefano N de, et al. Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain* 2019;142:1858–1875.
18. Höflich KM, Beyer C, Clarner T, Schmitz C, Nyamoya S, Kipp M, et al. Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain research* 2016;1650:125–133.
19. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 2002;125:2202–2212.
20. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;120 (Pt 3):393–399.
21. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta neuropathologica* 2017;133:13–24.
22. Lucchinetti C, Brck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000;47:707–717.
23. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 2004;14:164–174.
24. Lassmann H. *Multiple Sclerosis Pathology*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2018;8.

25. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 2011;134:2755–2771.
26. Bevan RJ, Evans R, Griffiths L, Watkins LM, Rees MI, Magliozzi R, et al. Meningeal inflammation and cortical demyelination in acute multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2018;84:829–842.
27. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2014;14:447–462.
28. Kuerten S, Schickel A, Kerkloh C, Recks MS, Addicks K, Ruddle NH, et al. Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response. *Acta neuropathologica* 2012;124:861–873. Epub 28. Juli 2012.
29. Dunja Mrdjen, Anto Pavlovic, Felix J. Hartmann, Bettina Schreiner, Sebastian G. Utz, Brian P. Leung, et al. High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. *Immunity* 2018;48:599.
30. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain : a journal of neurology* 2009;132:1175–1189.
31. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain : a journal of neurology* 2018;141:2066–2082.
32. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000;192:393–404.
33. Hayashi T, Morimoto C, Burks JS, Kerr C, Hauser SL. Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann Neurol.* 1988;24:523–531.
34. Kipp M, van der Valk P, Amor S. Pathology of Multiple Sclerosis. *CNS & Neurological Disorder* 2012:506–517.

35. Fitzner D, Simons M. Chronic progressive multiple sclerosis - pathogenesis of neurodegeneration and therapeutic strategies. *Current neuropharmacology* 2010;8:305–315.
36. Katz D, Taubenberger JK, Cannella B, McFarlin DE, Raine CS, McFarland HF. Correlation between magnetic resonance imaging findings and lesion development in chronic, active multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1993;34:661–669.
37. Brück W, Bitsch A, Kolenda H, Brück Y, Stiefel M, Lassmann H. Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann Neurol.* 1997;42:783–793.
38. Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *The Journal of pathology* 2003;201:319–327.
39. Leech S, Kirk J, Plumb J, McQuaid S. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology* 2007;33:86–98.
40. Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J, Engelhardt B, Lyck R, Gordon G, et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2006;65:855–865.
41. Khaibullin T, Ivanova V, Martynova E, Cherepnev G, Khabirov F, Granatov E, et al. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Frontiers in immunology* 2017;8:531.
42. Wang K, Song F, Fernandez-Escobar A, Luo G, Wang J-H, Sun Y. The Properties of Cytokines in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. *The American journal of the medical sciences* 2018;356:552–560.
43. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2002;168:3195–3204.
44. Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F, Bertagnin A, Luster AD, McDonald PP. Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *European journal of immunology* 1997;27:111–115.

45. Skripuletz T, Hackstette D, Bauer K, Gudi V, Pul R, Voss E, et al. Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain : a journal of neurology* 2013;136:147–167.
46. Sørensen TL, Trebst C, Kivisäkk P, Klaege KL, Majmudar A, Ravid R, et al. Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *Journal of Neuroimmunology* 2002;127:59–68.
47. Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Seminars in Immunology* 2003;15:23–32.
48. McManus C, Berman JW, Brett FM, Staunton H, Farrell M, Brosnan CF. MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Journal of Neuroimmunology* 1998;86:20–29.
49. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2000;192:899–905.
50. Henrik Toft-Hansen, Richard Buist, Xue-Jun Sun, Angela Schellenberg, James Peeling, Trevor Owens. Metalloproteinases Control Brain Inflammation Induced by Pertussis Toxin in Mice Overexpressing the Chemokine CCL2 in the Central Nervous System. *The Journal of Immunology* 2006;177:7242–7249.
51. van der Voorn P, Tekstra J, Beelen RHJ, Tensen CP, van der Valk P, Groot CJA de. Expression of MCP-1 by Reactive Astrocytes in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions. *The American Journal of Pathology* 1999;154:45–51.
52. Sørensen TL, Sellebjerg F, Jensen CV, Strieter RM, Ransohoff RM. Chemokines CXCL10 and CCL2: differential involvement in intrathecal inflammation in multiple sclerosis. *European journal of neurology* 2001;8:665–672.
53. Martynova E, Goyal M, Johri S, Kumar V, Khaibullin T, Rizvanov AA, et al. Serum and Cerebrospinal Fluid Cytokine Biomarkers for Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Mediators of inflammation* 2020;2020:2727042.
54. Maimone D, Gregory S, Arnason BGW, Reder AT. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 1991;32:67–74.

55. Burm SM, Peferoen LAN, Zuiderwijk-Sick EA, Haanstra KG, Hart BA 't, van der Valk P, et al. Expression of IL-1 $\beta$  in rhesus EAE and MS lesions is mainly induced in the CNS itself. *Journal of neuroinflammation* 2016;13:138.
56. Argaw AT, Zhang Y, Snyder BJ, Zhao M-L, Kopp N, Lee SC, et al. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2006;177:5574–5584.
57. Hauptmann J, Johann L, Marini F, Kitic M, Colombo E, Mufazalov IA, et al. Interleukin-1 promotes autoimmune neuroinflammation by suppressing endothelial heme oxygenase-1 at the blood-brain barrier. *Acta neuropathologica* 2020;140:549–567.
58. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et biophysica acta* 2016;1863:1218–1227.
59. Eugster H-P, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 1998;28:2178–2187.
60. Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in Immunology* 2015;36:569–577.
61. Alcolado R, Weller RO, Parrish EP, Garrod D. The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathology and applied neurobiology* 1988;14:1–17.
62. Coles JA, Myburgh E, Brewer JM, McMenemy PG. Where are we? The anatomy of the murine cortical meninges revisited for intravital imaging, immunology, and clearance of waste from the brain. *Progress in neurobiology* 2017;156:107–148.
63. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *The Journal of cell biology* 1967;34:207–217.
64. Antoine Louveau, Benjamin A. Plog, Salli Antila, Kari Alitalo, Maiken Nedergaard, Jonathan Kipnis. Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J Clin Invest* 2017;127:3210–3219.
65. Carrithers MD, Visintin I, Viret C, Janeway CA. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology* 2002;129:51–57.

66. Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *The Journal of comparative neurology* 2002;451:170–188.
67. Antoine Louveau, Igor Smirnov, Timothy J. Keyes, Jacob D. Eccles, Sherin J. Rouhani, J. David Peske, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015;523:337–341.
68. JW Prineas. Multiple sclerosis: presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. *Science* 1979;203:1123–1125.
69. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *The Journal of cell biology* 1999;147:185–194.
70. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2015;7:a020412.
71. Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLOS ONE* 2010;5:e13741.
72. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 2009;158:983–994.
73. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* 2003;161:653–660.
74. Boven LA, Middel J, Verhoef J, Groot CJ de, Nottet HS. Monocyte infiltration is highly associated with loss of the tight junction protein zonula occludens in HIV-1-associated dementia. *Neuropathology and applied neurobiology* 2000;26:356–360.
75. Hickey WF. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 2001;36:118–124.
76. Neuhaus J, Risau W, Wolburg H. Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991;633:578–580.
77. Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the

- blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of cell biology* 2001;153:933–946.
78. Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell and tissue research* 2009;335:75–96. Epub 16. Juli 2008.
79. Mak KM, Mei R. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 2017;300:1371–1390. Epub 28. Februar 2017.
80. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 2014;508:55–60.
81. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 2006;443:700–704.
82. Woollam DH, Millen JW. The perivascular spaces of the mammalian central nervous system and their relation to the perineuronal and subarachnoid spaces. *Journal of Anatomy* 1955;89:193–200.
83. Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochemical research* 2015;40:2583–2599.
84. Saade C, Bou-Fakhredin R, Yousem DM, Asmar K, Naffaa L, El-Merhi F. Gadolinium and Multiple Sclerosis: Vessels, Barriers of the Brain, and Glymphatics. *AJNR. American journal of neuroradiology* 2018;39:2168–2176.
85. Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2008;67:1113–1121.
86. Duvernoy HM, Risold P-Y. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain research reviews* 2007;56:119–147.
87. Petrov T, Howarth AG, Krukoff TL, Stevenson BR. Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Molecular Brain Research* 1994;21:235–246.
88. Hofmann K, Lamberz C, Piotrowitz K, Offermann N, But D, Scheller A, et al. Tanycytes and a differential fatty acid metabolism in the hypothalamus. *Glia* 2017;65:231–249.
89. Horstmann E. Die Faserglia des Selachiergehirns. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 1954;39:588–617.

90. Cornford EM, Hyman S, Cornford ME, Damian RT. Glut1 glucose transporter in the primate choroid plexus endothelium. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1998;57:404–414.
91. Kaur C, Rathnasamy G, Ling E-A. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2016;75:198–213.
92. Dempsey EW, Wilslocki GB. An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1955;1:245–256.
93. Ghersi-Egea J-F, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta neuropathologica* 2018;135:337–361.
94. Serot JM, Foliguet B, Béné MC, Faure GC. Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium. *Neuroreport* 1997;8:1995–1998.
95. Nathanson JA, Chun LL. Immunological function of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;86:1684–1688.
96. van Hove H, Martens L, Scheyltjens I, Vlaminck K de, Pombo Antunes AR, Prijck S de, et al. A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nature neuroscience* 2019;22:1021–1035.
97. Quinton PM, Wright EM, Tormey JM. Localization of sodium pumps in the choroid plexus epithelium. *The Journal of cell biology* 1973;58:724–730.
98. Wright EM. Mechanisms of ion transport across the choroid plexus. *The Journal of physiology* 1972;226:545–571.
99. Boassa D, Stamer WD, Yool AJ. Ion channel function of aquaporin-1 natively expressed in choroid plexus. *J. Neurosci.* 2006;26:7811–7819.
100. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flügel A, Laman JD, Weller RO. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 2016;132:317–338.
101. Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, Armstrong D. Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. *Cerebrospinal Fluid Research* 2004;1:2.



102. Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2004;173:2353–2361.
103. Pesic M, Bartholomäus I, Kyratsous NI, Heissmeyer V, Wekerle H, Kawakami N. 2-photon imaging of phagocyte-mediated T cell activation in the CNS. *The Journal of clinical investigation* 2013;123:1192–1201.
104. Marsilius Mues, Ingo Bartholomäus, Thomas Thestrup, Oliver Griesbeck, Hartmut Wekerle, Naoto Kawakami, et al. Real-time in vivo analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator. *Nat Med* 2013;19:778–783. <https://www.nature.com/articles/nm.3180>.
105. Strominger I, Elyahu Y, Berner O, Reckhow J, Mittal K, Nemirovsky A, et al. The Choroid Plexus Functions as a Niche for T-Cell Stimulation Within the Central Nervous System. *Frontiers in immunology* 2018;9:1066.
106. Mundt S, Mrdjen D, Utz SG, Greter M, Schreiner B, Becher B. Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation. *Science immunology* 2019;4.
107. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature medicine* 2005;11:328–334.
108. Cash E, Zhang Y, Rott O. Microglia Present Myelin Antigens to T Cells after Phagocytosis of Oligodendrocytes. *Cellular Immunology* 1993;147:129–138.
109. Frank L Heppner, Melanie Greter, Denis Marino, Jeppe Falsig, Gennadij Raivich, Nadine Hövelmeyer, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 2005;11:146–152.
110. Olaf Stüve, Sawsan Youssef, Anthony J. Slavin, Chelsea L. King, Juan Carlos Patarroyo, David L. Hirschberg, et al. The Role of the MHC Class II Transactivator in Class II Expression and Antigen Presentation by Astrocytes and in Susceptibility to Central Nervous System Autoimmune Disease. *The Journal of Immunology* 2002;169:6720–6732.
111. Julie Wheway, Stephanie Obeid, Pierre-Olivier Couraud, Valery Combes, Georges E. R. Grau. The Brain Microvascular Endothelium Supports T Cell Proliferation and Has Potential for Alloantigen Presentation. *PLOS ONE* 2013;8:e52586.

112. Melissa A Lopes Pinheiro, Kamermans A, Garcia-Vallejo JJ, Bert van het Hof, Wiertz L, O' T, et al. Internalization and presentation of myelin antigens by the brain endothelium guides antigen-specific T cell migration. eLife Sciences Publications, Ltd 2016.
113. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature immunology* 2017;18:123–131.
114. Charabati M, Rabanel J-M, Ramassamy C, Prat A. Overcoming the Brain Barriers: From Immune Cells to Nanoparticles. *Trends in pharmacological sciences* 2020;41:42–54.
115. Rossi B, Angiari S, Zenaro E, Budui SL, Constantin G. Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions. *Journal of Leukocyte Biology* 2011;89:539–556. Epub 17. Dezember 2010.
116. Serres S, Mardiguian S, Campbell SJ, McAteer MA, Akhtar A, Krapitchev A, et al. VCAM-1-targeted magnetic resonance imaging reveals subclinical disease in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011;25:4415–4422. Epub 09. September 2011.
117. Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Gauberti M, Defer G, Vivien D, et al. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *PNAS* 2017;114:6116–6121. Epub 22. Mai 2017.
118. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 2009;462:94–98.
119. Lodygin D, Odoardi F, Schlager C, Korner H, Kitz A, Nosov M, et al. A combination of fluorescent NFAT and H2B sensors uncovers dynamics of T cell activation in real time during CNS autoimmunity. *Nature medicine* 2013;19:784–790.
120. Smriti Agrawal, Per Anderson, Madeleine Durbeej, Nico van Rooijen, Fredrik Ivars, Ghislain Opdenakker, et al. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* 2006.
121. Agrawal SM, Williamson J, Sharma R, Kebir H, Patel K, Prat A, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer shows active perivascular cuffs in multiple sclerosis. *Brain* 2013;136:1760–1777. Epub 17. Mai 2013.
122. Svenningsson A, Andersen O, Edsbacke M, Stemme S. Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroimmunology* 1995;63:39–46.

123. Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature reviews. Immunology* 2013;13:206–218.
124. Huber D, Balda MS, Matter K. Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:5773–5778.
125. Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, et al. Human cerebrospinal fluid central memory CD4<sup>+</sup> T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:8389–8394.
126. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature immunology* 2009;10:514–523.
127. Kooij G, Kopplin K, Blasig R, Stuiver M, Koning N, Goverse G, et al. Disturbed function of the blood-cerebrospinal fluid barrier aggravates neuro-inflammation. *Acta neuropathologica* 2014;128:267–277. Epub 20. Dezember 2013.
128. Vercellino M, Votta B, Condello C, Piacentino C, Romagnolo A, Merola A, et al. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. *Journal of Neuroimmunology* 2008;199:133–141.
129. Rodríguez-Lorenzo S, Konings J, van der Pol S, Kamermans A, Amor S, van Horsen J, et al. Inflammation of the choroid plexus in progressive multiple sclerosis: accumulation of granulocytes and T cells. *Acta neuropathologica communications* 2020;8:9.
130. Llovera G, Benakis C, Enzmann G, Cai R, Arzberger T, Ghasemigharagoz A, et al. The choroid plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke. *Acta neuropathologica* 2017;134:851–868.
131. Carlton WW. Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sciences* 1967;6:11–19.
132. Zhan J, Mann T, Joost S, Behrangi N, Frank M, Kipp M. The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells* 2020;9:843.
133. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP-Y, Suzuki K, Matsushima GK. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology* 1998;92:38–49.

134. LiPing Liu, Abdelmadjid Belkadi, Lindsey Darnall, Taofang Hu, Caitlin Drescher, Anne C Cotleur, et al. CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: relevance to multiple sclerosis. *Nat Neurosci* 2010;13:319–326.
135. McMahon EJ, Suzuki K, Matsushima GK. Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood–brain barrier. *Journal of Neuroimmunology* 2002;130:32–45.
136. Remington LT, Babcock AA, Zehntner SP, Owens T. Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. *The American Journal of Pathology* 2007;170:1713–1724.
137. Cerina M, Narayanan V, Göbel K, Bittner S, Ruck T, Meuth P, et al. The quality of cortical network function recovery depends on localization and degree of axonal demyelination. *Brain, behavior, and immunity* 2017;59:103–117.
138. Tejedor LS, Wostradowski T, Gingele S, Skripuletz T, Gudi V, Stangel M. The Effect of Stereotactic Injections on Demyelination and Remyelination: a Study in the Cuprizone Model. *J Mol Neurosci* 2017;61:479–488.
139. Kaddatz H, Joost S, Nedelcu J, Chrzanowski U, Schmitz C, Gingele S, et al. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia* 2020.
140. Voß EV, Škuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, et al. Characterisation of microglia during de- and remyelination: Can they create a repair promoting environment? *Neurobiology of disease* 2012;45:519–528.
141. Schmidt T, Awad H, Slowik A, Beyer C, Kipp M, Clarner T. Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: topographical aspects of the midline of the corpus callosum. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2013;49:80–88.
142. Koutsoudaki PN, Skripuletz T, Gudi V, Moharrehg-Khiabani D, Hildebrandt H, Trebst C, et al. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neuroscience Letters* 2009;451:83–88.
143. Groebe A, Clarner T, Baumgartner W, Dang J, Beyer C, Kipp M. Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrocytosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum (London, England)* 2009;8:163–174.
144. Pott F, Gingele S, Clarner T, Dang J, Baumgartner W, Beyer C, et al. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain research* 2009;1305:137–149.

145. Wagenknecht N, Becker B, Scheld M, Beyer C, Clarner T, Hochstrasser T, et al. Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models. *Journal of molecular neuroscience* : MN 2016;60:102–114.
146. Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, et al. Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *The American Journal of Pathology* 2008;172:1053–1061.
147. V. Herder, F. Hansmann, M. Stangel, T. Skripuletz, W. Baumgärtner, A. Beineke. Lack of cuprizone-induced demyelination in the murine spinal cord despite oligodendroglial alterations substantiates the concept of site-specific susceptibilities of the central nervous system. *Neuropathology and applied neurobiology* 2011;37:676–684.
148. Bakker DA, Ludwin SK. Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. *Journal of the neurological sciences* 1987;78:125–137.
149. Kondo A, Nakano T, Suzuki K. Blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in twitcher and cuprizone-intoxicated mice. *Brain research* 1987;425:186–190.
150. Venturini G. Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo. *J Neurochem* 1973;21:1147–1151.
151. Benetti F, Ventura M, Salmini B, Ceola S, Carbonera D, Mammi S, et al. Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. *Neurotoxicology* 2010;31:509–517.
152. Kumar N. Copper Deficiency Myelopathy (Human Swayback). *Mayo Clinic Proceedings* 2006;81:1371–1384.
153. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2014;47:485–505.
154. Bénardais K, Kotsiari A, Skuljec J, Koutsoudaki PN, Gudi V, Singh V, et al. Cuprizone bis(cyclohexylidenehydrazide) is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotoxicity research* 2013;24:244–250.
155. Connor JR, Menzies SL. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia* 1996;17:83–93.
156. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica* 2009;118:723–736.

157. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 2017;27:123–137.
158. Simon Glatigny, Estelle Bettelli. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8:a028977.
159. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2014.
160. Itzhack Mendel, Nicole Kerlero de Rosbo, Avraham Ben-Nun. 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. *European journal of immunology* 1995;25:1951–1959.
161. Clarkson BD, Walker A, Harris M, Rayasam A, Sandor M, Fabry Z. Mapping the accumulation of co-infiltrating CNS dendritic cells and encephalitogenic T cells during EAE. *Journal of Neuroimmunology* 2014;277:39–49.
162. Brown DA, Sawchenko PE. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of comparative neurology* 2007;502:236–260.
163. Duarte J, Carrié N, Oliveira VG, Almeida C, Agua-Doce A, Rodrigues L, et al. T cell apoptosis and induction of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells underlie the therapeutic efficacy of CD4 blockade in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 2012;189:1680–1688.
164. Schettters STT, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. Neuroinflammation: Microglia and T Cells Get Ready to Tango. *Frontiers in immunology* 2017;8:1905.
165. Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* 2011;17:495–499.
166. Bando Y, Nomura T, Bochimoto H, Murakami K, Tanaka T, Watanabe T, et al. Abnormal morphology of myelin and axon pathology in murine models of multiple sclerosis. *Neurochemistry International* 2015;81:16–27.

167. Bennett J, Basivireddy J, Kollar A, Biron KE, Reickmann P, Jefferies WA, et al. Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. *Journal of Neuroimmunology* 2010;229:180–191.
168. Marzena J, Fabis, Gwen S. Scott, Rhonda B. Kean, Hilary Koprowski, D. Craig Hooper. Loss of blood–brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models. *PNAS* 2007;104:5656–5661.
169. Scheld M, Ruther BJ, Grosse-Veldmann R, Ohl K, Tenbrock K, Dreymuller D, et al. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2016;36:1410–1415.
170. Rütter BJ, Scheld M, Dreymueller D, Clarner T, Kress E, Brandenburg L-O, et al. Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia* 2017;65:1900–1913.
171. Rohr SO, Greiner T, Joost S, Amor S, van der Valk P, Schmitz C, et al. Aquaporin-4 Expression during Toxic and Autoimmune Demyelination. *Cells* 2020;9.
172. Georg Paxinos, Keith B. J. Franklin. *The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinates*. 2<sup>nd</sup> ed. Orlando, Florida: Academic Press; 2001.
173. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* 2006;1:581–585.
174. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC bioinformatics* 2005;6:62.
175. Hesse A, Wagner M, Held J, Brück W, Salinas-Riester G, Hao Z, et al. In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiology of disease* 2010;37:362–369.
176. Goldberg J, Daniel M, van Heuvel Y, Victor M, Beyer C, Clarner T, et al. Short-term cuprizone feeding induces selective amino acid deprivation with concomitant activation of an integrated stress response in oligodendrocytes. *Cellular and molecular neurobiology* 2013;33:1087–1098.
177. Doucette JR, Jiao R, Nazarali AJ. Age-related and cuprizone-induced changes in myelin and transcription factor gene expression and in oligodendrocyte cell densities in the rostral

- corpus callosum of mice. *Cellular and molecular neurobiology* 2010;30:607–629. Epub 09. Januar 2010.
178. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005;128:2705–2712. Epub 17. Oktober 2005.
179. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014;8:73.
180. Haines JD, Inglese M, Casaccia P. Axonal damage in multiple sclerosis. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 2011;78:231–243.
181. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 2007;17:210–218.
182. Yu Q, Hui R, Park J, Huang Y, Kusnecov AW, Dreyfus CF, et al. Strain differences in cuprizone induced demyelination. *Cell & bioscience* 2017;7:59.
183. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006;129:1953–1971. Epub 21. April 2006.
184. Teuscher C, Hickey WF, Korngold R. An analysis of the role of tumor necrosis factor in the phenotypic expression of actively induced experimental allergic orchitis and experimental allergic encephalomyelitis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1990;54:442–453.
185. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology* 2011;164:1079–1106.
186. Smith ME, Eller NL, McFarland HF, Racke MK, Raine CS. Age Dependence of Clinical and Pathological Manifestations of Autoimmune Demyelination. *The American Journal of Pathology* 1999;155:1147–1161.
187. Butterfield RJ, Blankenhorn EP, Roper RJ, Zachary JF, Doerge RW, Sudweeks J, et al. Genetic analysis of disease subtypes and sexual dimorphisms in mouse experimental allergic encephalomyelitis (EAE): relapsing/remitting and monophasic remitting/nonrelapsing EAE are immunogenetically distinct. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1999;162:3096–3102.



188. Raddassi K, Kent SC, Yang J, Bourcier K, Bradshaw EM, Seyfert-Margolis V, et al. Increased frequencies of myelin oligodendrocyte glycoprotein/MHC class II-binding CD4 cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of Immunology* 2011;187:1039–1046. Epub 08. Juni 2011.
189. Johns LD, Flanders KC, Ranges GE, Sriram S. Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis with transforming growth factor-beta 1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 1991;147:1792–1796.
190. Wiendl H, Hohlfeld R. Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2002;16:183–200.
191. Outteryck O. Natalizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert review of neurotherapeutics* 2016;16:471–481.
192. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992;356:63–66.
193. Delbue S, Comar M, Ferrante P. Natalizumab treatment of multiple sclerosis: new insights. *Immunotherapy* 2017;9:157–171. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28004598/>.
194. Peter K, Stys, Gerald W, Zamponi, Jan van Minnen, Jeroen J. G. Geurts. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci* 2012;13:507–514.
195. Trapp BD, Nave K-A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annual review of neuroscience* 2008;31:247–269.
196. Ryuichi Tanaka, Yuzo Iwasaki, Hilary Koprowski. Ultrastructural Studies of Perivascular Cuffing Cells in Multiple Sclerosis Brain. *The American Journal of Pathology*;1975.
197. Wardlaw JM, Benveniste H, Nedergaard M, Zlokovic BV, Mestre H, Lee H, et al. Perivascular spaces in the brain: anatomy, physiology and pathology. *Nature reviews. Neurology* 2020;16:137–153.
198. Bouvy WH, Biessels GJ, Kuijf HJ, Kappelle LJ, Luijten PR, Zwanenburg JJM. Visualization of perivascular spaces and perforating arteries with 7 T magnetic resonance imaging. *Investigative radiology* 2014;49:307–313.
199. Waksman BH, Adams RD. A histologic study of the early lesion in experimental allergic encephalomyelitis in the guinea pig and rabbit. *The American Journal of Pathology* 1962;41:135–162.

200. Schläger C, Körner H, Krueger M, Vidoli S, Haberl M, Mielke D, et al. Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid. *Nature* 2016;530:349–353.
201. Pollock H, Hutchings M, Weller RO, Zhang ET. Perivascular spaces in the basal ganglia of the human brain: their relationship to lacunes. *Journal of Anatomy* 1997;191 (Pt 3):337–346.
202. Zhang ET, Inman CB, Weller RO. Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *Journal of Anatomy* 1990;170:111–123.
203. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Science translational medicine* 2012;4:147ra111.
204. Ringstad G, Valnes LM, Dale AM, Pripp AH, Vatnehol S-AS, Emblem KE, et al. Brain-wide glymphatic enhancement and clearance in humans assessed with MRI. *JCI insight* 2018;3. Epub 12. Juli 2018.
205. Abbott NJ, Pizzo ME, Preston JE, Janigro D, Thorne RG. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? *Acta neuropathologica* 2018;135:387–407.
206. Hannocks M-J, Pizzo ME, Huppert J, Deshpande T, Abbott NJ, Thorne RG, et al. Molecular characterization of perivascular drainage pathways in the murine brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2018;38:669–686.
207. Clerici M, Saresella M, Trabattoni D, Speciale L, Fossati S, Ruzzante S, et al. Single-cell analysis of cytokine production shows different immune profiles in multiple sclerosis patients with active or quiescent disease. *Journal of Neuroimmunology* 2001;121:88–101.
208. Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Molecular Medicine* 1995;1:795–805.
209. Willenborg DO, Fordham SA, Cowden WB, Ramshaw IA. Cytokines and murine autoimmune encephalomyelitis: inhibition or enhancement of disease with antibodies to select cytokines, or by delivery of exogenous cytokines using a recombinant vaccinia virus system. *Scandinavian journal of immunology* 1995;41:31–41.

210. Jacobs CA, Baker PE, Roux ER, Picha KS, Toivola B, Waugh S, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated by IL-1 alpha and suppressed by soluble IL-1 receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1991;146:2983–2989.
211. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006;203:1685–1691. Epub 03. Juli 2006.
212. Veroni C, Serafini B, Rosicarelli B, Fagnani C, Aloisi F, Agresti C. Connecting Immune Cell Infiltration to the Multitasking Microglia Response and TNF Receptor 2 Induction in the Multiple Sclerosis Brain. *Frontiers in cellular neuroscience* 2020;14:190. Epub 07. Juli 2020.
213. Lampron A, Larochelle A, Laflamme N, Préfontaine P, Plante M-M, Sánchez MG, et al. Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *The Journal of experimental medicine* 2015;212:481–495. Epub 16. März 2015.
214. Fife BT, Kennedy KJ, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Luster AD, et al. CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2001;166:7617–7624.
215. Clarner T, Janssen K, Nellessen L, Stangel M, Skripuletz T, Krauspe B, et al. CXCL10 triggers early microglial activation in the cuprizone model. *The Journal of Immunology* 2015;194:3400–3413.
216. Magliozzi R, Howell OW, Nicholas R, Cruciani C, Castellaro M, Romualdi C, et al. Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2018;83:739–755.
217. Britta Engelhardt, Richard M. Ransohoff. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood–brain barriers. *Trends in Immunology* 2012;33:579–589.
218. Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *The EMBO Journal* 2014;33:7–22. Epub 19. Dezember 2013.
219. Steffen BJ, Butcher EC, Engelhardt B. Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *The American Journal of Pathology* 1994;145:189–201.

220. Wolburg K, Gerhardt H, Schulz M, Wolburg H, Engelhardt B. Ultrastructural localization of adhesion molecules in the healthy and inflamed choroid plexus of the mouse. *Cell and tissue research* 1999;296:259–269.
221. Spoerri O. Über die Gefäßversorgung des Subfornikalorgans der Ratte. *Cells Tissues Organs* 1963;54:333–348.
222. Dempsey EW. Fine-structure of the rat's intercolumnar tubercle and its adjacent ependyma and choroid plexus, with especial reference to the appearance of its sinusoidal vessels in experimental argyria. *Experimental neurology* 1968;22:568–589.
223. Pócsai K, Kálmán M. Glial and perivascular structures in the subfornical organ: distinguishing the shell and core. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2015;63:367–383.
224. Hickey WF. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Seminars in Immunology* 1999;11:125–137.
225. Joan Goverman. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:393–407.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1.1.1 Verlaufsformen der MS.....	2
Abbildung 1.2.1 Schematische Darstellung der Meningen.....	6
Abbildung 1.2.2 Aufbau einer Basalmembran.....	8
Abbildung 1.2.3 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke.....	9
Abbildung 1.2.4 Aufbau des Plexus choroideus.....	11
Abbildung 1.2.5 Schema der Immunzellrekrutierungsrouten.....	15
Abbildung 1.3.1 Darstellung der Demyelinisierung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation durch eine Anti-Proteolipid-Protein Immunmarkierung.....	17
Abbildung 1.4.1 Schematische Darstellung der Migrationsroute entlang des perivaskulären Raumes.....	20
Abbildung 1.4.2 Schematische Darstellung der möglichen Migrationsrouten über den Plexus choroideus.....	21
Abbildung 2.2.1 Prinzip der immunhistochemischen Markierung nach der ABC-Methode .	30
Abbildung 2.2.2 Prinzip der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung.....	34
Abbildung 2.3.1 Auswertung Immunfluoreszenzdoppelmarkierung mit einem Macro .....	37
Abbildung 2.3.2 Vorbereitung der optischen Dichtemessung.....	38
Abbildung 2.3.3 Zeichnen und Verschieben der Referenzlinie .....	39
Abbildung 2.4.1 Prinzip der Polymerasenkettenreaktion .....	45
Abbildung 2.4.2 Übersicht zur Auswertung der qRT-PCR.....	49
Abbildung 3.1.1 T-Zellen im PVS quer und längs angeschnittener Gefäße.....	55
Abbildung 3.1.2 Ergebnisse der qRT-PCR Untersuchung auf Zytokine in den Meningen.....	58
Abbildung 3.2.1 Übersicht über das murine Ventrikelsystem.....	61
Abbildung 3.2.2 Morphologie des murinen Plexus choroideus .....	63
Abbildung 3.2.3 Laterale Anheftungsstelle des murinen Plexus choroideus mit vorhandenen Grenzstrukturen .....	66
Abbildung 3.2.4 Optische Dichte an der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel .....	67
Abbildung 3.2.5 Untersuchung der glialen Grenzstrukturen an der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel .....	70

## 8.2 Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 2.1.1 Klinische Beurteilung der Mäuse .....	24
Tabelle 2.1.2 Dehydrierung von fixiertem Gewebe mit aufsteigender Ethanolreihe .....	26
Tabelle 2.2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung .....	27
Tabelle 2.2.2 Färbeschritte für HE-Färbung.....	28
Tabelle 2.2.3 Dehydrierung nach der HE-Färbung .....	28
Tabelle 2.2.4 Dehydrierung nach der immunhistochemischen Markierung .....	32
Tabelle 2.2.5 Schritte der immunhistochemischen Markierung .....	32
Tabelle 2.2.6 Schritte der Immunfluoreszenzmarkierung .....	35
Tabelle 2.4.1 Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkriptase .....	43
Tabelle 2.4.2 Mastermixzusammensetzung für die PCR .....	46
Tabelle 2.4.3 PCR Programm .....	46
Tabelle 2.4.4 Mastermixzusammensetzung qRT-PCR .....	51
Tabelle 2.4.5 Programm der qRT-PCR .....	51
Tabelle 2.4.6 Verwendete Primer .....	52
Tabelle 3.1.1 Zelldichten bezogen auf die Länge der angeschnittenen Gefäßwand.....	54
Tabelle 3.1.2 Ergebnisse der qRT-PCR Untersuchung der Meningen verschiedener Versuchsgruppen .....	57
Tabelle 3.2.1 Ergebnisse der densitometrischen Auswertung in Zonen in Prozent .....	69
Tabelle 4.2.1 Zusammenfassung von Argumenten für die Immunzellmigrationsroute über das Epithel oder die Anheftungsstelle des Plexus choroideus .....	84
Tabelle 8.3.1 Übersicht über verwendete Chemikalien und Lösungen.....	XXXI
Tabelle 8.5.1 Verwendete primäre Antikörper.....	XXXV
Tabelle 8.5.2 Verwendete sekundäre Antikörper .....	XXXV

### 8.3 Materialien und Chemikalien

Tabelle 8.3.1 Übersicht über verwendete Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller/Firma	Bestellnummer
Agarose Standard	Roth	3810.3
Dexpanthenol	Bayer Vital GmbH	PZN: 01578847
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Chromogen	Dako	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Substrat	Dako	K3468
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth	6335.1
Citronensäure-Monohydrat	Merck	5949-29-1
Chloroform/Trichlormethan	Roth	3313.1
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	Alfa Aesar	A10628
Deckgläser (24x50 mm)	Menzel-Gläser	19 00 02450
Depex	Serva	18243.02
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth	T877.1
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	1.065.801.000
DTT 0,1 M (Kit), Dithiothreitol	Thermo Fisher	28025-021
dNTP Mix 10 nM (Desoxynukleosidtriphosphot)	Bioline	BIO-39044
EAE-Kit (MOG <sub>35-55</sub> )	Hook Laboratories	EK-2110
Easy Ladder I	Bioline	BIO-33045
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth	X986.2
Elite ABC-Kit	VECTASTAIN	PK-6100
Essigsäure (Eisessig)	J.T.Baker	6052
Ethanol 100 %	Walter-CMP	WAL642 6025
Ethanol 50 %, 70 %, 90 %, 96 %	Walter-CMP	WAL641 6025
5x First Strand Buffer (Kit)	Thermo Fisher	28025-021
Fluoroshield™ with DAPI	SIGMA	SLCC1782
Formaldehydlösung 37 %	Merck	1.03999. 1000
Formaldehydlösung 37 %	Roth	7398.4
Futtermehl	Ssniff	V1530-000
Haltungsfutter	Ssniff	V1534-000
Immu-Mount™ – Shandon	Thermo Fisher	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	1.092.490.500
Midori Green Advance	Biozym	MG03

M-MLV Reverse Transkriptase	Thermo Fisher	28025-021
MyTaq Red DNA-Polymerase	Bioline	BIO-21105
Natriumacetat, wasserfrei	Merck	1.062.680.250
Natriumchlorid	Roth	0962.2
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	1.063.461.000
Natronlauge (NaOH)	Merck	1.064.691.000
Normales Eseserum	Sigma Aldrich	D9663
Normales Ziegenserum	Vector	S-1000
Paraffin, 57-60°C	Merck	1.071.589.025
peqGOLD TriFast™	peqLab	30-2010
Pertussis-Toxin in Glycerol	Hook Laboratories	BT-0105
Precellys-Keramik-Kit	peqLab	91-PCS-CK14
Propanol-2 ROTIPURAN ≥99,8 %, p.a., ACS, ISO	Roth	6752.4
Random Primer	Thermo Fisher	48190-011
Ringer Lösung	Braun	3570030
Salzsäure (HCl), 37 %	Merck	1.003.171.000
SensiMix™ SYBR®&Fluorescin KIT	Bioline	QT615-05
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Fisher	J1800AMNZ
5x Taq Reaction Buffer	Bioline	BIO-21108
Tris (PUFFERAN®)	Roth	AE15.2
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (UP H <sub>2</sub> O)	Thermo Fisher	10977
Wassergel	Clear H <sub>2</sub> O	70-01-5022
Wasserstoffperoxid 35 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck	1.086.001.000
Xylazin (Rompun® 2 %)	Bayer	Zul.-Nr. 6293841.00.00
Xylol	J.T.Baker	8118.25



## 8.4 Puffer, Blockseren und Färbelösungen

---

- **Phosphatpufferlösung (engl. Phosphate-buffered-saline, PBS) (10x Lösung):**
  - 400 g Natriumchlorid
  - 10 g Kaliumchlorid
  - 84 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
  - 13,5 g Kaliumdihydrogenphosphat
  - 5000 ml destilliertes Wasser
  - pH-Wert auf 7,4 eingestellt
- **PBS-Puffer (1x Lösung):**
  - 500 ml PBS (10x Lösung)
  - 4500 ml destilliertes Wasser
  - pH-Wert auf 7,4 eingestellt
- **Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer:**
  - 6,05 g Tris
  - 1,85 g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat
  - 5000 ml destilliertes Wasser
  - pH-Wert auf 9,0 eingestellt
- **Citratpuffer:**
  - 11,5 g Citronensäure-Monohydrat
  - 5000 ml destilliertes Wasser
  - pH-Wert auf 6,0 eingestellt
- **Blockserum (1):**
  - Verdünnung 1:20
  - 2,5 ml Normales Eselserum
  - 47,5 ml PBS (1x)
- **Blockserum (2):**
  - Verdünnung 1:20
  - 2,5 ml Normales Ziegenserum
  - 47,5 ml PBS (1x)
- **0,35% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):**
  - Verdünnung 1:100
  - 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 %)
  - 99 ml PBS
- **3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Komplex:**
  - Verdünnung 1:50
  - 20 µl DAB-Chromogen
  - 980 µl DAB-Substrat
- **Fixierlösung:**
  - 4.6 g Natriumdihydrogenphosphat

- 8 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
  - 100 ml Formaldehydlösung 37%
  - 900 ml destilliertes Wasser
  - filtriert und pH-Wert auf 7,4 eingestellt
- **Hämatoxylin-Farblösung:**
  - 250 ml Mayers Hämalaunlösung
  - filtriert
- **Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC-Komplex)**
  - 2400 µl PBS
  - 50 µl Reagenz A
  - 50 µl Reagenz B
- **Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (10x Lösung)**
  - 96,88 g Tris Pufferan
  - 22,84 ml 100%ige Essigsäure
  - 40 ml 0,5 M-EDTA
  - aufgefüllt auf 2 l mit destilliertem Wasser
  - pH-Wert auf 8,0 eingestellt
- **TAE-Puffer (1x Lösung)**
  - 200 ml TAE (10x Lösung)
  - 1800 ml destilliertes Wasser
- **0,5M EDTA**
  - 186 g EDTA
  - 1 l destilliertes Wasser
  - pH-Wert auf 8,0 eingestellt

## 8.5 Verwendete Antikörper

**Tabelle 8.5.1 Verwendete primäre Antikörper**

Antikörper	Klonalität	Verdünnung	HIER	Spezies	Katalog-Nr.	Firma
<i>im Rahmen dieser Arbeit etablierte primäre Antikörper</i>						
Laminin	poly	1:300	Tris/EDTA	Kaninchen	ab11575	Abcam
AQP1	mono	1:600	Citrat/ Tris/EDTA	Maus	ab9566	Abcam
<i>im Rahmen dieser Arbeit genutzte primäre Antikörper</i>						
CD3	mono	1:250	Tris/EDTA	Ratte	ab11089	Abcam
IBA1	poly	1:5000	Tris/EDTA	Kaninchen	019- 19741	Wako
GFAP	poly	1:4000	Tris/EDTA	Hühnchen	ab4674	Abcam
Vimentin	mono	1:200	Tris/EDTA	Kaninchen	ab92547	Abcam

**Tabelle 8.5.2 Verwendete sekundäre Antikörper**

Ziel	Herkunft	Konjugat	Konzentration	Katalog-Nr.	Firma
Hase	Esel	Alexa Fluor™ 488	1:250	ab150065	Abcam
Ratte	Esel	Alexa Fluor™ 594	1:250	ab150156	Abcam
Maus	Esel	Alexa Fluor™ 594	1:250	A21203	Thermo Fisher
Hühnchen	Esel	Cy™2	1:250	703-225- 155	Jackson Immuno Research Laboratories
Kaninchen	Ziege	Biotin	1:200	Vector BA 1000	Vector Laboratories

## 8.6 EAE-Scores Tierversuch

	interne Tier Nr.	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14	Tag 15	Tag 16
EAE	7864	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7865	0	0	0	0	0	0	0	1	2
	7866	0	0	0	0	1	2			
	7867	0	0	0	0	0	0	1		
	7868	0	0	0	0	0	1	1		
Cup/EAE	7869	1	1	2,5	2,5	2,5	2			
	7870	0	0	0	0	0	1	1	2	2,5
	7871	0	0,5	1	1	1	2	2,5		
	7872	1	1	1	1	1	1,5	1	1	
	7873	0	0	1	1	2	2,5			

Je zwei Tiere pro Versuchsgruppe wurden zusammengeführt, um eine möglichst große Menge an RNA zu erhalten. Aus organisatorischen Gründen konnten nur zwei Tiere pro Tag perfundiert werden. Dabei wurden die Tiere nach Höhe ihres EAE-Scores an verschiedenen Tagen perfundiert. Je ein Tier pro Gruppe wurde einzeln mitgeführt.

Die Paare sind:

- > 7866 & 7864
- > 7867 & 7868
- > 7873 & 7869
- > 7871 & 7872

## 9 Danksagung

---

An erster Stelle möchte ich dem Themenvergebenden und meinem Doktorvater Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, für eine herausragende Betreuung und großartige Förderung im Rahmen dieser Arbeit und bei Projekten darüber hinaus danken.

Für die unkomplizierte, persönliche und fachliche Betreuung und der Hilfe zur inhaltlichen Ausarbeitung dieser Arbeit möchte ich Dr. rer. hum. Sarah Joost danken, durch die ich über die gemeinsame Zeit im Büro viel lernen konnte. Für die Einarbeitung in laborexperimentelle Methoden möchte ich Dr. rer. nat. Jiangshan Zhan und Dr. med. Hannes Kaddatz danken.

Ein großer Dank gilt meinem Vater Götz Greiner, für die Erstellung der ImageJ Macros, ohne die die Auswertung und die Ergebnisse dieser Arbeit nicht machbar gewesen wären.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Anatomie für die ausdauernde Hilfsbereitschaft und Geduld bei laborexperimentellen und praktischen Fragen. Für die umfangreiche technische Unterstützung danke ich Frau Susann Lehmann und Frau Frauke Winzer.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die sprachlichen Korrekturen dieser Arbeit und die unbegrenzte immerwährende Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Zeit im Labor danken.

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

---

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)

## 11 Lebenslauf

---

### Persönliches

Name: Theresa Greiner  
Geburtstag: 04.01.1998  
Geburtsort: Rostock  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Anschrift: Greifswalder Str 8; 18057 Rostock

### Akademischer Werdegang

2016 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,1)  
Christophorusgymnasium Rostock  
seit 2016 Studium der Humanmedizin an der Universitätstmedizin  
Rostock  
2018 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2022 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
November 2022 Beginn des Praktischen Jahres

### Wissenschaftliche Nebentätigkeit

seit 2020 Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie,  
Universitätsmedizin Rostock  
2021 Tutor im anatomischen Präparierkurs

### **Wissenschaftliche Arbeiten**

Zhan J, Yakimov V, Rühling S, Fischbach F, Nikolova E, Joost S, Kaddatz H, **Greiner T**, Frenz J, Holzmann C, Kipp M. High Speed Ventral Plane Videography as a Convenient Tool to Quantify Motor Deficits during Pre-Clinical Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cells*. 2019 Nov 14;8(11):1439. doi: 10.3390/cells8111439.

Rohr S, **Greiner T**, Joost S, Amor S, van der Valk P, Schmitz C, Kipp M. Aquaporin-4 Expression during Toxic and Autoimmune Demyelination; *Cells* 2020 Sep 28;9(10):2187. doi: 10.3390/cells9102187.

Kaddatz H, Joost S, Nedelcu J, Chrzanowski U, Schmitz C, Gingele S, Gudi V, Stangel M, Zhan J, Santrau E, **Greiner T**, Frenz J, Müller-Hilke B, Müller M, Amor S, van der Valk P, Kipp M. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia*. 2021 Apr;69(4):925-942. doi: 10.1002/glia.23937.

**Greiner T**, Kipp M; What guides peripheral immune cells into the central nervous system. *Cells* 2021 Aug 10;10(8):2041. doi: 10.3390/cells10082041.

Vankriekelsvenne E; Chrzanowski U; Manzhula K; **Greiner T**; Wree A; Hawlitschka A; Llovera G; Zhan J; Joost S; Schmitz C; Ponsaerts P; Amor S; Nutma E; Kipp M; Kaddatz H. Transmembrane protein 119 is neither a specific nor a reliable marker for microglia. *Glia*. 2022 Feb 17; doi: 10.1002/glia.24164.

**Greiner T**, Manzhula K, Baumann L, Kaddatz H, Runge J, Keiler J, Kipp M, Joost S; Morphology of the murine choroid plexus: Attachment regions and spatial relation to the subarachnoid space. *Front Neuroanatomy*. 2022 Oct 31; doi: 10.3389/fnana.2022.1046017.

Theresa Greiner  
Rostock den 05.03.2023