

Aus dem Institut für Anatomie

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

Untersuchung glialer Barrierestrukturen und der Migration lymphatischer Zellen an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*

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

Vorgelegt von
Katerina Manzhula | geb. am 12.06.1999
aus Rostock | 2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005527

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

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

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling – Institut für Physiologie, Universitätsmedizin
Rostock

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Barbara M. Braunger – Institut für Experimentelle
Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Jahr der Einreichung: 2024

Jahr der Verteidigung: 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.2 Das Zentralnervensystem als immunologisch spezialisierter Raum	2
1.2.1 Immunologische Aspekte der Multiplen Sklerose.....	2
1.2.2 Die Blut-Hirn-Schranke	4
1.2.3 Gliale Barrieren.....	5
1.2.4 Lymphozytäre Migrationsrouten in das Hirnparenchym.....	6
1.2.5 Die Blut-Liquor-Schranke	7
1.3 Immunzellrekrutierung über den <i>Plexus choroideus</i>	8
1.4 Verwendete Tiermodelle	10
1.4.1 Das Cuprizone-Modell	10
1.4.2 Das Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis-Modell.....	11
1.4.3 Das kombinierte Cuprizone/Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis Modell ...	12
1.5 Fragestellungen der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Tierexperimente und Experimentgruppen	14
2.1.1 Cuprizone/Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis-Gruppe.....	14
2.1.2 Kontrollgruppe	15
2.1.3 Klinische Beurteilung der Mäuse.....	16
2.1.4 Transkardiale Perfusion und Gewebeentnahme.....	17
2.1.5 Transkardiale Perfusion für die Elektronenmikroskopie	18
2.1.6 Einbettung und Schnittanfertigung	18
2.2 Histologie und Immunhistologie	21
2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	21
2.2.2 Toluidinblau-Färbung.....	22
2.2.3 Prinzip der Immunhistochemie	23
2.2.4 Durchführung der immunhistochemischen Markierung	24
2.2.5 Prinzip der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung.....	28
2.2.6 Durchführung einer Immunfluoreszenzdoppelmarkierung	29
2.2.7 Negativkontrollen und Kreuzkontrollen einer Immunfluoreszenzdoppelmarkierung	30
2.2.8 Isotypkontrolle und ihre Durchführung	31
2.3 Genexpressionsanalysen	32
2.3.1 Gewebeaufbereitung.....	32
2.3.2 RNA-Isolation.....	33

2.3.3 Reverse Transkription und cDNA-Amplifikation.....	35
2.3.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion	38
2.4 Auswertung.....	41
2.4.1 Untersuchte Hirnregion	41
2.4.2 Auswahl der Hirnregionen für Genexpressionsanalysen.....	41
2.4.3 Auswertung Histologie.....	42
2.4.4 Quantifizierung der optischen Dichte.....	42
2.4.5 Quantifizierung der Zelldichte.....	44
2.4.6 Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung.....	46
2.4.7 Quantifizierung der Genexpression.....	47
2.4.8 Statistische Auswertung und graphische Darstellung	47
3. Ergebnisse.....	48
3.1 Charakterisierung der Anheftungsstelle des <i>Plexus choroideus</i>	48
3.2 Charakterisierung der glialen Barriere	49
3.2.1 Astrozytäre Barriere	49
3.2.2 Immunologische Barriere.....	53
3.2.3 Ultrastrukturelle Morphologie der Anheftungsstelle des <i>Plexus choroideus</i>	54
3.2.4 Topographisches Verhältnis astrozytärer und Laminin-haltiger Strukturen.....	56
3.2.5 Genexpressionsanalyse der Anheftungsstelle des <i>Plexus choroideus</i>	57
3.3 Rekrutierung von Immunzellen im Cuprizone/Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis – Modell.....	59
3.3.1 Immunzell-Dichte in periventrikulären Regionen	59
3.3.3 Gefäßdichte und prä- und postkapilläre Strukturen an der Anheftungsstelle.....	60
3.4 Charakterisierung der Anheftungsstelle im Cup/EAE-Modell.....	62
3.4.1 Gliale Barrieren im Cup/EAE-Modell	62
3.4.2 Vergleich der glialen Barriere zwischen Kontrollgruppe und Cup/EAE-Gruppe	65
4. Diskussion.....	67
4.1 Diskussion der angewandten Methoden.....	67
4.1.1 Diskussion der angewandten Tiermodelle.....	67
4.1.2 Histologische Untersuchungsmethoden.....	69
4.1.3 Genexpressionsanalysen.....	70
4.1.3 Quantifizierung der optischen Dichte, Zelldichte und Gefäßdichte	71
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	71
4.2.1 Eine gliale Barriere an der Anheftungsstelle des <i>Plexus choroideus</i>	72
4.2.2 Die Anheftungsstelle des <i>Plexus choroideus</i> als Migrationsroute für Immunzellen	76
5. Schlussfolgerung	81

Inhaltsverzeichnis

6. Thesen	82
7. Literatur	VI
8. Anhang	XX
8.1 Abbildungsverzeichnis	XX
8.2 Tabellenverzeichnis	XXI
8.3 Materialien und Chemikalien	XXII
8.4 Puffer, Blockseren und Färbelösungen	XXIV
9. Danksagung	XXVI
10. Eidesstaatliche Erklärung	XXVII
11. Wissenschaftlicher Lebenslauf	XXVIII

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AG	Antigen
AK	Antikörper
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
CC	<i>Corpus callosum</i>
CCL2	α -Chemokinligand 2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CLDN1	Claudin 1
CT	Schwellenwertzyklus (engl. <i>threshold cycle</i>)
Cup	Cuprizone
Cup/EAE	kombiniertes Cuprizone und EAE-Modell
Cx43	Connexin 43
CXCL10	β -Chemokine Ligand 10
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
engl.	englisch
et al.	et alia
F	Fluorochrom
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FFPE-Material	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes-Material
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIER	Demaskierung (engl. <i>heat induced epitope retrieval</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IBA1	ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül 1 (engl. <i>Ionized calcium binding adapter molecule-1</i>)

Abkürzungsverzeichnis

ICAM1	Interzellulär-Adhäsionsmolekül 1 (engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL-8	Interleukin-8
JAM1	junktionale Adhäsionsmolekül 1
LAMB1	Laminin Untereinheit-beta 1 (engl. <i>laminin subunit beta-1</i>)
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MMP	Metallo-Matrixproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MOG ₃₅₋₅₅	Myelin-Oligodendrozyten-Protein 35-55
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphatpufferlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PTX	Pertussis-Toxin
PPMS	primär-progressiv MS
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
RIN	RNA-Integritätsnummer (engl. <i>RNA Integrity Number</i>)
ROI	<i>region of interest</i>
RR	Referenzregion
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. <i>relapsing-remitting MS</i>)
SAR	Subarachnoidalraum
SD	Standardabweichung (engl. <i>Standard Deviation</i>)
SFO	Subfornikal-Organ
SPMS	sekundär-progressiv MS (engl. <i>secondary-progressive MS</i>)
SQ	<i>Starting Quantity</i>
Tab.	Tabelle
TJ	Tight junction
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
VCAM1	Gefäßzelladhäsionsmolekül 1 (engl. <i>vascular adhesion molecule 1</i>)
w	Wochen
WTA	<i>Whole Transcriptome Amplification</i>

Abkürzungsverzeichnis

ZNS	Zentralnervensystem
α -SMA	α -glattes Muskel Actin (engl. <i>alpha-smooth muscle actin</i>)

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine inflammatorische, chronisch-degenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die histopathologisch durch fokale Entzündungsherde charakterisiert ist. Die Pathogenese der MS ist weitestgehend ungeklärt. Komplexe Interaktionen von genetischen und umweltbedingten Faktoren scheinen eine Rolle zu spielen [1]. Die MS ist durch ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen geprägt, bei dem es zu axonalen Schädigungen kommt, die bereits im Frühstadium zu neurologischen und kognitiven Störungen führen [2].

Weltweit sind circa 2,5 Millionen Menschen an MS erkrankt [3]. Die Entzündungsherde zeigen in ihrer Lokalisation eine deutliche Heterogenität, aus der sich unterschiedliche neurologische Symptome ableiten lassen. Aus dem Untergang von Myelin-bildenden Oligodendrozyten resultieren Symptome wie Muskelschwäche oder -lähmung, Spastiken, Parästhesien sowie vegetative Störungen [4]. Um möglichst frühe und sichere Diagnosen zu ermöglichen, werden verschiedene Diagnosekriterien in den 2017 aktualisierten McDonald-Kriterien zusammengefasst [5]. Dabei erfolgt eine phänotypische Aufteilung in zwei Kernaspekte der MS, in den inflammatorischen Phänotyp (schubförmig-remittierend) und den neurodegenerativen Phänotyp (progredient).

Die schubförmig-remittierende MS (engl. *relapsing-remitting MS*, RRMS) betrifft mit circa 85% den größten Teil der Patienten und ist definiert durch akute Schübe mit folgenden kompletten oder inkompletten, klinisch stabilen Erholungsphasen (Abb. 1) [5]. Ein akuter Schub zeichnet sich durch entzündlich demyelinisierende Herde im ZNS aus, welche 24 Stunden in Abwesenheit von Fieber und Infektion persistieren müssen [6]. Mit Hilfe der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) werden zeitlich und örtlich disseminierte Läsionen nachgewiesen [7]. Nach einem initial schubförmig-remittierenden Verlauf kann die MS in einen progredienten Verlauf ohne Erholungsphasen übergehen (engl. *secondary-progressive MS*, SPMS). Dies betrifft, 15 bis 20 Jahre nach der Erstdiagnose RRMS, circa 40% der Patienten [8]. Ein progredienter Verlauf ist durch eine sukzessive Verschlechterung der neurologischen Funktionsfähigkeit gekennzeichnet. Tritt ein progredienter Verlauf zu Beginn des Krankheitsgeschehens ein, wird dies als primär-progrediente MS (engl. *primary-progressive MS*, PPMS) bezeichnet. Hiervon sind circa 15% aller MS-Patienten betroffen [9]. Der Verlauf variiert dabei interindividuell in der Geschwindigkeit der Symptomverschlechterung als auch in der Stabilität neurologischer Funktionsverluste. Sind bei der Erstpräsentation eines Patienten mit klinischer MS-Symptomatik die McDonald-Kriterien nicht erfüllt, spricht man von einem klinisch isolierten Syndrom [10]. Die häufigsten Prodromalsymptome sind Hirnstamm- und Rückenmarkssymptome oder Sehstörungen [11].

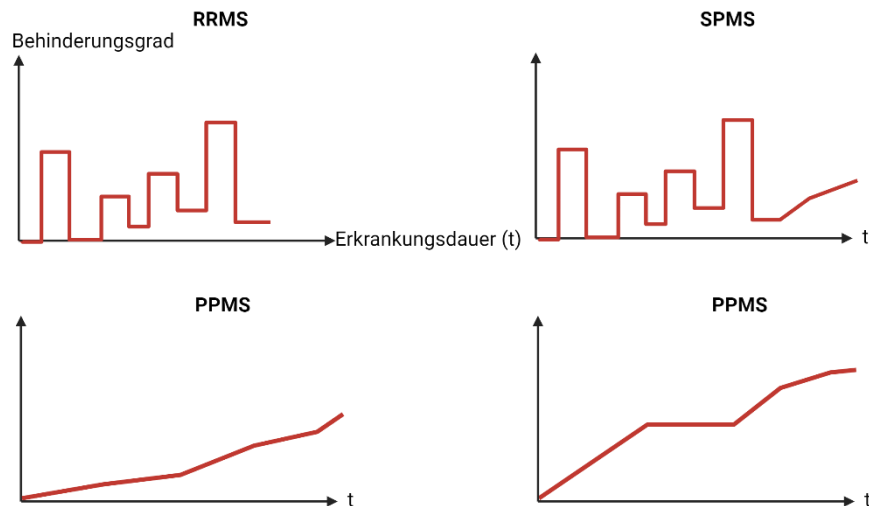


Abbildung 1: MS-Klassifikationen. Die schubförmig-remittierende MS (engl. relapsing-remitting MS, RRMS) ist durch akute Schübe mit kompletten oder inkompletten, klinisch stabilen Erholungsphasen definiert. Nach einem initial schubförmig-remittierenden Verlauf kann die MS in einen progredienten Verlauf ohne Erholungsphasen übergehen (engl. secondary-progressive MS, SPMS). Tritt ein progredienter Verlauf zu Beginn des Krankheitsgeschehens auf, spricht man von einer primär-progredienten MS (engl. primary-progressive MS, PPMS), welche mit unterschiedlicher Progression ablaufen kann.

Aufgrund der weitestgehend ungeklärten Pathogenese der MS und unzureichend wirksamer Medikamente insbesondere in der progressiven Phase der MS besteht ein großer Bedarf an der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze [12-14]. Hierfür ist ein tiefgreifendes Verständnis der anatomisch-mikroskopischen Gegebenheiten und immunologischen Prozesse der MS essentiell.

1.2 Das Zentralnervensystem als immunologisch spezialisierter Raum

Im physiologischen Zustand ist das ZNS ein immunologisch spezialisierter Raum [15]. Das bedeutet, dass die Immunregulationsmechanismen des ZNS nicht den immunologischen Prozessen anderer Körperregionen entsprechen. Das ZNS und das Immunsystem kommunizieren eher zweiseitig. Bei der Entstehung des immunologisch spezialisierten Raumes spielen Grenzflächen zum Gehirn eine wesentliche Rolle. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und die Blut-Liquor-Schranke (BLS) trennen das Hirnparenchym von der zellulären Zirkulation und sorgen für einen stark reduzierten immunologischen Austausch. Unter inflammatorischen Prozessen im ZNS, wie sie bei der MS stattfinden, nimmt die Funktionsfähigkeit dieser Grenzflächen ab [16]. Für eine vertiefende Betrachtung wird zunächst auf immunologische Aspekte des ZNS und der MS eingegangen, anschließend werden die Grenzstrukturen und lymphozytären Migrationsrouten erläutert.

1.2.1 Immunologische Aspekte der Multiplen Sklerose

MS-Läsionen bestehen hauptsächlich aus perivaskulären und parenchymalen Infiltraten von Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten. Den Großteil der Lymphozyten bilden die T-Lymphozyten, wohingegen B-Lymphozyten nur ein Zehntel des lymphozytären Anteils ausmachen [17].

T-Lymphozyten sind ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems und reifen in einem der primär lymphatischen Organe, dem Thymus. Im Thymus durchlaufen die T-Lymphozyten eine Prägung und Differenzierung. Sie lassen sich anhand ihrer Oberflächenmerkmale und Funktion (engl. *Cluster of Differentiation*, CD) in zwei große Subpopulationen unterteilen [18]. Dabei werden $CD4^+$ T-Helferzellen von zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen unterschieden. Nach der Differenzierung werden die naiven T-Lymphozyten über den Blutkreislauf zu sekundär lymphatischen Organen wie den Lymphknoten transportiert. Dort können sie durch Antigenpräsentation und Kostimulation über andere Zellen aktiviert werden. Der erste Kontakt von naiven T-Lymphozyten mit ZNS-spezifischen Antigenen scheint nach Weller *et al.* in den tiefen zervikalen Lymphknoten stattfindet [19, 20]. Für die Antigenpräsentation benötigt eine Zelle Antigen-präsentierende Oberflächenkomplexe, sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complex*, MHC). Jede kernhaltige Zelle exprimiert MHC Typ I und kann zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen aktivieren. Zu den speziellen Antigen-präsentierenden Zellen gehören Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, B-Zellen sowie Mikrogliazellen, welche über MHC Typ II $CD4^+$ T-Helferzellen Antigene präsentieren und sie dadurch aktivieren können. Nach der Antigenpräsentation und Kostimulation kann ein T-Lymphozyt ein Antigen spezifisch erkennen. Sobald diese Antigenspezifität erreicht ist, können T-Lymphozyten mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen über die BHS migrieren und im ZNS persistieren [21, 22]. Bei inflammatorischen Ereignissen wie der MS wird die Integrität der BHS, über die wahrscheinlich der größte Teil der Immunzellrekrutierung erfolgt, gestört [23]. Einige Studien deuten darauf hin, dass initiale Myelin-Schäden als eine Ursache für die Immunzellrekrutierung und somit für die Entstehung von MS-Läsionen in Frage kommen [24, 25]. Neben der Immunzellrekrutierung sorgen Myelin-Schäden auch für die Aktivierung ZNS-spezifischer Abwehrmechanismen, an denen die Mikrogliazellen beteiligt sind [26].

Mikrogliazellen nehmen als Teil des angeborenen Immunsystems des ZNS eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS ein. Sie zeigen in initialen und früh aktiven Läsionen eine dominante Expression von proinflammatorischen Markern, die an der Phagozytose, der Antigenpräsentation und an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind [26, 27]. Aktivierte Mikrogliazellen sezernieren unter anderem Chemokine wie Interleukin-8 (IL-8) oder CXCL10, die die Rekrutierung von T-Lymphozyten, weiteren Antigen-präsentierenden Makrophagen und dendritischen Zellen fördern [26, 28]. Sie begünstigen zudem die proinflammatorische Aktivität von weiteren Gliazellen, den Astrozyten [29]. Es kommt zu einer reaktiven Hypertrophie der Fortsätze und Somata der Astrozyten, die in einer Astroglie resultieren [30].

1.2.2 Die Blut-Hirn-Schranke

Die BHS bildet eine circa 5000-fach größere Fläche als die BLS und übernimmt den Hauptteil der Erhaltung des zerebralen Milieus [31]. Sie befindet sich in unterschiedlicher Ausprägung im gesamten zerebralen Kapillarbett sowie an den post-kapillären Venolen [32]. Die BHS nimmt eine physikalische Barrierefunktion ein. Sie schützt das Hirnparenchym unter anderem vor Antikörpern und Zellen und schafft so das oben genannte zerebrale Milieu [31, 33]. Für die Integrität der BHS sind fünf Komponenten entscheidend: das Kapillarendothel, endotheliale Tight Junctions, die endotheliale Basalmembran sowie die astrozytäre Endfüße und die astrozytäre Basalmembran [34]. Die einschichtige, nicht-fenestrierte Endothelzellschicht der Kapillare ist jeweils über Tight Junctions miteinander verbunden, sodass eine unkontrollierte parazelluläre Diffusion stark verringert wird [34–36]. Wichtige Bestandteile von Tight Junctions sind Claudine und junktionale Adhäsionsmoleküle. Beispiele hierfür sind Claudin 1 (CLDN1) und das junktionale Adhäsionsmolekül 1 (JAM1) [37, 38]. Eine weitere wichtige Schutz-Komponente der BHS stellen die Astrozyten dar. Astrozyten sind sternförmige Stützzellen und lagern sich mit einer Basalmembran und ihren Endfüßen an etwa 99% der intrakraniellen Gefäße an [39].

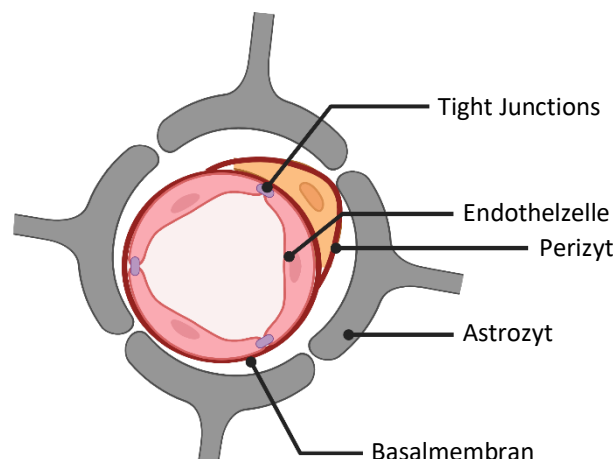


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) an einer Kapillare. Die BHS wird von der Gefäß-Endothelzellschicht mit Tight Junctions (TJ), einer gemeinsamen Basalmembran mit Perizyt und Astrozyten-Endfüßen gebildet.

Die Basalmembran ist ein typisches Merkmal eines Epithelverbandes. Sie besteht aus verschiedenen extrazellulären Matrixbestandteilen, an denen sich die Zellen verankern und vom restlichen Gewebe abgrenzen. In den meisten Fällen besteht eine Basalmembran aus einer Basallamina und einer *Lamina fibroreticularis*, wobei die Basallamina der Verankerung der Endothelzellen oder Astrozyten dient und hauptsächlich aus Kollagen Typ IV und Laminin besteht [40]. Ein zentraler molekularer Bestandteil von Laminin ist die Laminin Untereinheit-beta 1 (engl. *laminin subunit beta-1*, LAMB1) [41]. Die *Lamina fibroreticularis* verankert die Basallamina am umgebenden Gewebe und besteht hauptsächlich aus einem Geflecht von retikulären Fasern. Zur beidseitigen Verankerung sind weitere Fibrillen und Anker-Moleküle notwendig, welche in

Abbildung 3 detaillierter aufgeführt sind. Die Astrozyten bilden zusammen mit der Basalmembran eine gliale Barriere, die *Membrana limitans gliae perivascularis*, und erfüllen eine mechanische Schutzfunktion [42]. Im Kapillarbett verschmelzen die vaskuläre endotheliale Basalmembran und die astrozytäre Basalmembran zu einer gemeinsamen Grenzstruktur.

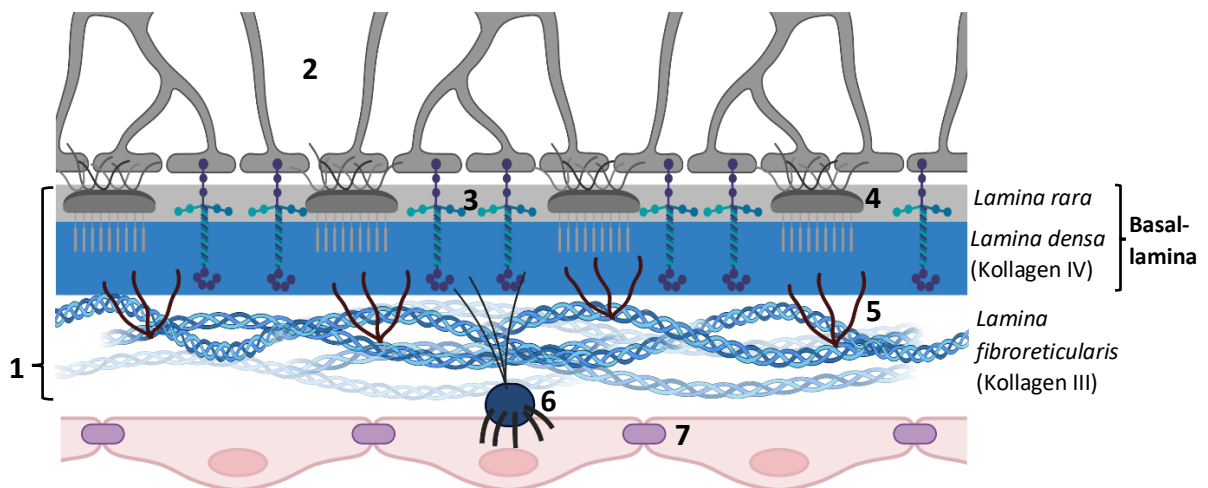


Abbildung 3: *Membrana limitans gliae perivascularis*. Die Basallamina besteht aus einer Lamina rara und Lamina densa, zusammen mit der Lamina fibroreticularis bilden sie die Basalmembran. 1. Basalmembran; 2. Astrozyten-Endfüße; 3. Laminin; 4.-6. Anker-Moleküle: 4. Hemidesmosomen; 5. Mikrofibrillen; 6. Verankerungspalte mit Kollagen IV; 7. Endothelzellschicht eines Gefäßes mit Tight Junctions. Astrozyten-Endfüße und Basalmembran bilden eine gliale Barriere. Abbildung modifiziert nach Welsch: Sobotta Lehrbuch Histologie 2.A Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH

1.2.3 Gliale Barrieren

Weiterhin bilden Astrozyten an der Oberfläche des Hirnparenchyms eine gliale Barriere, die *Membrana limitans gliae superficialis* (Abb. 4). Hier lagern sie sich mit ihrer Basalmembran und ihren Endfüßen direkt an der innersten Hirnhautschicht, der *Pia mater*, an [43]. Beim Eintritt von Blutgefäßen in das Hirnparenchym schlägt sich die *Membrana limitans gliae superficialis* um die Blutgefäße und setzt sich als *Membrana limitans gliae perivascularis* fort [44, 45]. Zwischen der vaskulären endothelialen Basalmembran und der astrozytären Basalmembran entsteht im Bereich der Gefäßpenetration ein perivaskulärer Spaltraum, der sich mit Ausnahme der Kapillare um die Blutgefäße zieht [46].

Im Bereich der Ventrikelräume des Gehirns finden sich unpaare vaskularisierte Strukturen, deren Kapillaren keine BHS aufweisen und aufgrund ihres fenestrierten Endothels für kleine Moleküle durchlässig sind [47, 48]. Eines dieser sogenannten zirkumventrikulären

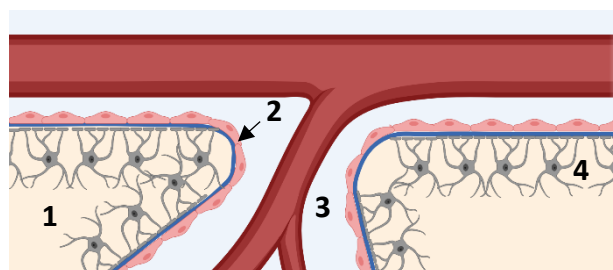


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines penetrierenden Gefäßes. Bei der Penetration in das Hirnparenchym (1) schlägt sich die Pia mater (2) um das Gefäß. Es entsteht ein perivaskulärer Spaltraum (3). An die Pia mater lagert sich die *Membrana limitans gliae superficialis* (4).

Organe ist das Subfornikalorgan (SFO) [49]. Neben Neuronen enthält das SFO ein dichtes Netzwerk

von Tanyzyten, welche spezialisierte Gliazellen sind [50, 51]. Die Tanyzyten bilden, ähnlich wie die Astrozyten, eine Diffusionsbarriere zum Hirnparenchym und unterscheiden sich morphologisch von Astrozyten durch einen einzelnen Fortsatz, der bis zu 500 µm lang sein kann [52].

1.2.4 Lymphozytäre Migrationsrouten in das Hirnparenchym

Trotz der genannten Barriereigenschaften ist es aktivierten Lymphozyten unter inflammatorischen Bedingungen möglich, die BHS zu überwinden. Diese Migrationsroute ist gut untersucht und findet auf Höhe post-kapillärer Venolen statt. Sie verläuft über den perivaskulären Spaltraum und weiter über die *Membrana limitans gliae perivascularis* in das Hirnparenchym (Abb. 5) [46]. Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es lokal zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auf der apikalen Seite des Gefäßendothels [53]. Eines der wichtigen Adhäsionsmoleküle ist hierbei das Gefäßzelladhäsionsmolekül 1 (engl. *vascular adhesion molecule 1*, VCAM1) [54]. Nach der Interaktion der T-Lymphozyten mit den Adhäsionsmolekülen haften diese am Endothel intrakranieller Gefäße und überqueren dieses schließlich [55]. Bestandteile der extrazellulären Matrix, sogenannte Matrix-Metalloproteasen (MMP), sind zusätzlich an der Barrierefunktionsstörung der BHS beteiligt [56]. Insbesondere MMP2 und 9 werden durch proinflammatorische Zytokine und Chemokine aktiviert und zerstören proteolytisch Basalmembranbestandteile und Tight Junctions [56, 57]. Eine Migration der T-Lymphozyten über eine endotheliale Basalmembran oder eine gliale Barriere in das Hirnparenchym wird so ermöglicht.

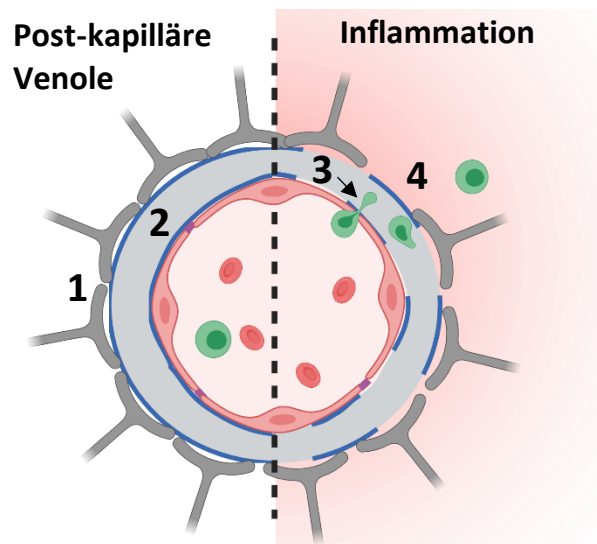


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer post-kapillären Venole im physiologischen und inflammatorischen Zustand. 1. *Membrana limitans gliae perivascularis* 2. Perivaskulärer Spalt zwischen Basalmembranen (blau) 3. Migrierender T-Lymphozyt (grün) durch aufgelockerte BHS und den perivaskulären Spalt 4. Aufgelockerte *Membrana limitans gliae perivascularis*.

Im Bereich oberflächlicher Gefäße der Hirnhäute können T-Lymphozyten nach Überquerung des Gefäßendothels direkt über die *Pia mater* und die *Membrana limitans gliae superficialis* in das Hirnparenchym migrieren. Eine weitere Möglichkeit ist, nach Überquerung des Gefäßendothels eines oberflächlichen Gefäßes vorerst in den perivaskulären Spaltraum eines penetrierenden

Gefäßes zu migrieren (Abb. 4) und anschließend über die *Membrana limitans gliae superficialis* in das Hirnparenchym zu gelangen [32, 55]. T-Lymphozyten können in das Hirnparenchym gelangen ohne die BHS oder die *Membrana limitans gliae superficialis* zu überqueren. Eine Möglichkeit stellt hierzu die Migration über die Blut-Liquor-Schranke des *Plexus choroideus* und das Ventrikelsystem des Gehirns dar. Im Folgenden wird näher auf die Funktion des *Plexus choroideus* und seine Rolle in der Immunzellrekrutierung eingegangen.

1.2.5 Die Blut-Liquor-Schranke

Die BLS wird, im Gegensatz zur BHS, vom Epithel des *Plexus choroideus* gebildet [58]. Der *Plexus choroideus* stellt ein arteriovenöses Gefäßkonvolut dar, welches in die Ventrikelräume des Gehirns ragt. Insgesamt enthält ein intaktes Gehirn vier Ventrikel, von denen jeder über einen *Plexus choroideus* verfügt und mit einer einschichtigen Ependymzellschicht ausgekleidet ist [59]. Die Ependymzellen sind über Gap Junctions verbunden und besitzen im Vergleich zum Plexusepithel keine Basalmembran [60, 61]. Gap Junctions bestehen aus Connexinen, beispielsweise Connexin 43 (Cx43) [62]. Eine der wichtigsten Aufgaben des *Plexus choroideus* ist die Produktion des *Liquor cerebrospinalis*, mit dem die Ventrikelräume gefüllt sind. Der paarige Seitenventrikel, der dritte Ventrikel sowie der vierte Ventrikel sind miteinander verbunden und bilden ein inneres Ventrikelsystem. Die *Plexus choroidei* der Seitenventrikel ziehen sich durch die *Foramina interventricularia* in den dritten Ventrikel, wobei diese sich der Wand der *Foramina* anlagern [63]. Der *Plexus choroideus* des dritten Ventrikels liegt zentral am Dach des Ventrikels unmittelbar hinter dem SFO [64]. Über die exakte Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* an das Hirnparenchym im dritten Ventrikel im humanen und murinen Gehirn ist bislang wenig bekannt.

Aus histologischer Sicht besteht der *Plexus choroideus* aus Gefäßen, die in einem Plexusstroma und einem Plexusepithel eingebettet sind. Das Endothel der Kapillare ist fenestriert, sodass das Blutplasma in das Plexusstroma gelangen kann [65]. Das einschichtige, kubische Plexusepithel ist durch eine Basalmembran vom Plexusstroma abgegrenzt und an den apikalen Zellpolen über Tight Junctions verbunden [58, 66]. Über die Tight Junctions, die die Barrierefunktion erfüllen, wird das Plasma ultrafiltriert und so ein Teil des *Liquor cerebrospinalis* produziert [67, 68]. Der *Liquor cerebrospinalis* zirkuliert über das innere Ventrikelsystem in den äußeren Liquorraum und den *Canalis spinalis* des Rückenmarks, um dort erneut vom venösen Gefäßsystem resorbiert zu werden [69]. Der äußere Liquorraum bildet sich aus einem Spaltraum der Hirnhäute, dem Subarachnoidalraum. In diesem Subarachnoidalraum befinden sich die oberflächlichen Gefäße, die der *Pia mater* aufsitzen (Kapitel 1.2.3). Über den Subarachnoidalraum steht der Liquor in Verbindung zum perivaskulären Spalt penetrierender Gefäße, der ebenfalls mit Liquor gefüllt ist. Neben der Liquorproduktion erfüllt der *Plexus choroideus* weitere Aufgaben wie beispielsweise eine

Liquor-Entgiftungsfunktion über aktive Transportprozesse auf Höhe des Plexusepithels [70, 71]. Weiterhin nimmt der *Plexus choroideus* einen immunologischen Stellenwert ein, auf den im nächsten Kapitel eingegangen wird.

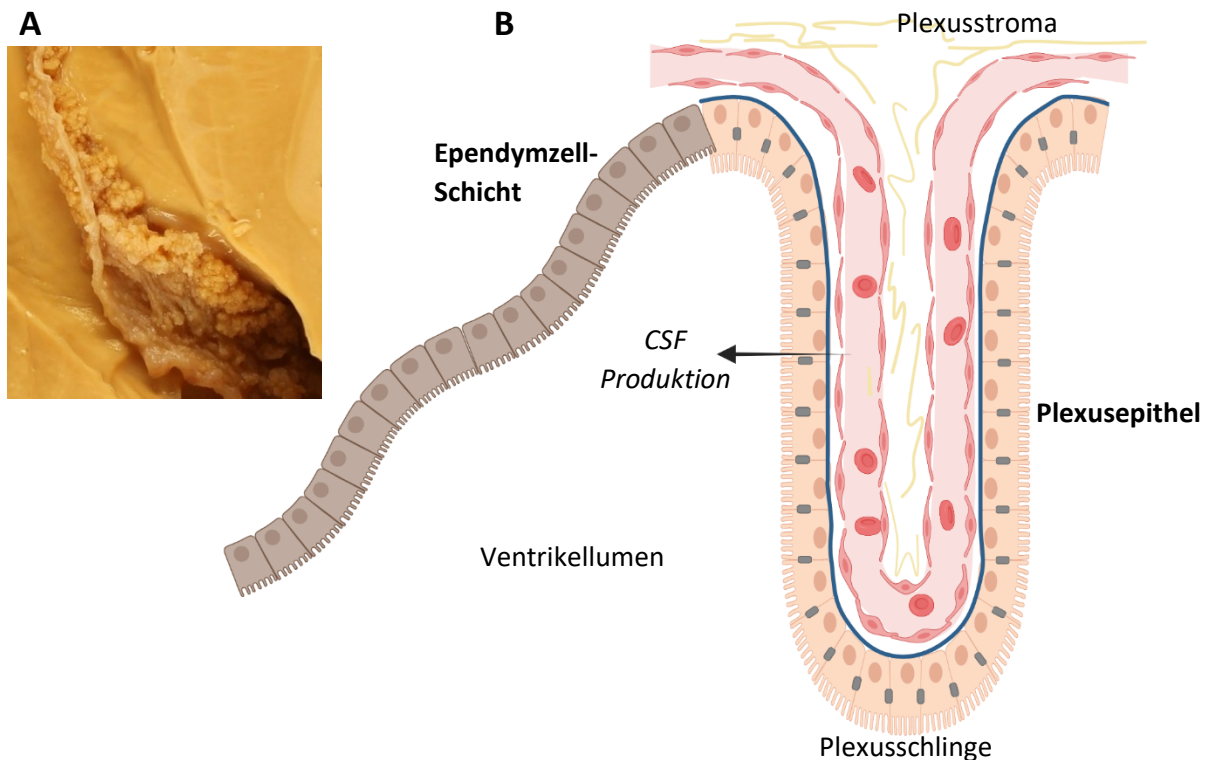


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Plexus choroideus und der Blut-Liquor-Schranke (BLS). (A) Photographische Abbildung eines humanen Plexus choroideus des lateralen Ventrikels. (B) Die Plexusschlinge ragt in das Ventrikellumen. In der Plexusschlinge befindet sich ein fenestriertes arteriovenöses Gefäß, dessen Plasma über das Plexusstroma und Plexusepithel ultrafiltriert wird. Das kubische Plexusepithel besitzt eine Basalmembran (blau) sowie Tight Junctions (grau) und bildet die BLS. Der Ventrikel ist mit einer einschichtigen Ependymzellschicht (braun) ausgekleidet, besitzt Gap Junctions und keine Basalmembran. Der Ventrikel ist gefüllt mit Liquor cerebrospinalis (engl. cerebrospinal fluid, CSF).

Immunzellrekrutierung über den *Plexus choroideus*

Der *Plexus choroideus* und das Liquorsystem spielen im physiologischen Zustand ebenfalls eine große Rolle bei der immunologischen Überwachung des Gehirns und bilden eine wichtige Schnittstelle mit der lymphozytären Zirkulation. Lymphozyten stellen den größten Teil der vorhandenen Zellen im *Liquor cerebrospinalis* dar [72]. T-Lymphozyten dominieren mit durchschnittlich 97% des Zellanteils, wobei B-Lymphozyten fast vollständig fehlen [73, 74]. $CD4^+$ T-Lymphozyten bilden im Vergleich zu $CD8^+$ T-Lymphozyten quantitativ mit 76% den größeren Anteil [73]. In beiden Subpopulationen sind vor allem T-Gedächtniszellen im Liquor vorhanden [72, 75]. Dies deutet auf eine stetige immunologische Überwachung des ZNS hin. In Studien konnte eine Verbindung des mit Liquor gefüllten Subarachnoidalraum und den *Bulbi olfactorii* gezeigt werden [76]. Im Liquor vorhandene T-Lymphozyten können über Lymphgefäße der *Dura mater* und die nasale Submukosa über die Siebbeinplatte migrieren [77, 78]. Die genannten Lymphgefäße drainieren schließlich in zervikale Lymphknoten, wo zerebrale Antigene präsentiert werden können.

Einleitung

Bei der Immunzellmigration aus dem Blut in den Liquor handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess. Das choroidale Gefäßendothel exprimiert konstitutiv Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin oder VCAM-1 [79, 80]. Durch passende Liganden am Lymphozyten, beispielsweise einem P-Selektin-Liganden, kann eine transepitheliale Migration in das Plexusstroma erfolgen. Das Plexusepithel kann Chemokine sezernieren, welche die Lymphozyten weiter zu einer parazellulären Migration durch die Basalmembran und Tight Junctions des Epithels in den Liquorraum anregen. Diese Migrationsroute konnte in Experimenten mithilfe von fluoreszenzmarkierten T-Lymphozyten in gesunden Mäusen nachgewiesen werden [81, 82].

Auch im Falle einer ZNS-Entzündungsreaktion kann der *Plexus choroideus* als Route für die selektive Rekrutierung von inflammatorischen Lymphozyten in das Hirnparenchym fungieren [83]. Im Rahmen der MS wird die Expression der Adhäsionsmoleküle des *Plexus choroideus* induziert, sodass die Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten im *Liquor cerebrospinalis* von MS-Patienten steigt [80, 84]. In weiteren Studien konnte eine erhöhte Anzahl an T-Lymphozyten im Plexus-Stroma von MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollgehirnen nachgewiesen werden [85]. Im Plexus-Stroma vorhandene Antigen-präsentierende Zellen, typischerweise Makrophagen, können die migrierenden T-Lymphozyten nach ihrer Kostimulation aktivieren. Über die weitere Migration der T-Lymphozyten in das Hirnparenchym liegen unterschiedliche Ansichten vor (Abb. 7). Es gibt Studien, die zeigen, dass die im Liquor vorhandenen T-Lymphozyten über den Subarachnoidalraum in den perivaskulären Spalt penetrierender Gefäße gelangen können und dort die BHS durchdringen, um das Hirnparenchym zu erreichen [86, 87]. Es besteht auch die Ansicht, welche das Migrieren der Lymphozyten aus dem Liquor über das Ventrikel-umkleidende Ependym in das Hirnparenchym unterstützt [88]. Die Ependymzell-Schicht mit Gap Junctions und ohne eine weitere Basalmembran stellt auch im physiologischen Zustand eine Diffusionsstelle von Liquorflüssigkeit und interstitieller Flüssigkeit des Hirnparenchyms dar und gilt deshalb auch für zelluläre Bestandteile als relativ durchlässig [59].

In einer anderen Studie wurde in einem murinen Schlaganfallmodell die Liquorzirkulation durch eine intraventrikuläre Gelinjektion unterbrochen. Anschließend wurden photoaktivierte Lymphozyten *in vivo* bei der Migration in das Hirnparenchym bei unterbrochener Liquorzirkulation beobachtet. Bei dem beschriebenen Experiment wurde eine alternative Migrationsroute vorgeschlagen (Abb. 7C), in der die Lymphozyten unabhängig vom Liquorfluss über die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* in das Hirnparenchym migrieren [89]. Diese alternative

Route und die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* wurden sowohl morphologisch als auch funktionell bislang wenig untersucht und beschrieben.

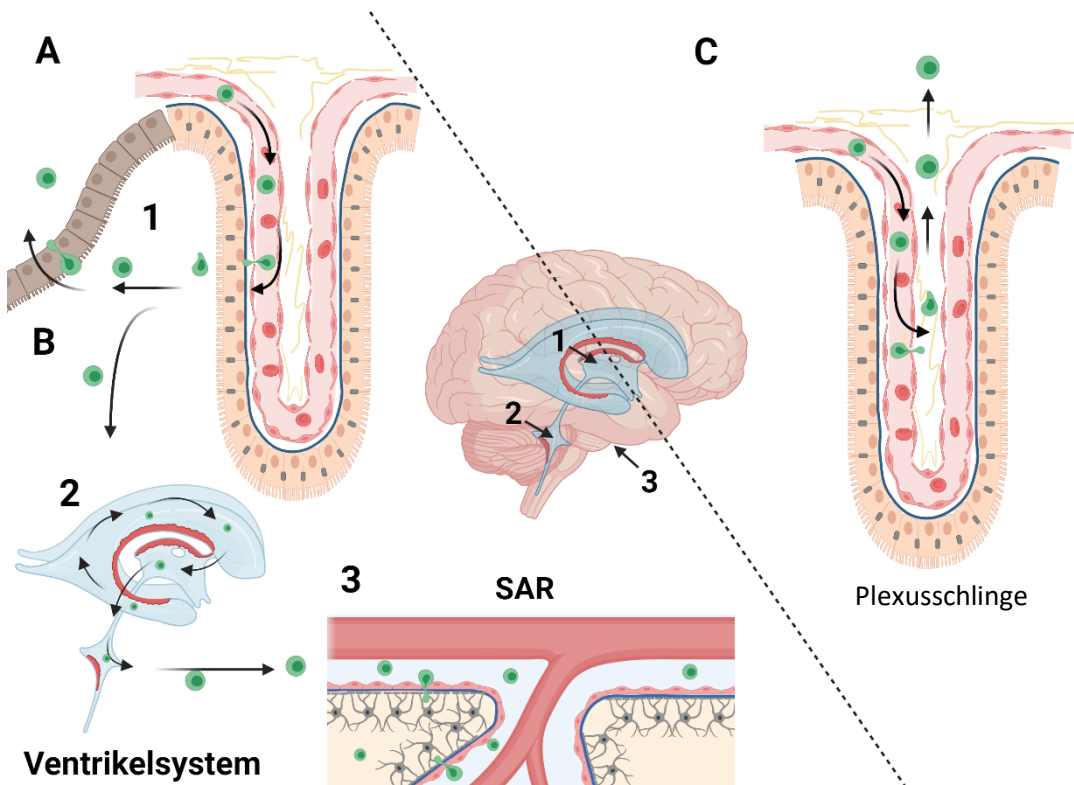


Abbildung 7: Schematische Darstellung möglicher Migrationsrouten über den Plexus choroideus. (A) Klassische Route: Die periphere Immunzelle (grün) überquert das fenestrierte Endothel der Kapillare und gelangt in das Plexusstroma. Weiterhin nimmt sie den Weg der Liquorproduktion über das Plexusepithel in das Ventrikellumen, in dem die Immunzelle die Ependymzell-Schicht überqueren und in das Hirnparenchym gelangen kann. (B) Die Immunzelle folgt der Liquorzirkulation in die äußeren Liquorräume und gelangt in den Subarachnoidalraum (SAR). Gefäße, die sich im SAR befinden, bilden bei der Penetration in das Hirngewebe einen perivaskulären Spalt aus, welchen die Immunzellen als Migrationsort in das Hirngewebe nutzen können. (C) Alternative Route: Die Immunzelle überquert die Endothelzellschicht, gelangt in das Plexus-Stroma und migriert unabhängig von der Liquorproduktion über die Anheftungsstelle des Plexus choroideus am Ventrikeldach in das Hirnparenchym.

1.4 Verwendete Tiermodelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kombination aus zwei MS-Mausmodellen verwendet, welche verschiedene Charakteristika der MS darstellen. Dieses kombinierte Mausmodell erlaubt die Untersuchung von Migrationsrouten unter neurodegenerativen und autoimmun-inflammatorischen Bedingungen.

1.4.1 Das Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches De- und Remyelinisierungs-Modell, welches erstmals 1966 von William W. Carlton beschrieben wurde [90, 91]. Cuprizone (Bis-Cyclo-Hexanon-Oxaldehydhydrazon) ist ein Kupferchelator und hemmt mitochondriale Enzyme der Atmungskette, welche Kupfer als Kofaktor benötigen. Dies führt wahrscheinlich zu oxidativem Stress und in Folge dessen zur Apoptose, insbesondere in den metabolisch hoch-aktiven Oligodendrozyten, welche als Gliazellen die Myelinscheiden im ZNS bilden und aufrechterhalten [92, 93]. Durch Etablierungsstudien konnte

eine Cuprizone-Konzentration ermittelt werden, die zur Entstehung einer reproduzierbaren, zentralen Demyelinisierung bei geringer Mortalität führt. Junge oder adulte C57BL/6-Mäusen werden mit 0,2 % bis 0,25 % Cuprizone versetztem Futter über fünf bis sechs Wochen intoxikiert. Dies führt nach wenigen Wochen zu einer Demyelinisierung in verschiedenen Gehirnregionen [94]. Der Oligodendrozytenzelluntergang als zytodegenerativer Faktor aktiviert Astrozyten und Mikrogliazellen und sorgt für eine ausgeprägte Gliose [95]. Die Demyelinisierung des murinen Gehirns tritt in der weißen sowie grauen Substanz auf, überwiegend im *Hippocampus*, *Corpus callosum* und Kleinhirn [96]. Weitere Merkmale des Cuprizone-Modells sind bei ausgeprägter Intoxikation die Entwicklung eines Hydrocephalus und eine gestörte axonale Integrität in demyelinisierten Bereichen [91]. Die BHS bleibt weitgehend intakt [97, 98]. Mit dem Cuprizone-Modell kann die Pathologie progressiver MS-Formen untersucht werden, insbesondere die Demyelinisierung der weißen und grauen Substanz, axonaler Schaden und oxidativer Stress [99].

1.4.2 Das Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis-Modell

Die Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE) ist ein weiteres Tiermodell, mit dem klinische und histopathologische Charakteristika der MS abgebildet werden können [100]. Hierbei werden unter anderem C57BL/6-Mäuse mit dem Antigen Myelin-Oligodendrozyt-Glykoprotein (MOG)₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert. Anschließend entwickelt sich ein monophasischer, chronischer Krankheitsverlauf [101, 102]. Die injizierten ZNS-Antigene werden von speziellen immunologischen Zellen der Haut, sogenannten Langerhans-Zellen, phagozytiert und fragmentiert. Über den lymphatischen Weg gelangen diese Antigen-präsentierenden Zellen zu regionalen Lymphknoten. Hier findet die Interaktion mit naiven T-Lymphozyten statt. Es kommt zur überwiegenden Synthese von autoimmunem enzephalitogenen CD4⁺ T-Helferzellen, insbesondere Th17-Zellen, die spezifisch gegen das MOG₃₅₋₅₅-Peptid gerichtet sind [103]. Die aktivierten T-Lymphozyten dringen über die BHS in das ZNS ein und sorgen im Zuge einer autoimmun Reaktion sekundär für eine fokale Inflammation, eine axonale Degeneration und eine schwach ausgeprägte Demyelinisierung [104]. Die entstehenden Infiltrate setzen sich hauptsächlich aus CD4⁺ T-Helferzellen und Makrophagen zusammen und befinden sich vorwiegend im Rückenmark, im Kleinhirn und im Sehnerv [105]. Das Vorderhirn, *Corpus callosum* und weitere subkortikale Strukturen sind nicht maßgeblich betroffen. Die EAE-Induktion erlaubt, anders als das Cuprizone-Modell, durch den Zusammenbruch der BHS die Untersuchung der Rekrutierung von generierten T-Lymphozyten [106]. Durch den monophasischen Krankheitsverlauf können die klinisch akuten Anfälle sowie die autoimmune, inflammatorische Komponente der MS untersucht werden [107].

1.4.3 Das kombinierte Cuprizone/Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis Modell

Das kombinierte Cuprizone/Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (Cup/EAE)-Modell ist ein Tiermodell, welches unterschiedliche Aspekte beider zuvor genannter Tiermodelle vereint [108, 109]. In diesem Tiermodell werden C57BL/6-Mäuse über drei Wochen einer Cuprizone-Intoxikation ausgesetzt, auf die eine zweiwöchige Erholungsphase mit normalem Haltungsfutter folgt. Im Anschluss wird bei den intoxikierten Mäusen eine MOG₃₅₋₅₅-EAE induziert [109]. Diese Kombination bewirkt, dass die MOG₃₅₋₅₅ autoreaktiven CD4⁺ T-Helferzellen zum Ort der Cuprizone-induzierten Läsionen migrieren (Abb. 8) [98]. Perivaskuläre und inflammatorische Infiltrate sind im Cup/EAE-Modell in Bereichen wie dem *Corpus callosum*, dem *Cortex* und weiteren subkortikalen Strukturen zu beobachten [98, 108]. Im Vergleich zu einer reinen Cuprizone-Intoxikation wird in diesen Bereichen eine höhere Anzahl parenchymaler Immunzellen beobachtet [110]. An der BHS wird eine diskontinuierliche Expression des astrozytären sauren Gliafaserproteins (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) beschrieben, weshalb auf einen Verlust der Integrität der BHS geschlossen werden kann [109]. Weiterhin werden Demyelinisierung, Astro- und Mikrogliose sowie axonaler Integritätsverlust beobachtet [98, 109]. Das Cup/EAE-Modell eignet sich demnach zur Untersuchung von migrierenden T-Lymphozyten in tiefe subkortikale Strukturen und deren Migrationsroute [110].

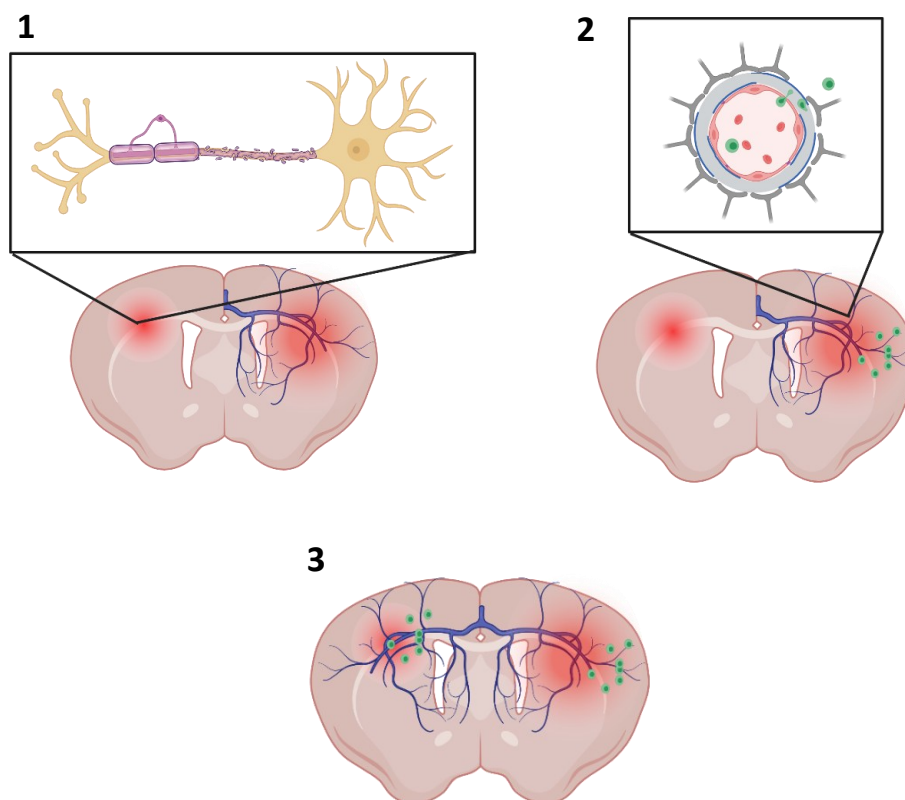


Abbildung 8: Schematische Darstellung der zellulären Prozesse im kombinierten Cuprizone/EAE Modell. Rüter et al. 2017 vermutet, dass die Beteiligung des Vorderhirns im Cup/EAE-Modell anhand eines dreistufigen Prozesses geschieht. **(1)** Zunächst erfolgt unter der Cuprizone-Intoxikation eine Demyelinisierung und Aktivierung der Zellen der BHS, ohne die Integrität maßgeblich zu beeinflussen. **(2)** Nach der EAE-Injektion wird eine Migration von enzephalitogenen Immunzellen beobachtet, welche lokal reaktiviert werden. **(3)** Im letzten Schritt folgt eine zweite Welle der Immunzellrekrutierung zu inflammatorischen, demyelinisierenden Läsionen der vorausgegangenen Cuprizone-Intoxikation.

1.5 Fragestellungen der Arbeit

Die Immunzellrekrutierung ist für die Pathogenese der MS und somit für die Erforschung neuer Therapieoptionen von zentraler Bedeutung. Es gibt bekannte und gut untersuchte Rekrutierungsrouten in das ZNS, wie beispielsweise die Migration über die BHS auf Höhe postkapillärer Venolen. Eine weniger gut untersuchte Rekrutierungsroute stellt die Migration über den *Plexus choroideus* dar. In einer Studie zur Immunzellrekrutierung in Schlaganfall-Läsionen konnte allerdings die Migration von T-Lymphozyten aus dem *Plexus choroideus* in den *Cortex* ohne Beteiligung des Ventrikelsystems beobachtet werden [89]. Die vorliegende Arbeit prüft die Hypothese, dass eine Migration über die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* stattfindet. Durch die fenestrierten Gefäße des *Plexus choroideus* haben Zellen und toxische Stoffe aus dem Blutsystem einen erleichterten Zugang zum Plexusstroma. Zur Erhaltung des immunologisch spezialisierten Raumes des Hirnparenchyms wäre es im physiologischen Zustand sinnvoll, wenn diese Rekrutierungsroute durch das Plexusstroma und die Anheftungsstelle an dem Punkt der Anheftungsstelle geschützt wäre. Bekannte protektive Strukturen stellen die genannten glialen Barrieren dar, beispielsweise die an der Hirnoberfläche sowie um intrakranielle Gefäße. Mit diesem Hintergrund lautet die erste Hypothese dieser Arbeit:

1. Im Bereich der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel existiert eine gliale Barriere in Form einer *Membrana limitans gliae perichoroidalis*.

Darauf aufbauend lautet die zweite Hypothese dieser Arbeit:

2. Im MS-Tiermodell findet die Invasion peripherer Immunzellen in das ZNS eher über die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* als über das Plexusepithel statt.

Die Existenz solch einer glialen Barriere, von mir als *Membrana limitans gliae perichoroidalis* postuliert, soll unter Verwendung von immunhistochemischen Markierungen glialer und laminärer Proteine, qPCR sowie Analysen der ultrastrukturellen Morphologie der Anheftungsstelle an Kontrolltieren nachgewiesen werden. Weiter wird in dieser Arbeit das Cup/EAE-Modell verwendet, um eine primär zytodegenerative Pathologie mit sekundärer Immunzellrekrutierung in das Gehirn zu induzieren und dann die Dichte rekrutierter Lymphozyten im Bereich der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* zu bestimmen.

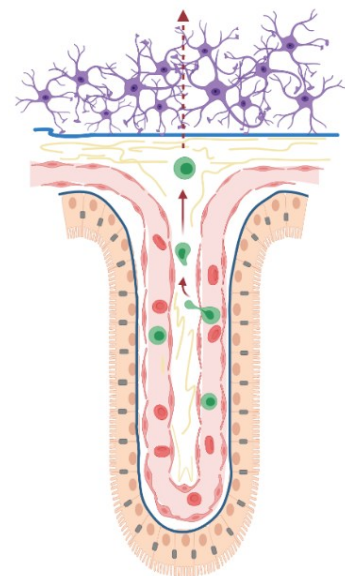


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer möglichen choroidal-parenchymalen Migration einer Immunzelle über die *Membrana limitans gliae perichoroidalis*.

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimente und Experimentgruppen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die durchgeführten Tierexperimente weibliche, zehn Wochen alte Mäuse vom Stamm C57BL/6J von Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden in Gruppen von je fünf Tieren nach den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)“ in Käfigen gehalten. Die Käfige mit 820 cm² Grundfläche wurden wöchentlich gewechselt. Es lag gemäß §8 des Tierschutzgesetzes eine Genehmigung für das Tierexperiment vor (Regierung Mecklenburg-Vorpommern, Tierversuchsnummer 7221.3-1-001/19) und alle geltenden Tierschutzbestimmungen sowie Richtlinien wurden eingehalten.

Die Haltung der Tiere erfolgte bei einem festgelegten Tag-Nacht-Zyklus von jeweils zwölf Stunden und einer Raumtemperatur von 22 °C ± 2 °C. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser. Die Käfige waren standardmäßig mit Einstreu, Nestbaumaterial, Versteckmöglichkeit, einer Trinkflasche und Futter ausgestattet. Vor Beginn des Tierexperiments konnten sich die Tiere für eine Woche an die Umgebung gewöhnen, um Stress-Faktoren zu vermeiden.

Tabelle 1: Übersicht der Experimentengruppen des durchgeführten Tierexperiments, Verlauf 6. (Abkürzungen: Cuprizone/Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (Cup/EAE)).

Versuchsgruppe	Mausstamm	Alter	Geschlecht	Anzahl
Kontrollgruppe	C57BL/6J	10 Wochen	weiblich	5
Cup/EAE-Gruppe	C57BL/6J	10 Wochen	weiblich	5

2.1.1 Cuprizone/Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis-Gruppe

Die Mäuse der Cup/EAE-Gruppe erhielten über drei Wochen gemahlene Standard-Haltungsfutter mit 0,25 % Cuprizone versetzt. Dafür wurden täglich 0,35 g Cuprizone mit 140 g Haltungsfuttermehl gemischt. Diese Menge entspricht einer täglichen Futterportion für fünf Mäuse. Das Futter wurde in mit dem Cuprizone einem handelsüblichen Standmixer (Kult X, WMF, Geislingen, Deutschland) unter zusätzlich manuellem Schwenken für eine Minute vermengt. Das hergestellte Cuprizone-Gemisch wurde anschließend gleichmäßig auf zwei Petrischalen verteilt und im Käfig platziert. Das Wohlbefinden der Mäuse wurde täglich über die gesamte Dauer des Tierexperiments nach den klinischen Kriterien Aktivität, Atmung, Bewegung, Fell-Beschaffenheit, Konstitution und Dehydrierung beurteilt. Nach der dreiwöchigen Cuprizone-Intoxikation erhielten die Mäuse bis zum Ende des Experiments normales Haltungsfutter in Form von Pellets. Zwei Wochen nach Ende der Cuprizone-Intoxikation erfolgte die Immunisierung der Mäuse mit dem Myelin-Oligodendrozyt-Glykoprotein (MOG)₃₅₋₅₅-Peptid (Abb. 10). Hierfür wurde ein kommerzielles Kit (Hooke Laboratories,

USA) verwendet. Das MOG₃₅₋₅₅-Peptid wurde in komplettem Freund-Adjuvans (Paraffinöl, Emulgator, und inaktivierte Tuberkulosebakterien) gelöst (EAE-Ansatz). Nach einer Isofluran-Inhalationsnarkose wurden jeweils 0,1 ml der EAE-Ansatz subkutan in den Nacken und nahe der

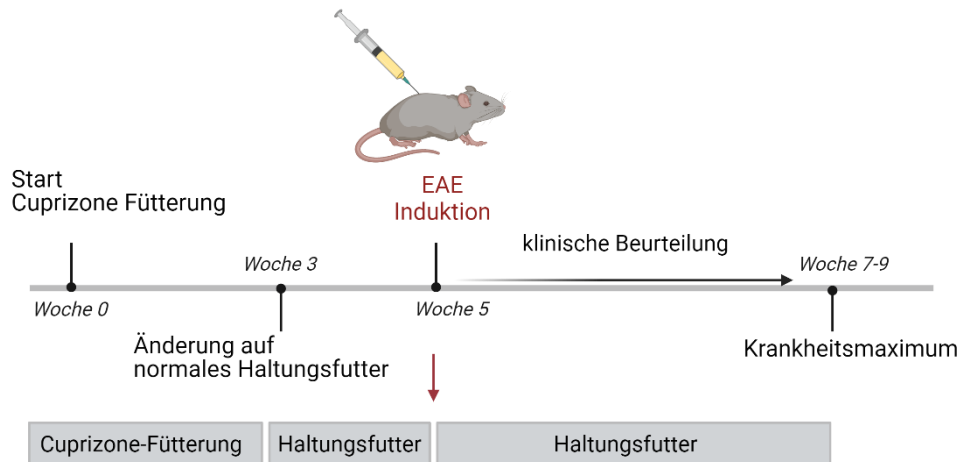


Abbildung 10: Ablauf der Intoxikation der Cup/EAE-Gruppe mit Cuprizone und MOG₃₅₋₅₅-Peptid. Schritt 1: drei Wochen Cuprizone-Intoxikation. Schritt 2: zwei Wochen Erholung bei normalem Haltungsfutter. Schritt 3: EAE-Induktion. Schritt 4: Transkardiale Perfusion nach Erreichen des Krankheitsmaximums.

Schwanzwurzel injiziert. Es erfolgte eine zweimalige intraperitoneale Injektion von 100 µl/Injektion gelöstem Pertussis-Toxin (0,2 µg/µl): Die erste Applikation wurde zeitgleich zur MOG₃₅₋₅₅-Peptid Immunisierung durchgeführt und die zweite 24 Stunden danach. PTX-Toxine verschiedener Chargen unterscheiden sich in ihrer Potenz (hier: Lot-Nr. 1008). Sowohl das Freund-Adjuvans als auch das Pertussis-Toxin verstärken die Autoimmunantwort auf das MOG₃₅₋₅₅-Peptid [111].

2.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe wurde über die Dauer des Tierexperimentes parallel zur Cup/EAE-Gruppe mit normalem Haltungsfutter (Pellets) gefüttert. Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden wöchentlich gewogen, um den Gewichtsverlauf festzuhalten. In diesem Experiment lag die durchschnittliche Gewichtsänderung pro Woche der Kontrollgruppe bei +3,09%. Innerhalb der Cup/EAE-Gruppe lag die durchschnittliche Gewichtsänderung bei -6,77%, dabei zeigten 2 Tiere eine besonders deutliche Gewichtsreduktion von -9,3% und -7,05% (Tab. 1). Ein Käfigwechsel erfolgte drei Mal in der Woche. Die Kontrollgruppe wurde zusammen mit der Cup/EAE-Gruppe perfundiert.

Es wurden zusätzlich Hirnschnitte von Mäusen aus anderen Experimenten untersucht. Diese Tierexperimente wurden von anderen Experimentatoren betreut, jedoch nach demselben etablierten Protokoll durchgeführt. Für eine Übersicht der verwendeten Hirnschnitte siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht der einzelnen Experimente und Versuchsgruppen. (Abkürzungen: weiblich (♀), Cuprizone/Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (Cup/EAE).

Interne Versuchs-designation	Maus-Stamm	Alter	Gewicht	Ge-schlecht	Cuprizone Dosis	Versuchsgruppen
Verlauf 5	C57BL/6J	10w	20-22 g	♀	0,25 %	- Cup/EAE (n=3)
Verlauf 6	C57BL/6J	10w	19-23 g	♀	0,25 %	- Cup/EAE (n=5) - Kontrolle (n=5)
Plex	C57BL/6J	10w	17-20 g	♀	-	- Kontrolle (n=3)
PlexEM	C57BL/6J	10w	18-22 g	♀	-	- Kontrolle (n=3)
LaserDiss	C57BL/6J	10w	18-22 g	♀	-	- Kontrolle (n=5)

2.1.3 Klinische Beurteilung der Mäuse

Nach der Immunisierung wurden die Mäuse der Cup/EAE-Gruppe täglich klinisch beurteilt (Scoring). Es wurden entsprechend der Symptomatik Scoring-Werte auf einer Skala von 0 bis 5 vergeben (Tab. 3). Die Gesamtheit der klinischen Symptomatik konnte prinzipiell von der anfänglichen Parese der Schwanzspitze bis hin zur Parese der hinteren Extremitäten sowie *Exitus letalis* reichen. Erste Symptome traten durchschnittlich sieben Tage nach der Immunisierung auf. Eine fortschreitende Parese kann die Mobilität und den Allgemeinzustand des Tieres einschränken, weshalb bei einer Verschlechterung der klinischen Symptomatik die Versorgung der Mäuse mit Futter und Wasser sichergestellt werden muss. In diesen Fällen (Score 2,5) wurde in den Käfigen zusätzlich eine Schale mit in Wasser getränkten Pellets und Flüssigkeitsgel platziert. Wurde ein Score von 3 erreicht, erhielten die Mäuse täglich eine subkutane Injektion von 1 ml Ringer-Lösung in die Flanke. Eine Tetraplegie (Score 4) bei einem Tier stellt ein Kriterium für den Ausschluss aus dem Tierexperiment dar, eine Perfusion folgt am selben Tag. Dieses Abbruch-Kriterium wurde während des gesamten Experiments jedoch von keinem Tier erreicht.

Tabelle 3: Klinische Beurteilung von Mäusen nach EAE-Induktion.

Score	klinische Symptomatik
0	Keine Beobachtung von motorischen Einschränkungen
0,5	Lähmung der Schwanzspitze
1	Lähmung des kompletten Schwanzes
1,5	Parese des Schwanzes und beginnende Parese mindestens einer der hinteren Extremitäten
2	Parese des Schwanzes und Schwäche der hinteren Extremitäten

2,5	Vollständige Parese beider hinteren Extremitäten oder komplette Parese eines Hinterbeines
3	Paralyse oder schwere Ataxie
3,5	Zusätzlich zu Score 3: Unfähigkeit sich aus lateraler Position aufzurichten
4	Hinzukommende, anfängliche Parese der vorderen Extremitäten
4,5	Apathie, minimale Bewegung zu beobachten
5	<i>Exitus letalis</i> oder Tötung aufgrund schwerwiegender Lähmungen

2.1.4 Transkardiale Perfusion und Gewebeentnahme

Am Ende des Tierexperimentes wurden die Mäuse durch eine transkardiale Perfusion unter kontrollierten Bedingungen finalisiert (Abb. 11). Die Perfusion erfolgte im Krankheitsmaximum (engl. *peak of disease*) der Mäuse bei einem Score, der konstant über mindestens zwei Tage im Intervall von 2,5-3,5 lag. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (75 mg/ml Ketamin, 5 mg/ml Xylazin) narkotisiert. Die Dosierung erfolgte anhand des Gewichtes der Maus mit 0,1 ml Ketamin/Xylazin-Gemisch pro 10 g Körpergewicht. Nach Ausbleiben des Kornealreflexes und der Schmerzreflexe wurde die transkardiale Perfusion eingeleitet.

In einem ersten Schritt wurde die Haut über dem Abdomen der Maus eröffnet und zur Seite gezogen. Das darunterliegende Peritoneum wurde entlang der Körpermitte von kaudal bis zum Diaphragma eröffnet. Das Diaphragma wurde entfernt, wodurch die Lungenflügel kollabierten und die Rippen seitlich abgesetzt werden konnten. Mit Sicht auf das Herz wurde am rechten Atrium ein Schnitt gesetzt und eine stumpfe Flügelkanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Die Führung der Kanüle erfolgte in Richtung des linken Herzhohrs, um das Ventrikelseptum nicht zu durchstoßen. Die transkardiale Perfusion erfolgte durch manuelle Infusion von 20 ml Phosphatpuffer (PBS) und 30 ml 3,7% Paraformaldehydlösung (PFA). An einer Schlauchpumpe (IsmaTec, IPC-4) wurde mit einer Geschwindigkeitseinstellung von 40 (ca. 22 ml/min) weitere sieben Minuten die PFA-Perfusionslösung appliziert. Die Köpfe wurden anschließend abgetrennt und die Schädelkalotten unter Schonung des Hirngewebes mit Hilfe einer Schere eröffnet. Die Köpfe mit den eröffneten Schädelkalotten wurden in der PFA-Perfusionslösung 24 Stunden bei 4 °C postfixiert. Am Folgetag wurden die Gehirne vorsichtig freipräpariert und zur Einbettung in Gewebekassetten überführt.

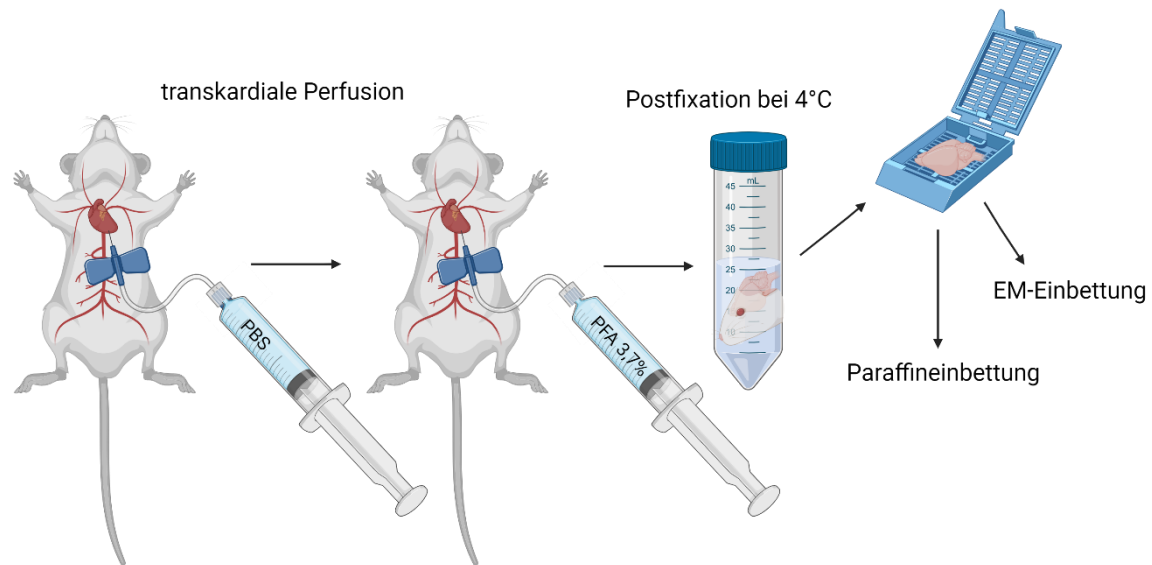


Abbildung 11: Transkardiale Perfusion mit anschließender Postfixation im Fixativ (PFA 3,7%) bei 4 °C über Nacht. Die Kanüle liegt im linken Ventrikel, Infusion von PBS und PFA 3,7% über das Herz-Kreislauf-System zur Fixierung von Gewebe. Nach Postfixation erfolgt die Präparation und Überführung in Gewebekassetten zur weiteren Gewebeeinbettung. (Abkürzungen: Elektronenmikroskopie (EM)).

2.1.5 Transkardiale Perfusion für die Elektronenmikroskopie

Kontrolltiere, die für elektronenmikroskopische Untersuchungen vorbereitet wurden, wurden mit einer anderen Perfusions- und Fixationslösung perfundiert. Konventionelle Fixative für die Elektronenmikroskopie (EM) sind Glutaraldehyd (25%) und Formaldehyd (37%). Glutaraldehyd sorgt schnell für eine irreversible Protein-Quervernetzung während Formaldehyd zu einer reversiblen Quervernetzung führt. Beide Fixative waren Bestandteil der verwendeten Fixationslösung. Die Anästhesie, die Prüfung der Schmerzreflexe und die Positionierung der Kanülen erfolgten nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 2.1.4. beschrieben. Die transkardiale Perfusion begann mit der manuellen Infusion von 20 ml Ringer-Lösung und anschließender Perfusion von 30 ml Fixationslösung. Abschließend wurden die Schädelkalotten eröffnet und im Fixativ 24 Stunden bei 4 °C postfixiert. Am Folgetag wurden die Gehirne vorsichtig freipräpariert und zur Konservierung in mit Fixationslösung befüllten 50 ml Reagenzgläsern bei 4 °C gelagert.

2.1.6 Einbettung und Schnittanfertigung

2.1.6.1 Paraffineinbettung

Die beschrifteten Gewebekassetten wurden für mindestens sechs Stunden unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung der Gehirne in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 4) beginnend in 70% Ethanol über eine Dauer von zwei Tage hinweg. Die Gehirne wurden unter konstantem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt inkubierten die Gehirne in flüssigem Paraffin (60 °C) und wurden im Anschluss in heißem Paraffin (60 °C) eingebettet. Die Gehirne wurden mit der frontalen Seite nach oben zeigend ausgerichtet, sodass sich eine koronare Schnittebene ergab. Nach vollständiger Aushärtung der Paraffinblöcke

auf einer Kühlplatte wurden 5 µm dicke Schnitte an einem Rotationsmikrotom (Leica, RM 2255) als Serien konsekutiver Schnitte angefertigt. Auf einem Objektträger (Superfrost Plus) wurden je zwei Paraffinschnitte direkt aus einem warmen Wasserbad (45-47 °C) aufgezogen und über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank getrocknet.

Tabelle 4: Entwässerungs- und Einbettungsprotokoll.

Schritt	Chemikalie	Inkubationszeit
1	Leitungswasser	6-12 Stunden
2	70 % Ethanol	2 Tage
3	80 % Ethanol	4 Stunden
4	90 % Ethanol	24 Stunden
5	96 % Ethanol	4 Stunden
6	100 % Ethanol	24 Stunden
7	Xylol	60 Minuten
8	Xylol	120 Minuten
9	Paraffin 1	1 Tag
10	Paraffin 2	1 Tag
11	Paraffin 3	3 Tage
12	Einbettung	

2.1.6.2 Kryostat-Einbettung

Für die Kryostat-Einbettung wurde das Gewebe nach entsprechender Narkose (Kapitel 2.1.4) nativ entnommen. Im Anschluss wurde das Gewebe für fünf Minuten in flüssigem, -60 °C kaltem Isopentan schockgefroren. Das Einbetten der Gehirne erfolgte direkt auf einem Halter mit einem Gewebeeinbettmedium (Tissue Tek, Sakura) bei -20 °C in der Kühlkammer des Rotations-Kryostat-Mikrotoms (Leica, CM3050 S). Nach der Einbettung wurden 10 µm dicke Schnitte bei -20 °C angefertigt und jeweils vier Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Die Schnittreihen wurden bei -80 °C gelagert.

2.1.6.3 Probenpräparation, Einbettung und Schnitt für die Transmissions-Elektronenmikroskopie

Der Teil dieser Arbeit, welcher die Elektronenmikroskopie anwendet, wurde in Kooperation mit dem Elektronenmikroskopie-Zentrum Rostock unter Dr. Markus Frank durchgeführt.

Das Ziel der Präparationsmethode ist es, die Veränderungen der murinen Gehirne während der Präparation und Kontrastierung sowie die Strahlen-bedingte Zerstörung während des Mikroskopierens zu verringern, um artefaktarme morphologische Informationen zu erhalten.

Material und Methoden

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurde das Gewebe vor der Einbettung grob auf die zu untersuchende Region zugeschnitten. Das Gehirn wurde aus dem Fixativ entnommen und in heiße Agarose (2,5 %) eingebettet. Die Ausrichtung erfolgte mit der frontalen Seite nach oben zeigend, sodass sich eine koronare Schnittebene ergab. Nach vollständiger Aushärtung der Agaroseblöcke wurden 200 µm dicke Scheiben an einem Vibratom (Leica, VT 1000 S) als Serie konsekutiver Schnitte angefertigt und vorzeitig in Ringerlösung gelagert. Nach dem Schnitt ließ sich die Agarose durch leichten Zug vom Gewebe abziehen. Mittels eines Durchlichtmikroskops (Nikon, Eclipse E200) konnte eine engere Auswahl topographisch passender Hirnscheiben getroffen werden.

Die angefertigten Zuschnitte wurden in Epon (Serva) eingebettet. Epon ist ein Kunstharz und dient als hartes Einbettmedium. Ein Kollabieren der zellulären Strukturen im Vakuum des EM wird dadurch verhindert. Jede Hirnscheibe wurde vorbereitend in einem Phosphatpuffer (pH=7,3) mehrmals gewaschen und über Nacht in dem Puffer gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine einstündige Immersion in einer Osmiumtetroxid-Lösung (1 % in Natrium-Puffer). Osmiumtetroxid (OsO₄) stabilisiert Lipide und Zellmembranen und färbt diese schwarz. Die Stärke des Kontrastes hängt mit der Elektronendichte des Materials zusammen, weshalb das Schwermetall hier zur Nachfixierung und Kontrastierung der Gewebeproben verwendet wurde. Im Anschluss wurde das behandelte Gewebe jeweils drei Mal für fünf Minuten in Aqua dest. gewaschen und in einer aufsteigenden Acetonreihe beginnend mit 30 % Aceton entwässert (Tab. 5). Folgend wurde das Gewebe in eine 1:1 Aceton/Epon Mischung zur Infiltration bis zum vollständigen Abdampfen des Acetons inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe zur Infiltration für weitere vier Stunden in reines Epon gelegt. Es erfolgte ein weiterer seitlicher Zuschnitt der Hirnscheiben. Diese Präparation fand an einem Weitwinkel-Stereomikroskop Olympus SZX10 statt. Aufnahmen wurden mit einem am Mikroskop installierten Kamerasystem (Axiocam ERc 5s, Zeiss, Wetzlar) angefertigt. Abschließend wurden die circa 2 mm x 3 mm großen Zuschnitte in flüssigem Epon in Einbettformen (Agar Aids Ltd.) eingebettet und für zwei Tage bei 60 °C polymerisiert.

Tabelle 5: Entwässerung und Einbettungsprotokoll für die Elektronenmikroskopie.

Schritt	Chemikalie	Inkubationszeit
1	30 % Aceton	5 min
2	50 % Aceton	10 min
3	70 % Aceton	30 min
4	90 % Aceton	30 min
5	100 % Aceton	30 min
6	100 % Aceton	30 min

7	1:1 Acteon/Epon Mischung	24 Stunden
8	Epon	4 Stunden
9	Einbettung	

Die dadurch erhaltenen Blöcke wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut S, Leica) eingeschnitten. Hierbei wurde ein Diamantmesser verwendet, mit dem eine Schnittdicke von bis zu 15-100nm erzielt werden konnte.

Zur fortlaufenden Orientierung im Gewebe wurden vorerst 1-2µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Um Schnitte elektronenmikroskopisch beurteilen zu können, wurden Ultradünnschnitte (>100nm) angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden auf feinen Kupfernetzen (engl. *grid*) mit einer Maschengröße von 180-200 Maschen/cm aufgefangen. Diese Kupfernetze ersetzen die Glasobjektträger aus der Lichtmikroskopie. Zur Verbesserung des Kontrastes zwischen verschiedenen Zellorganellen wurden die Ultradünnschnitte dem Schwermetallion Uranylacetat ausgesetzt. Das Schwermetallion wird von verschiedenen Zellstrukturen unterschiedlich stark absorbiert und macht diese dadurch differenzierbar.

2.2 Histologie und Immunhistologie

2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung ist eine weit verbreitete Kombinationsfärbung zur morphologischen Untersuchung feingeweblicher Strukturen. In dieser Arbeit wurde die HE-Färbung für Übersichtsdarstellungen und zur topographischen Orientierung im murinen Gehirn verwendet. Bevor die Paraffinschnitte gefärbt wurden, folgte eine standardisierte Deparaffinierung und Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (Tab. 6).

Das Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der bei einem niedrigem pH-Wert einen positiv geladenen Komplex mit Aluminiumionen bildet. In basischer Form liegt Hämatoxylin als Hämalaun vor. Die zur Färbung verwendete Hämalaunlösung nach Mayer geht in saurem Milieu eine Bindung mit basophilen Strukturen ein. Dementsprechend werden Strukturen wie Nukleinsäuren im Zellkern zunächst rot-braun gefärbt. Durch das anschließende Spülen mit Aqua dest. erhöht sich der pH-Wert. Es kommt zum Farbumschlag in ein blau-violett und zur Stabilisierung der Farbe im Gewebe. Für die Gegenfärbung wird eine wässrige Eosin G-Lösung (0,2%) verwendet.

Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der negativ geladen ist und an acidophile Strukturen bindet. Strukturen wie Proteine im Cytoplasma werden in verschiedenen Rottönen angefärbt. Das Resultat der Kombinationsfärbung zeigt sich in einer selektiven blauen Kernfärbung mit rötlicher Extrazellulärmatrix- und Cytoplasmafärbung. Im Anschluss folgte eine Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 6).

Tabelle 6: Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung der murinen Gehirnschnitte mit anschließender Dehydrierung.

Chemikalie	Zeit	Kommentar
Xylol 1	10 min	Deparaffinierung und Rehydratation
Xylol 2	10 min	
Xylol 3	10 min	
Xylol 50%/Ethanol 50 %	5 min	
100 % Ethanol	3 min	
100 % Ethanol	3 min	
96 % Ethanol	3 min	
96 % Ethanol	3 min	
70 % Ethanol	3 min	
50 % Ethanol	3 min	
destilliertes Wasser		
Mayer's Hämalaun Lösung	10 min	Hämatoxylin-Färbung
HCl-Alkohol	10 sec	pH-Wert Umschlag
destilliertes Wasser	15 min	„Bläuen“ der Hämatoxylin-Färbung
destilliertes Wasser	2 min	Kurzes Spülen
Eosin Lösung	2 min	Eosin-Färbung
Aqua dest.	30 sec	Kurzes Spülen
80 % Ethanol	3 min	Entwässerung
96 % Ethanol	3 min	
100 % Ethanol	3 min	
100 % Ethanol	3 min	
Xylol 50%/Ethanol 50 %	5 min	
Xylol 1	10 min	
Xylol 2	10 min	
Xylol 3	10 min	

Nach der Dehydrierung folgte das Eindecken der Schnitte unter einem Deckglas mit Xylol-löslichem Eindeckmedium DePeX.

2.2.2 Toluidinblau-Färbung

Semidünnschnitte wurden für die lichtmikroskopischen Voruntersuchungen von elektronenmikroskopischen Schnitten mit Toluidinblau gefärbt. Im Gegensatz zu anderen Indikatoren ist Toluidinblau dazu in der Lage, histologische Präparate anzufärben, die in Kunstharz eingebettet wurden. Mit Toluidinblau werden saure Moleküle angefärbt, vor allem im Gewebe

vorhandene Nukleinsäuren wie DNA oder RNA. Der Farbstoff dringt in die dichte Harzschicht ein und färbt das eingeschlossene Gewebe in unterschiedlichen Blautönen an. Die Blautönung entspricht dabei der relativen Elektronendichte des gefärbten Gewebes.

Hierzu wurden die Semidünnschnitte mit einem dünnen Pinsel auf mit *Aqua dest.* befeuchtete Objektträger platziert. Anschließend wurden die Objektträger bei circa 70°C auf einer Heizplatte getrocknet. Die Schnitte wurden mit einer Toluidinblau-Lösung (0,05%) bedeckt und von der Heizplatte genommen, sobald die Lösung dampfte. Nach einem Spülschritt mit Leitungswasser wurden die Objektträger nochmals zum Trocknen auf die Heizplatte gelegt. Das Eindecken erfolgte unter einem Deckglas mit DePeX.

2.2.3 Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) beruht auf dem Prinzip der Affinität von Antikörpern zu einem spezifischen Antigen. Die IHC stellt eine sensitive Methode zur Lokalisation von proteinergeren Strukturen dar. Die Visualisierung einer Antikörper-Antigen-Interaktion kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Das hier verwendete Verfahren beruht auf der ABC-Methode und stellt ein indirektes, chromogenes Nachweisverfahren dar.

Dabei erfolgt die Markierung der spezifischen Antigene schrittweise über zwei Antikörper. Der unkonjugierte, primäre Antikörper richtet sich gegen das nachzuweisende Antigen und wird seinerseits am Fc-Teil von einem sekundären Antikörper gebunden. Der sekundäre Antikörper ist an seinem Fc-Teil mit Biotin-Molekülen konjugiert. Biotin wird somit als antigene Determinante markiert, an der weitere Strukturen binden können. Aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin ($K_a=10^{15}\text{M}^{-1}$, nahezu irreversibel) bindet ein Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex (ABC-Komplex), bestehend aus Avidin (Reagenz A) und einer an Biotin gekoppelten Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) (Reagenz B). Durch mehrfaches Binden sekundärer Antikörper an einen primären Antikörper und der ABC-Komplexe an einen Sekundärantikörper wird eine starke Amplifikation des resultierenden Signals erreicht.

In Anwesenheit von H_2O_2 katalysiert die HRP des ABC-Komplexes die Umsetzung des phenolischen Substrats 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), dessen Produkt als braunes unlösliches Präzipitat ausfällt. Das bräunliche Präzipitat markiert den Ort des Antigens (indirekter Nachweis). Das beschriebene Prinzip ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

Im Rahmen der immunhistochemischen Markierung können die Antikörper und die Enzymkomplexe unspezifische Bindungen mit Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Proteinen oder Gewebe über hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Endogene Peroxidasen können ebenfalls für ein unspezifisches Signal sorgen. Es werden „Blockierungsschritte“ durchgeführt, um

Hintergrundmarkierungen zu reduzieren. Vor der Applikation der Primär- und Sekundärantikörper auf die Schnitte wird mit 5% Normalserum aus der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, das „Blocken“ durchgeführt. Bindungsstellen von Ig-ähnlichen Proteinen werden von Antikörpern und Serumproteinen aus dem Normalserum mit unspezifischer Affinität maskiert, sodass der Sekundärantikörper nicht mehr an diese binden kann. Durch Inkubation der Schnitte in 0,35% Wasserstoffperoxid in PBS(1x) werden intrinsische Gewebeperoxidasen gesättigt und inaktiviert. Somit kann die Gewebeperoxidase das DAB-Substrat nicht mehr katalysieren und das unspezifische Hintergrundsignal wird verringert.

Bevor ein Primärantikörper für eine IHC verwendet wird, erfolgt eine zweistufige Etablierung mit dem Ziel, ein bestmögliches Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. In einem ersten Schritt wird getestet, ob eine Demaskierung von Apitopen durch Kochen in Citrat-Puffer (pH=6,0) oder Tris/EDTA-Puffer (pH=9,0) erforderlich ist. Dies erfolgt mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration des Primärantikörpers. Für den Puffer, der bei geringster Antikörpermenge ein spezifisches Ergebnis erwarten lässt, wird im zweiten Schritt eine Verdünnungsreihe zur Ermittlung der optimalen Konzentration des Primärantikörpers erstellt. Auf diese Weise wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper etabliert.

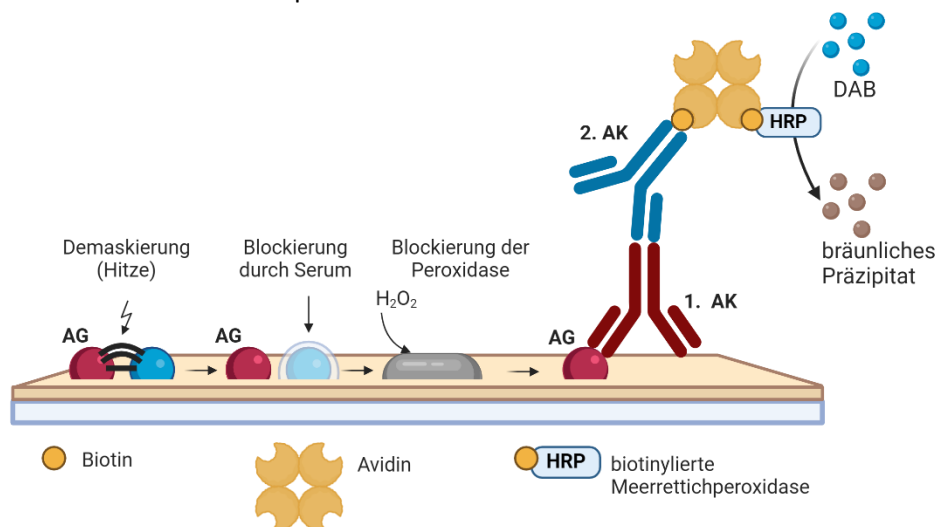


Abbildung 12: Färbeprinzip einer immunhistochemischen Markierung. Die Demaskierung dient der Lösung von Protein-Quervernetzungen und Freilegung des Antigens (AG). Der Serum-Blockierungsschritt verhindert eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers. Durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird die endogene Peroxidase-Aktivität inaktiviert. Der Primärantikörper (1. AK) bindet das Antigen (AG). Der biotinylierte Sekundärantikörper (2. AK) bindet den Primärantikörper. Die an den Avidin-Biotin-Komplex gelagerte Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Umsetzung des Substrates 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in ein bräunliches Präzipitat.

2.2.4 Durchführung der immunhistochemischen Markierung

Gewebeschnitte, deren immunhistochemische Markierung direkt miteinander verglichen wurden, wurden zur selben Zeit und nach demselben Protokoll behandelt. Dies stellt ein einheitliches und vergleichbares Ergebnis sicher.

Material und Methoden

Das Protokoll beginnt mit der Deparaffinierung in Xylol und der Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe beginnend mit 100% Ethanol (Tab. 7).

Tabelle 7: Deparaffinierung und Rehydratation der murinen Gehirnschnitte.

Schritt	Chemikalie	Inkubationszeit
1	Xylol 1	10min
2	Xylol 2	10min
3	Xylol 3	5min
4	Xylol50%/Ethanol50%	3min
5	Ethanol 100%	3min
6	Ethanol 100%	3min
7	Ethanol 96%	3min
8	Ethanol 96%	3min
9	Ethanol 70%	3min
10	Ethanol 50%	3min
11	Destilliertes Wasser	3min

Die Antigen-Demaskierung erfolgt im nächsten Schritt. Durch die Formalin-Fixierung können Quervernetzungen, sogenannte „Crosslinks“, entstanden sein, die freie Antigenstellen binden und verbergen. Um das Ergebnis der immunhistochemischen Markierung zu verbessern, sollen diese Protein-Verbindungen aufgelöst und die Antigene wieder freigelegt werden. Bei der Hitze-induzierten Demaskierung „HIER“ (engl. „*heat induced epitope retrieval*“) wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten in einer Pufferlösung (Tris-EDTA (pH=9,0) in einer Mikrowelle gekocht. Die Demaskierung erfolgt über eine Änderung des pH-Werts, die durch Hitze beschleunigt wird. Im Anschluss wurden die Schnitte für 15 Minuten in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch konstantes Schütteln wurden die Schnitte in einer Glasküvette mit PBS(1x) unter konstantem Schütteln drei Mal für jeweils fünf Minuten gespült.

Es folgte die Blockierung mit PBS mit 5% Normalserum der Spezies, in welcher der Zweitantikörper hergestellt wurde. Dafür wurden die Schnitte in feuchte Kammern überführt und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Blockierlösung von den Schnitten durch leichtes Abklopfen entfernt. Der Primärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in Blockierlösung auf die Schnitte appliziert und bei 4 °C über Nacht in der feuchten Kammer inkubiert. Negativkontrollen wurden mit Blockierlösung ohne Primärantikörper inkubiert.

Material und Methoden

Nach 24 Stunden wurden die Gewebeschnitte erneut in einer Glasküvette mit PBS(1x) unter konstantem Schütteln drei Mal für jeweils fünf Minuten gespült. Negativkontrollen wurden separat gespült, um eine Kontamination mit dem Primärantikörper zu vermeiden. Im nächsten „Blockierungsschritt“ wurden die Schnitte in 0,35% Wasserstoffperoxid in PBS(1x) unter minimalem Lichteinfall inkubiert. Anschließend wurde der benötigte Sekundärantikörper in 5 % Normalserum in PBS(1x) verdünnt und auf die Gewebeschnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Primär- und Sekundärantikörper, die an murinem Gewebe verwendet wurden, sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 8: Primärantikörper, die für immunhistochemische Markierungen des murinen Gewebes verwendet wurden.

Antigen	Klonalität	HIER	Verdünnung	Wirt	Firma	Katalognummer (Lot-Nummer)
NeuN	monoclonal	Tris/EDTA	1:1000	Maus	Millipore	2639366 Oct-15
Laminin	polyclonal	Tris/EDTA	1:300	Kaninchen	Abcam	ab11757 (GR3268366-5)
GFAP	polyclonal	Tris/EDTA	1:200	Ziege	Sigma	SAB2500462
GFAP	monoclonal	Tris/EDTA	1:200	Kaninchen	Abcam	ab68428
IBA1	polyclonal	Tris/EDTA	1:2500	Kaninchen	WAKO	Wako 019-19741 (GR3246017-1)
CD3	monoclonal	Tris/EDTA	1:250	Ratte	Abcam	ab11089
CD31	monoclonal	Tris/EDTA	1:20	Ratte	Dianova	DIA-310
α -SMA	monoclonal	Tris/EDTA	1:100	Maus	Abcam	ab21027
Isotyp-K.	monoclonal	Tris/EDTA	1:125	Ratte	Thermo-Fisher-Scientific	14-4301-82 (2162105)

Tabelle 9: Sekundärantikörper, die für immunhistochemische Markierungen des murinen Gewebes verwendet wurden.

Ziel	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Kaninchen IgG	Ziege	Biotin	1:200	VECTOR	BA1000
Maus IgG	Ziege	Biotin	1:200	VECTOR	BA9200
Ratte IgG	Ziege	Biotin	1:200	VECTOR	BA9400
Maus igG	Esel	Alexa Fluor™ 488	1:250	Abcam	ab150109
Ratte IgG	Esel	Alexa Fluor™ 594	1:250	Abcam	ab150065

Material und Methoden

Vor der einstündigen Inkubationszeit mit dem ABC-Komplex muss dieser mindestens 30 Minuten vorher aus Reagenz A und Reagenz B in PBS(1x) angesetzt werden. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Zur Visualisierung wurde der DAB-Komplex auf die Objektträger aufgetragen, für 10 Minuten inkubiert und anschließend für 10 Sekunden in Leitungswasser und für fünf Minuten in destilliertem Wasser gespült.

Nachfolgend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 10) dehydriert und mit Xylol-löslichem Eindeckmedium DePeX unter einem Deckglas eingedeckt. Alle Schritte der immunologischen Markierung sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 10: Dehydrierungsprotokoll für murine Gehirnschnitte.

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

Tabelle 11: Arbeitsschritte einer immunhistochemischen Markierung für murine Gehirnschnitte.

Schritt	Ablauf
1	Deparaffinierung und Rehydratation in Xylol und absteigender Alkoholreihe
2	Antigen-Demaskierung („HIER“): zehnminütiges Kochen in Tris/EDTA-Puffer
3	Abkühlen der Gewebeschnitte auf Raumtemperatur
4	Drei Mal fünfminütiges Waschen in PBS(1x)
5	Blocken mit 5 % Normalserum in PBS für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
6	Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer
7	Drei Mal fünfminütiges Waschen in PBS(1x)
8	Blocken mit in 0,35 % Wasserstoffperoxid in PBS(1x) für 30 Minuten unter minimalem Lichteinfall bei Raumtemperatur
9	Drei Mal fünfminütiges Waschen in PBS(1x)
10	Inkubation des Sekundärantikörpers für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
11	Drei Mal fünfminütiges Waschen in PBS(1x)
12	Inkubation des ABC-Komplexes für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
13	Drei Mal fünfminütiges Waschen in PBS(1x)
14	Inkubation des DAB-Komplexes für zehn Minuten
15	Spülen in Leitungswasser für zehn Sekunden
16	Spülen in destilliertem Wasser für fünf Minuten
17	Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol
18	Eindecken in DePeX

2.2.5 Prinzip der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung

Zur Detektion von mehr als nur einem Antigen in einer immunhistochemischen Markierung wurden Immunfluoreszenz (IF)-Doppelmarkierungen durchgeführt. Analog zu der oben beschriebenen Immunhistochemie stellt die Immunfluoreszenz eine indirekte Nachweismethode dar. Das Detektionssystem einer IF basiert ebenfalls auf der Kombination eines Primärantikörpers und eines Sekundärantikörpers. Dabei ist ein fluoreszierender Farbstoff (Fluorochrom) an den Sekundärantikörper gekoppelt.

Die Primärantikörper aus zwei verschiedenen Spezies binden an die nachzuweisenden Antigene. Die Sekundärantikörper binden wiederum spezifisch an die Primärantikörper. Zur allgemeinen

Orientierung erfolgt eine universelle nukleäre Markierung mit dem ebenfalls fluoreszierenden 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die Visualisierung erfolgt an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM6 B). Dabei werden die verschiedenen Fluorochrome durch verschiedene Wellenlängen angeregt. Durch diese Anregung entsteht ein Signal in Form von emittiertem Licht höherer Wellenlänge (Emission). Verschiedene Fluorochrome besitzen unterschiedliche Exzitations- und Emissionswellenlängen. Durch die Kombination mehrerer Fluorochrome mit unterschiedlichem Exzitations- und Emissionsverhalten ist das Abbilden mehrerer Signale an einer Probe durch das Messen in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen (Exzitation 350/50 nm, Emission 460/50 nm, Exzitation 560/40 nm, Emission 645/75 nm, Exzitation 480/40 nm, Emission 527/30 nm) möglich (Abb. 13).

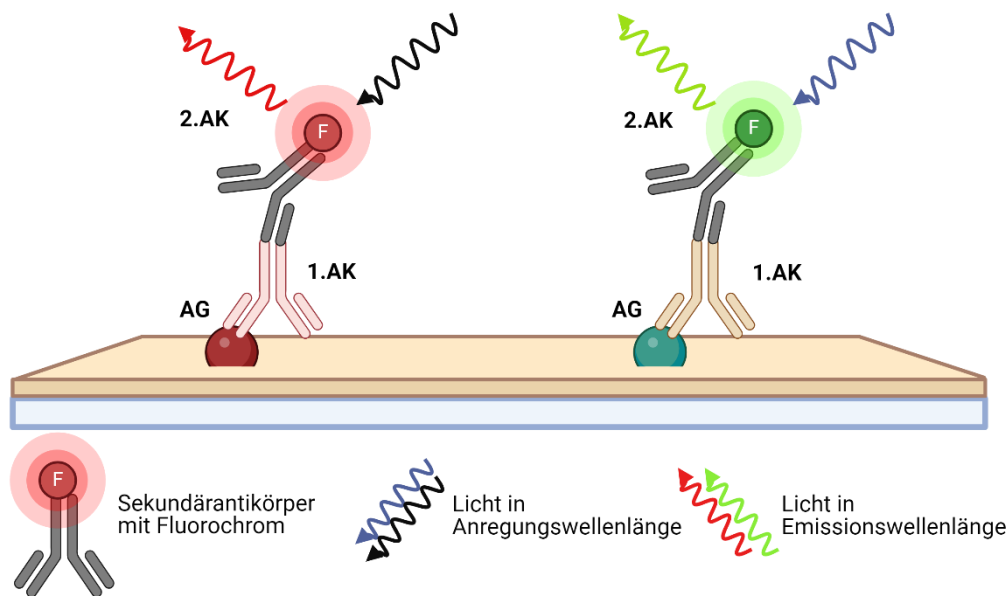


Abbildung 13: Prinzip einer fluoreszierenden Doppelfärbung. Die Detektion eines Antigens (AG) erfolgt anhand zweier Primärantikörper (1. AK) aus verschiedenen Spezies. Diese werden von zwei verschiedenen Sekundärantikörpern (2. AK) mit Fluorochrom (F) detektiert.

2.2.6 Durchführung einer Immunfluoreszenzdoppelmarkierung

Die Arbeitsabläufe der Deparaffinierung, Demaskierung, Blockierung und des Auftragens des Primärantikörpers erfolgten analog zu der chromogenen Immunhistochemie (Tab. 11).

Am zweiten Tag wurden die Sekundärantikörper in 5 % Normal-Eselserum in PBS(1x) verdünnt. Die Inkubation erfolgte über zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Da die Fluorochrome lichtempfindlich sind, wurden die folgenden Arbeitsschritte unter möglichst geringem Lichteinfall durchgeführt. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Gewebeschnitte jeweils drei Mal für fünf Minuten in PBS(1x) gewaschen.

Zum Eindecken der Gewebeschnitte wurde Fluoroshield™ verwendet, in dem DAPI für eine gleichzeitige nukleäre Markierung sorgte. Die Gewebeschnitte wurden nach dem Eindecken bei 4 °C

und im Dunkeln gelagert, um ein „Ausbleichen“ des Fluorochroms und weitere Reaktionen zu verhindern. Die Schritte einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Arbeitsschritte einer Immunfluoreszenzdoppelmarkierung für murine Gehirnschnitte.

Schritt	Ablauf
1	Deparaffinierung und Rehydratation in Xylol und absteigender Alkoholreihe
2	Antigen-Demaskierung („HIER“): zehnminütiges Kochen in Tris/EDTA-Puffer
3	Abkühlen der Gewebeschnitte auf Raumtemperatur
4	Drei Mal fünfminütiges Waschen in PBS(1x)
5	Blocken mit 5 % Normal-Eselserum in PBS für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
6	Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer
7	Drei Mal fünfminütiges Waschen in PBS(1x)
8	Inkubation des Sekundärantikörpers für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
9	Drei Mal fünfminütiges Waschen in PBS(1x)
10	Eindecken und Inkubation der DAPI-Lösung

2.2.7 Negativkontrollen und Kreuzkontrollen einer Immunfluoreszenzdoppelmarkierung

Im Rahmen der Immunhistochemie können die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper unspezifische Bindungen mit proteinergeren Strukturen des Gewebes eingehen. Auch eine hohe endogene Peroxidase-Aktivität oder unspezifische intrinsische Biotin-Avidin-Interaktionen können zu einem unspezifischen Hintergrundsignal führen. Inwieweit der Primärantikörper für die unerwünschten Signale verantwortlich ist, kann zum Teil mittels Negativkontrollen beurteilt werden.

Mit Negativkontrollen kann die Spezifität einer immunhistochemischen Markierung, insbesondere die Spezifität eines Sekundärantikörpers, bewertet werden, weshalb zu jeder Markierung eine Negativkontrolle mitgeführt wurde. Negativkontrollen wurden nicht mit dem Primärantikörper inkubiert, sondern nur mit 5 % Normalserum in PBS(1x). Dies lässt insbesondere eine Interpretation der Validität des Färbeergebnisses der IHC zu.

Bei Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen besteht die Gefahr, dass einer der Sekundärantikörper an den inkongruenten Primärantikörper bindet. Um dies zu überprüfen, wurden zu jeder

Doppelmarkierung Kreuzproben angefertigt. Dabei wurden die Gewebeschnitte nach Inkubation mit dem Primärantikörper mit dem nicht dazugehörigen Sekundärantikörper inkubiert.

2.2.8 Isotypkontrolle und ihre Durchführung

Mit einer Isotypkontrolle kann die Spezifität eines Primärantikörpers bewertet werden. Bei Primärantikörpern unterscheidet man zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörper. Ein polyklonaler Antikörper besteht durch seine wirtsgebundene Herstellung aus mehreren unterschiedlichen Antikörper-Populationen. Er bindet demnach an unterschiedliche Bereiche des Zielantigens. Im Gegensatz dazu weist ein monoklonaler Antikörper, der einem einzigen Ursprungsclon entstammt, nur eine einzige Antikörper-Population auf. Mit Hilfe einer Isotypkontrolle wird überprüft, ob der Fc-Teil eines Primärantikörpers unspezifisch bindet oder durch andere Fc-Rezeptoren im Gewebe gebunden wird. Der Antikörper (AK) der Isotypkontrolle weist den gleichen Fc-Teil wie der verwendete Primärantikörper auf, ist mit seinem variablen Teil jedoch spezifisch für ein im Gewebe nicht vorhandenes Protein. Die Isotypkontrolle sollte demnach ein ähnliches Färbemuster wie die Negativkontrolle aufweisen.

In dieser Arbeit wurde eine Isotypkontrolle zur Überprüfung des Anti-CD3-AK durchgeführt. Die Anti-CD3-AK weisen den Antikörper-Subtyp IgG1 kappa auf. Die immunhistochemische Färbung wurde wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt, wobei ein Schnitt anstatt des Primärantikörpers mit dem Isotypkontroll-Antikörper behandelt wurde. Zusätzlich wurde die Verdünnung des Isotypkontroll-Antikörpers an die Verdünnung des Anti-CD3-AK angepasst. Die Isotypkontrolle des Anti-CD3-AK fiel negativ (Abb. 14) aus, sodass in den Anti-CD3 markierten Schnitten keine unspezifischen Bindungen des Fc-Teils zu erwarten sind.

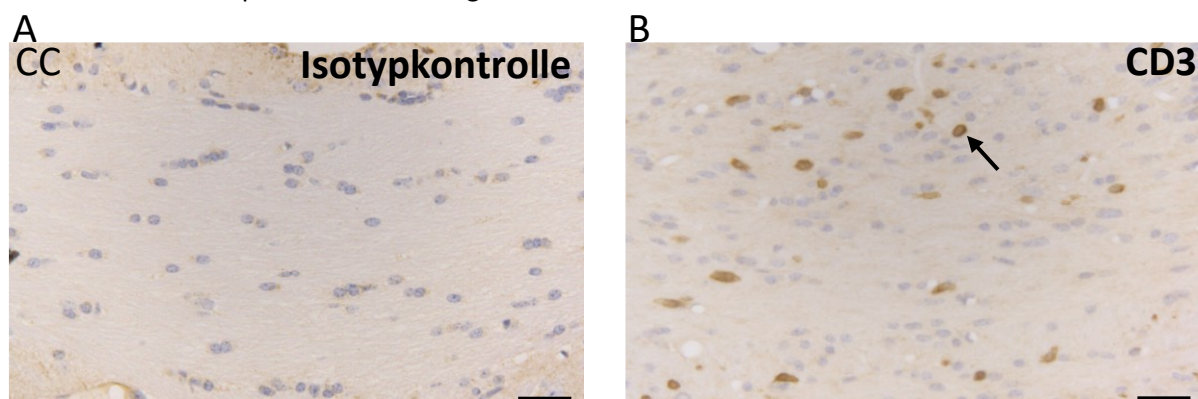


Abbildung 14: Isotypkontrolle des Anti-CD3-Antikörpers. (A) Die Vergrößerung zeigt das Corpus callosum (CC). Der Schnitt wurde mit dem Isotypkontroll-Antikörper und Hämatoxylin markiert und zeigt weiter kein CD3-spezifisches Markierungsmuster. (B) Die Vergrößerung zeigt ebenfalls das Corpus callosum. Der Schnitt wurde mit dem Anti-CD3-AK markiert und zeigt ein CD3-spezifisches membranöses Markierungsmuster (siehe Pfeil). Maßstab (A,B): 25 µm.

2.3 Genexpressionsanalysen

2.3.1 Gewebeaufbereitung

Um die Anheftungsstelle molekularbiologisch zu charakterisieren, wurde anhand der mRNA-Menge auf die Expression verschiedener struktureller und glialer Gene geschlossen. Zur mRNA-Isolation wurden Gehirne muriner Kontrolltiere nativ entnommen. Die Mäuse wurden, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, anästhesiert und auf Schmerzreflexe überprüft. Bei Ausbleiben der Schmerzreflexe wurde der Kopf vom restlichen Körper mit einer großen Schere abgetrennt. Nach Eröffnung der Schädelkalotten und Präparation des Gehirns wurde dieses direkt in flüssiges Isopentan (-60°C) überführt. Nach fünf Minuten wurde das schockgefrorene Gehirn zur Aufbewahrung in Aluminium-Folie gewickelt und bei -80°C gelagert (siehe Kapitel 2.1.6.2).

Das kleine Gewebeareal der Anheftungsstelle wurde mittels der Technik der Laser Capture Microdissection (LCM) vom restlichen Gewebe isoliert. Die LCM ist eine lasergestützte Mikrodissektionstechnik, mit der unter mikroskopischer Sicht gezielt einzelne Zellen oder Gewebeareale von einem Schnitt isoliert werden können, ohne sie dabei zu beschädigen. Dieser Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. phil. nat. Björn Schneider aus dem Institut für Pathologie in Rostock durchgeführt.

2.3.1.1 Prinzip der Laser Capture Microdissection

In dieser Studie wurde das PALM MicroBeam® Mikroskop von Zeiss verwendet. Hierbei wird die Laser Pressure Catapult-Technologie genutzt. Das zu untersuchende Gewebeareal wird zunächst manuell mit Hilfe der PALM RoboSoftware® markiert, sodass der Tisch mit der Probe sich entlang einer entsprechenden Koordinationsachse bewegt. Die Probe wird so entlang eines fixen Laserstrahls mit einer Wellenlänge von 355nm geführt. Anschließend wird mittels eines Laserimpulses das Gewebeareal in einen adhäsiven Deckel eines an der Auffangvorrichtung fixierten Reaktionsgefäßes katapultiert. Das aufgefangene Material kann in dem Reaktionsgefäß bei -80°C aufbewahrt und für weitere Analysen verwendet werden.

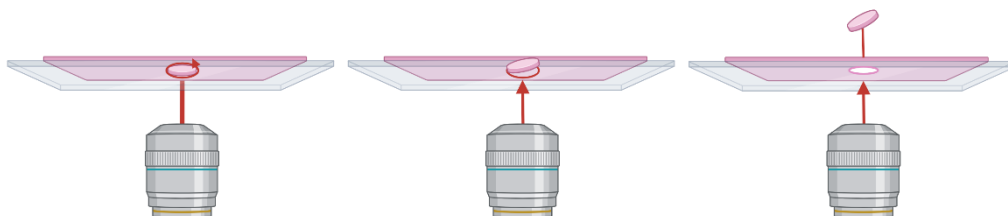


Abbildung 15: Prinzip der Laser Capture Microdissection nach Laser Pressure Catapult-Technologie. Die Probe wird entlang eines fixen Laserstrahls mit einer Wellenlänge von 355nm geführt. Mittels eines Laserimpulses wird das Gewebeareal entgegen der Schwerkraft in ein Auffanggefäß katapultiert.

2.3.1.2 Kryostat-Einbettung und Schnitt für Laser Capture Microdissection

Das Einbetten der gefrorenen Gehirne erfolgte direkt auf einer -20°C Knopfhalterung mit einem Gewebeeinbettmedium (Tissue Tek™, Sakura). Nach Einbettung wurden jeweils vier $10\mu\text{m}$ dicke

Schnitte an einem Rotations-Kryostat-Mikrotom (Leica, CM3050 S) bei -20°C angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Für die LCM wurden spezielle, mit einer Polyethylen Naphthalat (PEN) Membran beschichteten, Objektträger (Arcturus™, LCM0522, ThermoFisher) verwendet. Die Objektträger wurden vor dem Aufziehen der Schnitte für 30 Minuten mittels UV-B Licht desinfiziert, um den natürlichen Kontaminationsgrad der Objektträger (-17°C Objekttemperatur) für die nachfolgende RNA-Isolation gering zu halten. Aufgrund der lasergestützten Methode wurden die Schnitte nicht unter ein Deckglas eingedeckt. Die Schnitte wurden bei -80°C gelagert.

2.3.2 RNA-Isolation

2.3.2.1 Prinzip der RNA-Isolation

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy Mikro Kit von Qiagen verwendet, welches auf der Methode von Chomczynski *et al.* (1987) basiert. Das Prinzip beruht auf einer RNA-bindenden Silicagel-Membran, die sich in einem Reaktionsgefäß befindet und für restliche Bestandteile eines Homogenats durchlässig ist. Die Proben wurden zunächst unter Zugabe eines Lysepuffers lysiert und mechanisch homogenisiert. Dieser enthält β -Mercaptoethanol und Guanidium-Isothiocyanat, welche RNasen und andere Enzyme/Proteine inaktivieren. Das Lysat wird anschließend durch eine gDNA-Eliminator-Spin-Säule geleitet. Durch Zugabe eines konzentrierten salzhaltigen Puffers sowie einer DNase wird genomische DNA selektiv entfernt. Es wird Ethanol hinzugegeben, um die RNA in optimale Bindungsbedingungen für die Silicagel-Membran der Spin-Säule zu bringen. In mehreren Waschschritten werden Kontaminationen entfernt und die RNA, welche an der Membran haften bleibt, wird abschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert.

2.3.2.2 Durchführung der RNA-Isolation

Das gesammelte Gewebe wurde zunächst in 150 μ l RLT®-Lysepuffer gelöst, der mit 1,5 μ l β -Mercaptoethanol versetzt wurde. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und mit weiteren 150 μ l RLT®-Lysepuffer aufgefüllt. Jeder weitere Zentrifugationsschritt wurde bei 20-25°C und $\geq 10,000$ rpm durchgeführt. Die Proben wurden anschließend für 30 Sekunden mit Hilfe eines Kleinschüttlers (Multi Vortex Genie Pulse, 3000 rpm) homogenisiert. Im nächsten Schritt wurde dem homogenisierten Lysat 300 μ l 70% Ethanol hinzugegeben und durch leichtes Auf- und Abpipettieren vermengt. Im Anschluss wurden die Proben den Spin-Säulen zugeleitet und für 15 Sekunden zentrifugiert. Der bei der Zentrifugation entstandene Durchfluss wurde verworfen. Die verwendeten Spin-Säulen wurden weiteren Waschschritten unterzogen, welche in Tabelle 13 aufgeführt sind.

Tabelle 13: Arbeitsschritte einer RNA-Isolation mit dem RNeasy-Spin-Säulen System von Qiagen.

Schritt	Ablauf
1	Nach Mikrodisektion, Zugabe von 150 µl RLT Lysepuffer und kurze Zentrifugation
2	Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, Zugabe von 150 µl RLT® Lysepuffer
3	Vortexen für 30 Sekunden
4	Zugabe von 300 µl 70% Ethanol, leichtes Auf- und Abpipettieren
5	Überführung in eine RNeasy-Spin-Säule, 15 Sekunden Zentrifugation, Durchfluss verwerfen, Reaktionsgefäß für die RNeasy-Spin-Säule wiederverwenden
6	Zugabe von RW1® Puffer, 15 Sekunden Zentrifugation, Durchfluss verwerfen, Reaktionsgefäß für die RNeasy-Spin-Säule wiederverwenden
7	10 µl DNase I stock Lösung zu 70 µl RDD® Puffer geben, leichtes Schwenken
8	DNase I Inkubations Mix (Schritt 7) zur RNeasy-Spin-Säule (Schritt 6) geben, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
9	Zugabe von 350 µl RW1® Puffer, 15 Sekunden Zentrifugation, Durchfluss und Reaktionsgefäß verwerfen
10	RNeasy-Spin-Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß geben, Zugabe von 500 µl RPE® Puffer, 15 Sekunden Zentrifugation, Durchfluss verwerfen, Reaktionsgefäß für die RNeasy-Spin-Säule wiederverwenden
11	Zugabe von 500 µl 80% Ethanol, 2 Minuten Zentrifugation, Durchfluss und Reaktionsgefäß verwerfen
12	RNeasy-Spin-Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß geben, 5 Minuten Zentrifugation mit offenem Deckel, Durchfluss und Reaktionsgefäß verwerfen
13	RNeasy-Spin-Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß geben, Zugabe von 14 µl RNase freies Wasser, 1 Minute Zentrifugation
14	RNeasy-Spin-Säule vorsichtig entfernen, Durchfluss ergibt Eluat, bei -80 °C aufbewahren

Die RNA-Qualität wurde durch Ermittlung der RNA-Integritätsnummer (engl. *RNA Integrity Number*, RIN), die als standardisierte Zahl von 1 bis 10 angegeben wird, am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Kalifornien, USA) überprüft. Die Technologie basiert auf einer automatisierten elektrophoretischen Trennung von RNA-Proben. Die RNA-Proben werden in kleinen Kanälen eines mikrofabrizierten Chips entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt, mittels laserinduzierter Fluoreszenzdetektion nachgewiesen und in Form eines Elektropherogramms dargestellt. Die Biosizing Software berechnet das Verhältnis der beiden ribosomalen 28S und 18S Banden, aus dem die RIN resultiert. RIN Werte von 6 bis 10 zeigen eine

gut erhaltene Integrität der untersuchten RNA an. Die RIN, der isolierten RNA-Proben dieses Experimentes, betrugen im Durchschnitt einen Wert von 7,1 [112].

2.3.2.3 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels fluoreszenzbasiertem RNA-Messungssystem (QuantiFluor® RNA System, Promega) am Quantus™ Fluorometer (Promega Corporation, Fitchburg, USA) ermittelt, welches RNA-Konzentrationen bis zu 0,1 ng/μl detektieren kann. Es wurde je isolierter Probe 1 μl in einem PCR Reaktionsgefäß in dem Fluorometer analysiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen und automatisch auf die Konzentration der Probe korreliert.

2.3.3 Reverse Transkription und cDNA-Amplifikation

Bei der Extraktion der Anheftungsstelle aus murinen Gehirnen mittels LCM handelte es sich um sehr kleine Probengrößen, aus den folglich sehr geringe RNA Mengen isoliert wurden. Im nächsten Schritt wurde die mRNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) transkribiert und anschließend mittels Whole Transkriptome Amplifikation (WTA)-Technologie amplifiziert. Dies garantierte eine ausreichende Menge an cDNA für folgende Genexpressionsanalysen. In dieser Studie wurde das WTA2-Kit von Sigma verwendet.

2.3.3.1 Prinzip der reversen Transkription

Die WTA-Technologie basiert auf zwei Schritten, ein Überblick ist in Abbildung 16 dargestellt. Im ersten Schritt wird eine reverse Transkription durchgeführt. Um die gDNA-freien RNA Proben mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR, Kapitel 2.3.4) analysieren zu können, muss die RNA in cDNA transkribiert werden. Bei dieser Technologie werden zunächst mithilfe von Primern (zufälliges 3'-Ende mit universellem 5'-Ende) durch Bindung komplementärer DNA-Bausteine und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität DNA-Einzelstränge synthetisiert. Die verdrängten DNA-Einzelstränge dienen als neue Matrizen für weitere Primerbindung und -verlängerung durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität einer reversen Transkriptase, was zur Entstehung doppelsträngiger cDNA führt. Die Primer binden an zufälligen Stellen der RNA, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass RNA in cDNA umgeschrieben wird, für alle Bereiche der RNA ungefähr gleich ist. Es entsteht eine sogenannte cDNA-Bibliothek bestehend aus zufälligen, sich überlappenden Fragmenten von 100 bis 1.000 Basen, die von universellen Poly-A-Endsequenzen umgeben sind. Die universellen Endsequenzen dienen als Andockstellen für sogenannte Adapter. Ein Adapter ist ein kurzes Stück komplementärer DNA, das in den weiteren Schritten (siehe Kapitel 2.3.3.2) eine bekannte Vorlage für universelle Primer darstellt.

Im zweiten Schritt der WTA-Technologie kommt es zur Amplifikation der cDNA-Bibliothek auf der Basis einer PCR mittels einer WTA-Polymerase sowie Primern.

2.3.3.2 Durchführung der reversen Transkription

Nach der Konzentrationsbestimmung der RNA wurde der gesamte Ertrag (10 µl) der RNA je Probe unverdünnt in eine Synthese-Lösung des verwendeten Kits in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei 70 °C für 5 Minuten im Thermomixer (ThermoMixer C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) denaturiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein Reaktionsgefäß enthielt statt RNA 10 µl RNase freies Wasser und wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Den Proben wurde folgend ein Mix aus einem Primer enthaltenden Synthese-Puffer, Reinstwasser und einer RNA- sowie DNA-abhängigen DNA Polymerase zugegeben und durch mehrmaliges Pipettieren gemischt. Das Gemisch wurde schrittweise auf 37 °C erhitzt und für 30 Minuten inkubiert. Bei 70 °C für 20 Minuten wurde die Polymerase inaktiviert.

2.3.3.3 Prinzip der Amplifikation mittels PCR

Bei der PCR wird die cDNA anhand von passenden Nukleotiden (Desoxynukleotidtriphosphat Mix, dNTP) und einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Temperaturoptimum bei 70 °C) vervielfältigt. Die PCR läuft in drei Schritten ab, die sich insgesamt 17 Mal zyklisch wiederholen. Zu Beginn des PCR Programms wird die Polymerase bei 94 °C aktiviert. Im nächsten Schritt erfolgt eine Denaturierung der DNA bei ebenfalls 94 °C. Hier kommt es zur Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären Basenpaare und Aufspaltung der Doppelhelix. Dies ermöglicht die Hybridisierung der Primer an die komplementären DNA-Basen der Adapter der Einzelstränge der cDNA. Die für die Elongation verwendete thermostabile Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei 70 °C. Die Polymerase bindet an das Primer-DNA-Hybrid und verlängert den Primer in 5'-3'-Richtung zu einem komplementären DNA-Strang. Die Polymerase verknüpft die 5'-Phosphatgruppe der dNTP mit der Hydroxylgruppe am wachsenden 3'-Ende des DNA-Strangs. Nach dem ersten Zyklus sind die Stränge der Ausgangs-DNA und DNA-Kopien vorhanden. In den weiteren Zyklen wird die DNA vervielfältigt. Eine Amplifikation der DNA findet statt, solange ausreichend Nukleotide und Primer vorhanden sind. Bei steigender Anzahl von Amplifikationsprodukten stagniert die Vermehrungsrate.

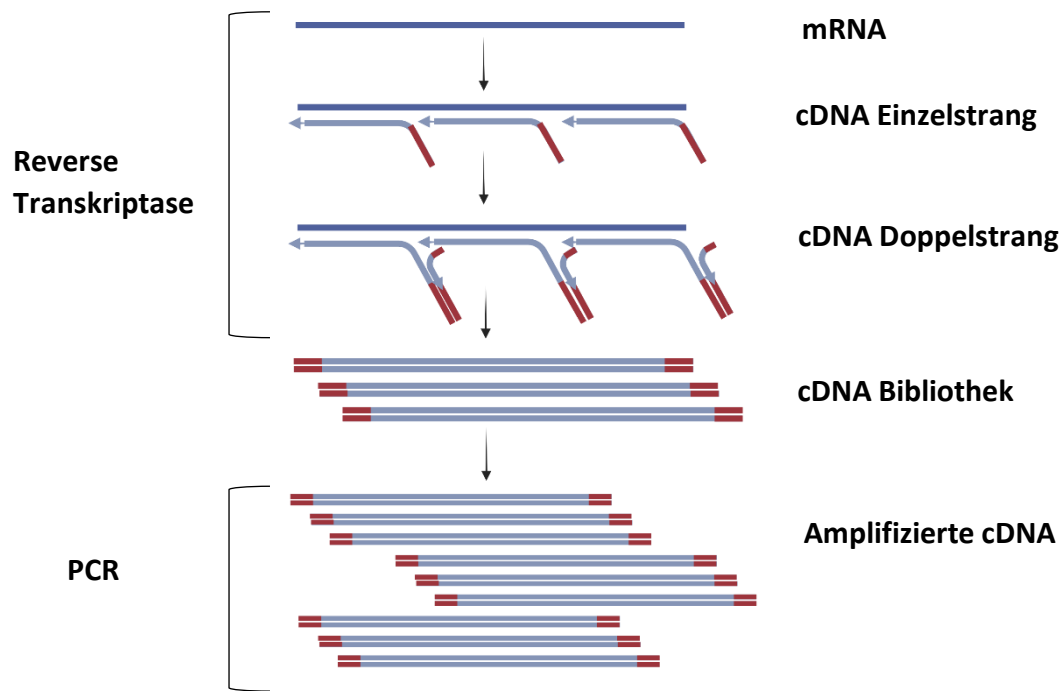


Abbildung 16: Ablauf der Whole Transkriptome Amplifikation. Die eingesetzte isolierte mRNA Menge wird im ersten Schritt mittels einer reversen Transkriptase in eine cDNA Bibliothek übersetzt. Die Pfeile zeigen die Syntheserichtung an, die roten Bereiche stellen die Primer dar. Im zweiten Schritt wird die cDNA mittels einer PCR amplifiziert. Die Proben sind bereit zur weiteren Genexpressionsanalyse.

2.3.3.4 Durchführung der Amplifikation mittels PCR

Nach kurzer Zentrifugation wurden jeweils 50 µl eines Mastermix gemäß Tabelle 14 den Reaktionsgefäßen der cDNA Synthese hinzugegeben und durch mehrmaliges Pipettieren gemischt. Die Proben wurden unter einem Programm, siehe Tabelle 15, in einem Thermozykler (Peqlab, Primus25 advanced Thermocycler) inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 14: Mastermixzusammensetzung für die Amplifikation mittels PCR.

Reagenz	Menge/1 Probe
Reinstwasser	40,25 µl
Amplifikationspuffer	7,5 µl
WTA dNTP Mix	1,5 µl
Amplifikationsenzyme	0,75 µl

Tabelle 15: PCR-Programm der WTA2-Technologie von Sigma.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94 °C	2 Minuten	17 Zyklen
2	94 °C	30 Sekunden	
3	70 °C	5 Minuten	

2.3.3.5 Konzentrationsmessung der cDNA

Zur Quantifizierung der amplifizierten cDNA wurde die Methode der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung des NanoPhotometer® NP80 (Implen GmbH, München, Deutschland) verwendet. Es wurde je Probe 1 µl auf den Sensor gegeben. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (siehe Kapitel 2.3.2.3) gemessen und so automatisch auf die Konzentration der Probe geschlossen. Die cDNA Konzentration jeder Probe wurde entsprechend auf einen vergleichbaren Wert verdünnt und beträgt ungefähr 870 ng/µl.

2.3.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative PCR (qPCR) ermöglicht, anders als die konventionelle PCR, einen Vergleich von Genexpressionsstärken verschiedener Proben. Im Unterschied zu der PCR der WTA-Technologie wird kein Adapter verwendet. Hier werden jeweils zwei Primer, die komplementär zum 3'-Ende des Matrizenstrangs (Reverse Primer) und des Nichtmatrizenstrangs (Forward Primer) der Zielregion (des zu untersuchenden Gens) binden, verwendet. Zur Etablierung der jeweiligen optimalen Annealing Temperatur wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, bei der durch den Thermozykler an jeder Position eine andere Temperatur erzeugt wird. Der Temperaturbereich wurde etwa 10 °C unterhalb des Schmelzpunktes der Primer laut Hersteller gewählt.

2.3.4.1 Prinzip der qPCR

Bei der qPCR kommt es zu Beginn ebenfalls zur Aktivierung der Polymerase und Denaturierung der cDNA in Einzelstränge. Im nächsten Schritt erfolgt die Hybridisierung der Primer (Annealing) an die komplementären DNA-Basen der Einzelstränge der cDNA, für jeden Primer in einer jeweiligen optimalen Annealing-Temperatur. Für jedes Primer-Paar wurde diese Temperatur ermittelt und liegt zwischen 56 °C und 64 °C (Tab. 18). Bei der qPCR wird der interkalierende fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green® genutzt. SYBR-Green lagert sich in die doppelsträngige DNA ein und wird dadurch zur Fluoreszenz angeregt. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz des gebundenen Fluorophors in relativen Fluoreszenzeinheiten gemessen und in Abhängigkeit der Zyklusanzahl als Kurve dargestellt. Man spricht von einem Schwellenwertzyklus (engl. *threshold cycle*, CT-Wert), sobald die Kurve einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Der CT-Wert stellt eine theoretische Größe dar und wird so gewählt, dass sich das Fluoreszenzsignal eindeutig von dem Hintergrund abhebt, sich aber noch im exponentiell verlaufenden Bereich der Kurve befindet.

Die Kurve der qPCR lässt sich in vier Phasen einteilen. Bei einer fehlerfreien qPCR nimmt die Kurve eine sigmoidale Form an. In der ersten Phase der qPCR hebt sich das Fluoreszenzsignal noch nicht vom Hintergrund ab, da das System nicht sensitiv genug für die Detektion des Fluoreszenzsignals der ersten Zyklen ist. Während der exponentiellen Phase kommt es durch die theoretische Verdopplung der DNA-Menge zu einem exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Mit jedem

weiteren Zyklus werden Reaktionskomponenten verbraucht, sodass es ab einem Punkt zum Abfall der Effizienz der Reaktion kommt. Das exponentielle Wachstum der Kurve stagniert zunehmend. Eine Plateauphase wird erreicht, wenn schließlich keine weitere Amplifikation stattfindet.

Im Anschluss der qPCR wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse die Qualität des amplifizierten Produkts geprüft. Hierfür wurde die Temperatur alle 30 Sekunden von 55 °C bis auf 95 °C in 0,5 °C Temperaturschritten erhöht, um den Schmelzpunkt des PCR-Produkts zu ermitteln. Nach jedem Temperaturschritt wird das Fluoreszenzsignal gemessen. Wird die Schmelztemperatur und somit die Denaturierung des DNA-Produkts (>50%) erreicht, kommt es zu einem starken Abfall des Fluoreszenzsignals. Das liegt daran, dass SYBR-Green® während der Denaturierung ebenfalls dissoziiert und weniger fluoresziert als in der DNA eingelagert. Die erste Ableitung der Schmelzkurve stellt den Abfall des Fluoreszenzsignals als deutliches Maximum dar. Ist mehr als ein Maximum in der Ableitung der Schmelzkurve zu erkennen, kann dies auf entstandene Nebenprodukte hinweisen. Ein von anderen Proben abweichendes Temperaturmaximum gibt ebenfalls einen Hinweis auf ein falsches Produkt. In dieser Studie wurden Proben mit mehreren und falschen Maxima aus der Quantifizierung ausgeschlossen.

2.3.4.2 Durchführung der qPCR

Zur Erstellung der internen Standardreihe wurde aus allen Proben das gleiche Volumen entnommen und in ein Reaktionsgefäß gemischt. Aus diesem internen Standard wurde dann eine siebenfache 1:1 Verdünnungsreihe erstellt. Das Probenvolumen jeder Verdünnungsstufe wurde 1:10 verdünnt und in die qPCR eingesetzt.

Ein Mastermix wurde wie in Tabelle 16 aufgeführt angesetzt. 8 µl des Mastermix und 2 µl Probe (in 1:100 Verdünnung) wurden in den vorgesehenen Positionen einer 96-Well-Mikrotiterplatte gemischt und kurz zentrifugiert. Der Negativkontrolle der WTA (Kapitel 2.3.3.2) sowie einer weiteren Negativkontrolle und Positivkontrolle wurden ebenfalls Mastermix zugegeben, die bei jeder qPCR mitgeführt wurden. Zur Mittelung von Pipettier-Ungenauigkeiten wurden die Proben und die Standardreihe in Dubletten gemessen. Die Messung erfolgte im CFX Connect Thermozykler (BioRad, Hercules, USA) mit der CFX Maestro Software. Das Programm der qPCR ist in Tabelle 17 dargestellt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 16: Mastermixzusammensetzung für die qPCR.

Reagenz	Volumen/ Probe
SensiMix	5 µl
Forward Primer (1:10)	0,5 µl
Reverse Primer (1:10)	0,5 µl
Reinstwasser	2 µl

Tabelle 17: qPCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95 °C	10 Minuten	Initialisierung
2	95 °C	15 Sekunden	40 Zyklen
3	56-64 °C	30 Sekunden	
4	72 °C	30 Sekunden	
5	95 °C	1 Minute	Schmelzpunktanalyse
6	55 + 0,5 °C	30 Sekunden	
7	95 °C	1 Minute	

Tabelle 18: Verwendete Primer.

Primer	5'-3'	Annealing-Temperatur	Produktlänge
GFAP_forward	TCTCGAATGACTCCTCCACTC	64 °C	243kb
GFAP_reverse	AAGCTCCGCCTGGTAGACAT		
IBA1_forward	ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	60 °C	144kb
IBA1_reverse	CAGCATTCGCTTCAAGGACATA		
CX43_forward	AATTTACTGGGTGGCATCCTAGA	60 °C	200kb
CX43_reverse	GGGAAAGCATCATCGTAACAGAT		
CLDN1_forward	CTCCTGTCCCCGGAAAACAA	56 °C	302kb
CLDN1_reverse	GCAGCAGTTCACAGGCAAAA		
JAM1_forward	AACTGTAATGGGCACCGAGG	56 °C	252kb
JAM1_reverse	TAGGGAGCTGTGATCTGGCT		
LAMB1_forward	CTAATTCCTTCTTTGGGCCG	60 °C	311kb
LAMB1_reverse	ATGTCGAAGTCACGGAGAGC		
18S_forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA	64 °C	186kb
18S_reverse	GCTGGAATTACCGCGGCT		

2.4 Auswertung

2.4.1 Untersuchte Hirnregion

Um die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* reproduzierbar und valide zu untersuchen, ist es wichtig, die genaue Lokalisation zu definieren. In dieser Studie wurde die untersuchte Hirnregion (engl. *region of interest*, ROI) anhand des Maushirn-Atlas nach Sidman *et al.* festgelegt (www.hms.harvard.edu/research/brain). Die Anheftungsstelle im dritten Ventrikel dehnt sich in frontalen Serienschritten zwischen Region 255 und Region 265 aus. Hirnregion 255 liegt okzipital der *Commissura anterior* auf Höhe des Subfornikal-Organs (SFO), und Hirnregion 265 ist auf Höhe des dorsalen Hippocampus lokalisiert. Region 255 entspricht den stereotaktischen Koordinaten Bregma -0.82 mm und Region 265 Bregma -1.01 mm. Bregma dient als Referenzpunkt zur Orientierung im murinen Gehirn (Maushirn-Atlas von Franklin und Paxinos) und stellt den Punkt dar, an dem die *Sutura coronalis* und die *Sutura sagittalis* aufeinandertreffen (0.00 mm).

Die Anheftungsstelle als ROI wurde in den Gewebeschnitten als eine dorsale Kontaktstelle am Hirnparenchym zum *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel gewertet.

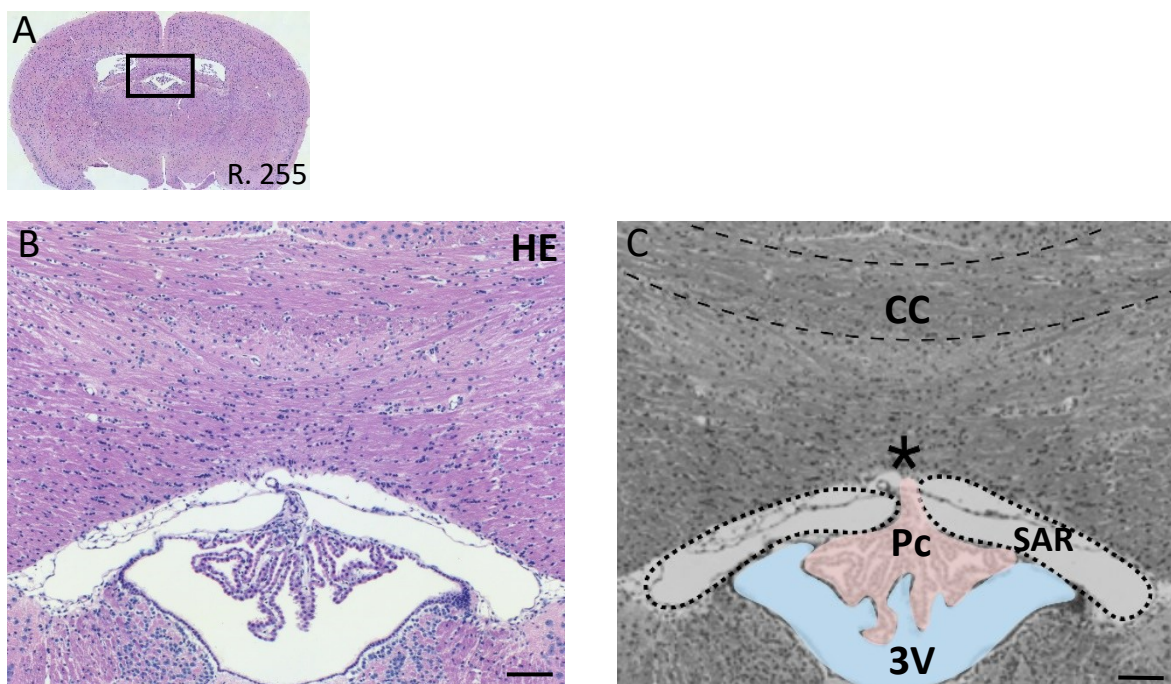


Abbildung 17: Untersuchte Hirnregion, HE-Färbung. (A) Übersicht der Hirnregion, welche sich in frontalen Serienschritten zwischen dem Subfornikalorgan (SFO, hier nicht dargestellt) und dem dorsalen Hippocampus erstreckt. (B,C) Die Vergrößerung zeigt den dritten Ventrikel (3V), den Subarachnoidalraum (SAR) und den hineinragenden Plexus choroideus (Pc). Am Dach des dritten Ventrikels befindet sich im Parenchym die Anheftungsstelle (*) des Plexus choroideus. Dorsal der Anheftungsstelle befindet sich der mediale Teil des Corpus callosum (CC). Maßstab (B,C): 50 µm.

2.4.2 Auswahl der Hirnregionen für Genexpressionsanalysen

Die Anheftungsstelle als ROI wurde in diesem Experiment in den Gewebeschnitten als eine dorsale Kontaktstelle am Hirnparenchym zum *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel gewertet. Mittels der Laser Capture Microdissection (Kapitel 2.3.1.1) wurde die Anheftungsstelle in mehreren Schritten aus dem Gewebeschnitt isoliert und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die gelaserten Areale waren im Schnitt jeweils 1000 μm^2 groß und wurden mit einem 20x Objektiv visualisiert. Es wurden zusätzlich zwei weitere Referenzregionen aus dem Gewebeschnitt gelasert. Die Referenzregionen befanden sich in den *Fimbriae hippocampi* sowie im *Cortex* an der Gehirnoberfläche.

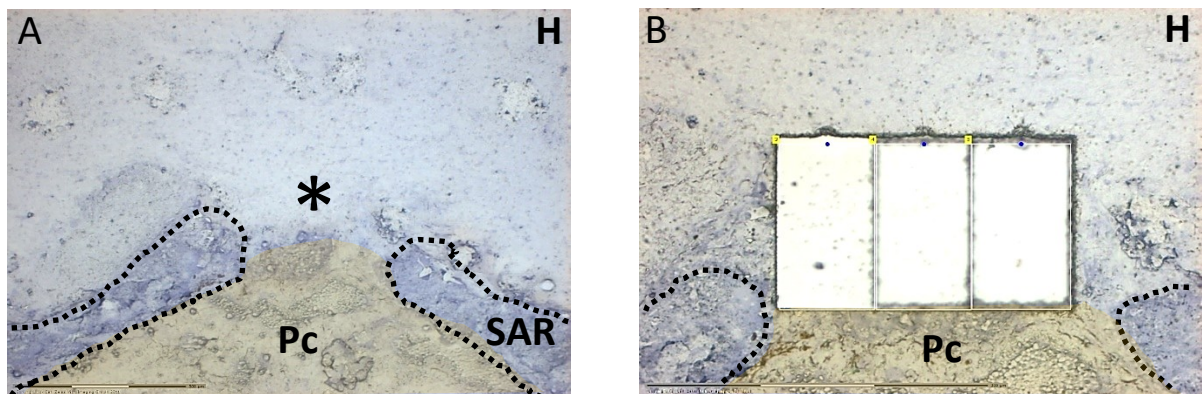


Abbildung 18: Untersuchte Hirnregion, Hämatoxylin-Färbung (H). (A) Hirnregion, welche die Anheftungsstelle (*) des Plexus choroideus (Pc, gelb markierte Fläche) als Kontaktstelle am Hirnparenchym zeigt. Der Plexus choroideus grenzt dorsal an den Subarachnoidalraum (SAR). (B) Die Vergrößerung zeigt drei Leerstellen von isolierten Gewebearealen der Anheftungsstelle, die mittels der Laser Capture Microdissection angefertigt wurden. Maßstab (A): 50 μm , (B): 25 μm .

2.4.3 Auswertung Histologie

Aufnahmen chromogener Markierungen wurden mit einem am Mikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) installierten Kamerasystem (DMC 6200, Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden Fotos von Gewebeschnitten einer Markierung in einer Sitzung erstellt. Dabei wurden die Belichtungseinstellungen der Kamera am ersten Gewebeschnitt optimiert und für weitere Aufnahmen beibehalten. Zur Darstellung größerer Areale eines Schnittes wurden einzelne Aufnahmen durch die Software Leica Application Suite X (Wetzlar, Version 3.4.2) zusammengesetzt. Computergestützte Auswertungen erfolgten mit der frei verfügbaren ImageJ-Software (ImageJ Software 1.5.3. für Windows; Wayne Rasband, NIH, USA). In dieser Arbeit wurden für jede Färbung jeweils zwei Schnitte eines Tieres ausgewertet. Die genaue Anzahl der verwendeten Tiere ist den folgenden Ergebnissen zu entnehmen.

2.4.4 Quantifizierung der optischen Dichte

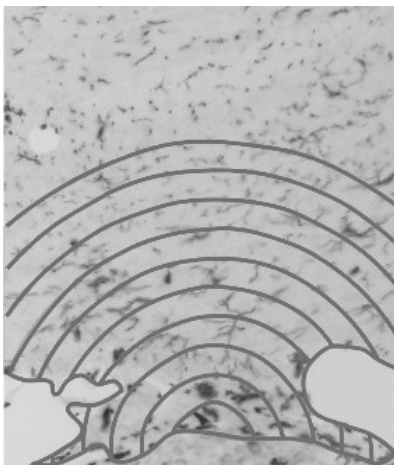
Die Quantifizierung sehr eng aneinander liegender Zellen erfolgte mittels semiautomatischer Dichtemessungen der Farbeintensität. Die optische Dichte von Mikroglia-Zellen/Makrophagen wurde in Anti-IBA1 markierten Schnitten quantifiziert. Die optische Dichte von Astrozyten wurde in

Anti-GFAP markierten Schnitten quantifiziert. Die histologischen Aufnahmen wurden zunächst mit einem 20x Objektiv und dem in Kapitel 2.2.5 genannten Kamerasystem digitalisiert. Es wurden zusätzlich Aufnahmen einer Referenzregion sowie bekannter *Membranae limitans gliae* angefertigt. Die Referenzregion befand sich in den *Fimbriae hippocampi*, wie die ROI periventrikulär im Marklager gelegen (Abb. 17A).

Zur Darstellung einer Änderung der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Entfernung zu einem bestimmten Punkt (hier: der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*) wurde eine von Robert Haag (ehemaliger Doktorand der Arbeitsgruppe Prof. Kipp) für diese Arbeit geschriebene Befehlszusammenfassung verwendet. Die Aufnahmen wurden verblindet in ImageJ importiert und die richtige Skalierung der Pixel und des Maßstabes des verwendeten Kamerasystems sichergestellt. Mit der Funktion „polygonale Auswahl“ und der Hochstell-Taste konnten mehrere Regionen manuell ausgewählt werden. Zuerst wurden die Regionen markiert, die aus der densitometrischen Messung ausgeschlossen werden sollten. Hierzu gehörten Strukturen, welche die Messungen verfälschen könnten: Ventrikellumen, Ependym, *Plexus choroideus* und im Parenchym gelegene Gefäßlumen. Anschließend erfolgte die Markierung eines Punktes in der definierten ROI, von dem eine parallele Expansion von zehn Halbkreisen im Abstand von 25µm zueinander ausgehen sollte. Durch Überlagerung beider Bildtypen wurden die auszuschließenden Strukturen von der definierten ROI subtrahiert.

Der resultierende Bildtyp wurde anschließend in ein „8-Bit-Graustufenbild“ (engl. *8-bit-greyscale*) geändert. Um die Analyse der optischen Dichte für alle importierten Aufnahmen zu vereinheitlichen, wurde ein Schwellenwertalgorithmus (engl. *Threshold*) festgelegt. Durch diesen angelegten Threshold wird jeder Pixel in der importierten Aufnahme als eindeutig „schwarz“ oder eindeutig „weiß“ zugeordnet, indem die importierte Aufnahme in einen binären Bildtyp umgewandelt wurde. Sowohl die ROI als auch die Referenzregion wurden mit demselben Threshold ausgewertet (Tab. 19). Die von ImageJ durchgeführte Analyse „Area fraction“ bestimmt den Anteil an schwarzen Pixeln (spezifische immunhistochemische Markierung) im Verhältnis zu weißen Pixeln (kein spezifisches Signal im Hirnschnitt) und gibt einen Prozentwert in der Einheit „[%] Area“ an. Für die folgenden immunhistochemischen Markierungen wurden jeweils „Threshold“-Messungen ausgewählt, die das ursprüngliche, spezifische Markierungsmuster der immunhistochemischen Markierung am besten widerspiegeln: anti-IBA1-Markierung: Threshold „Default“, anti-GFAP-Markierung: ebenfalls Threshold „Default“.

Tabelle 19: Arbeitsschritte bei der Quantifizierung der optischen Dichte mit ImageJ. Hier zu sehen: IBA1-Markierung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel, semiautomatische Anlage konzentrischer Halbkreise.

Funktion in ImageJ	Abbildung	Beschreibung
- „polygonale Auswahl“		1. Markierung von zu exkludierenden Strukturen (Bild 1) 2. parallele Expansion von zehn Halbkreisen in 25µm Abständen (Bild 2) 3. Subtraktion Bild 1 von Bild 2 (Ergebnis siehe Abbildung)
- „Image“ - „Type“ - „8bit“		4. Mit der „8bit“ Funktion wird die importierte Aufnahme in ein Graustufenbild umgewandelt.
- „Image“ - „Adjust“ - „Threshold“		5. Nach Umwandlung der Aufnahme wird durch die Auswahl eines „Thresholds“ ein binäres Format erstellt. Es wird die relative Dichte der ausgewählten Region gemessen (Strg + M). Das Ergebnis wird in Prozent der Fläche angegeben.

2.4.5 Quantifizierung der Zelldichte

Nach Durchführung der immunhistochemischen Markierungen wurde zusätzlich eine nukleäre Gegenfärbung mit Hämatoxylin angefertigt. Von jedem Hirnschnitt wurden Aufnahmen als eine zusammenhängende Übersicht an dem in Kapitel 2.3.2 genannten Mikroskop und Kamerasystem aufgenommen. Alle Aufnahmen wurden mit den selben Einstellungen am Mikroskop angefertigt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

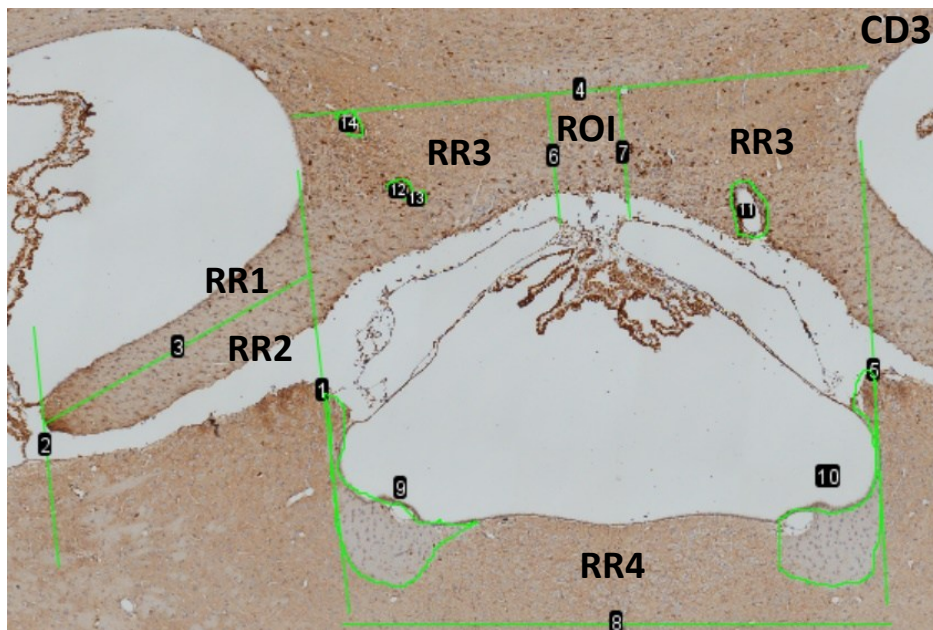


Abbildung 19: Unterteilung der verschiedenen Referenzregionen (RR1-4) und der „region of interest“ (ROI). Mit Hilfe eines definierten Schemas konnten anhand verschiedener topographischer Punkte die Regionen voneinander abgegrenzt werden. Zu sehen sind die Referenzregion 1 (RR1): Fimbriae hippocampi parietaler Teil, Referenzregion 2 (RR2): Fimbriae hippocampi basaler Teil, Referenzregion 3 (RR3): laterale Ausläufe der Anheftungsstelle, Referenzregion 4 (RR4): Boden des dritten Ventrikels. Strukturen wie Gefäße und die Nuclei habenulares wurden markiert und von der Auswertung ausgeschlossen. Nach Auszählung der jeweiligen Zelldichten wurden die Referenzregionen 1-4 statistisch mit der Zelldichte der ROI verglichen.

Die manuelle Auszählung der spezifisch markierten Zellen wurde mit der frei verfügbaren ImageJ-Software durchgeführt. Die Aufnahmen wurden verblindet importiert und die ROI sowie verschiedene Referenzregionen mit Hilfe von Markierungs-Werkzeugen der Software manuell gekennzeichnet. Zunächst wurden die Referenzregionen (RR) abgegrenzt. Zu den Referenzregionen zählten unter anderem die *Fimbriae hippocampi*, welche nochmals in eine parietale und basale Hälfte (Abb. 19, Linie 3) geteilt wurden. Die Grenze der *Fimbriae* (RR1+RR2) wurde als eine Gerade (Abb. 19, Linie 1) zwischen dem äußeren Rand der *Nuclei habenulares* und dem Übergang zur medialen Wand des lateralen Ventrikels definiert. Die lateralen Ausläufe der Anheftungsstelle wurden als Referenzregion (RR3) hinzugezogen. Als dorsale Grenze wurde eine horizontale Gerade (Abb. 19, Linie 4) ausgehend vom tiefsten Punkt des *Corpus callosum* definiert. Anschließend wurde der Abstand dieser Geraden zur Anheftungsstelle ausgemessen. Dieser Abstand diente zur Festlegung der ventralen Begrenzung (Abb. 19, Linie 8) der nächsten Referenzregion, dem Boden

des dritten Ventrikels (RR4). Unter Befolgung dieser definierten Geraden ließen sich in jedem Bild einheitlich vier Referenzregionen von der ROI abgrenzen. Strukturen wie Gefäße (Abb. 19, Linie 11-14) und die *Nuclei habenulares* (Abb. 19, Linie 9-10) wurden markiert und von der Auswertung ausgeschlossen.

Unter Zuhilfenahme eines Punkt-Markierungs-Werkzeugs wurden die spezifisch markierten Zellen innerhalb der ROI und der RR markiert. Die Anzahl markierter Zellen und die Fläche der Regionen konnten anschließend exportiert und eine Zelldichte pro mm^2 errechnet werden.

Pro Objektträger wurden zwei Hirnschnitte desselben Tieres auf diese Weise verblindet ausgewertet. Nach Aufhebung der Verblindung wurde aus den Zelldichten beider Hirnschnitte eines Tieres der Mittelwert $_{\text{Tier,RR/ROI}}$ gebildet. Aus allen Mittelwerten $_{\text{Tier,RR/ROI}}$ einer Experimentgruppe wurde der Mittelwert $_{\text{Gruppe,RR/ROI}}$ errechnet und dieser mit anderen Mittelwerten unter den Gruppen verglichen.

2.4.6 Quantifizierung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

In dieser Studie wurden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen durchgeführt, um die Gefäßdichte an der Anheftungsstelle zu erfassen. Dabei sollte die Dichte der prä- und postkapillären Gefäße (engl. *α -smooth muscle actin*, α -SMA) analog zur gesamten Gefäßdichte (CD31) erfasst werden.

Zunächst wurden zur Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen am Epifluoreszenzmikroskop (DM6 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) in allen Kanälen (blau: DAPI, rot: CD31, grün: α -SMA) Übersichtsaufnahmen mit den gleichen optimalen Einstellungen angefertigt. Die Aufnahmen aller Hirnschnitte wurden am selben Tag vorgenommen, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Anschließend erfolgte die Markierung der ROI und der Referenzregionen nach dem selben Schema wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben. Mithilfe eines Punkt-Markierungs-Werkzeugs wurden die spezifisch markierten Gefäße innerhalb der ROI und der Referenzregionen markiert. Die Anzahl markierter Gefäße und die Fläche der Regionen konnten anschließend exportiert und eine Gefäßdichte pro mm^2 errechnet werden.

Pro Objektträger wurden auf diese Weise zwei Hirnschnitte desselben Tieres verblindet ausgewertet. Die Gefäßdichten der beiden ausgewerteten Hirnschnitte wurden zu einem Mittelwert $_{\text{Tier,RR/ROI}}$ zusammengefasst. Aus den Mittelwerten $_{\text{Tier,RR/ROI}}$ wurde ein Mittelwert $_{\text{Gruppe,RR/ROI}}$ errechnet und mit anderen Gruppen verglichen.

2.4.7 Quantifizierung der Genexpression

Es wurden zusätzlich Gewebeareale zwei weiterer Referenzregionen aus dem Gewebeschnitt gelasert. Die Referenzregionen befanden sich in den *Fimbriae hippocampi* sowie im *Cortex* an der Gehirnoberfläche.

Zur quantitativen Auswertung wurde die relative Menge der eingesetzten cDNA über eine interne Standardreihe aus sieben 1:1 Verdünnungsstufen ermittelt. Um die relative Genexpression der zu untersuchenden Gene zu bestimmen, wurden die relativen cDNA-Mengen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die relativen Mengen der internen Standardreihe sind als 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% und 1,56% definiert, wobei der 100%-Ansatz aus gleichen Anteilen aller Proben besteht.

Zwischen dem Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge und dem CT-Wert besteht ein linearer, umgekehrt proportionaler Zusammenhang. Zur Darstellung wird eine Regressionsgerade aus den Werten der Standardreihe errechnet. Demnach kann über diese Regressionsgerade der Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge unbekannter Proben (engl. *Starting Quantity*, SQ) errechnet werden.

Zur Auswertung wurden die über die Regressionsgerade errechneten SQ-Werte normiert, indem der SQ-Wert des untersuchten Gens mit dem SQ-Wert eines internen Kontrollgens ins Verhältnis gesetzt wurde. Als internes Kontrollgen diente in dieser Studie *18S*. *18S* ist ein konstitutiv exprimiertes ribosomales Gen, welches in der Expression konstant ist. Die gemittelte zum Kontrollgen normierte Expressionsstärke der Untersuchungsregionen Anheftungsstelle und *Cortex* wurde mit der entsprechenden, gemittelten zum Kontrollgen normierten Expressionsstärke der *Fimbriae hippocampi* entgegengesetzt. Das Ergebnis beschreibt die Expression des untersuchten Gens im Verhältnis zur Expression des Gens an den *Fimbriae hippocampi*. Ein Ergebnis >1 entspricht einer erhöhten Expression, ein Ergebnis von <1 entspricht einer erniedrigten Expression.

2.4.8 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 8.0.2, GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

Alle Daten werden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD, engl. *Standard Deviation*) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als Sterne gekennzeichnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant). Es wurden keine Extremwerte aus den Analysen ausgeschlossen. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurden die importierten Daten auf Normalverteilung überprüft (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Die angewandten statistischen Tests sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*

Die erste Arbeitshypothese lautet „Im Bereich der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* des dritten Ventrikels besteht eine gliale Barriere“. In einem ersten Schritt wurde die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel histologisch charakterisiert, um die Gesamtheit histologischer Merkmale optimal interpretieren zu können. Hierzu wurden koronare Hirnschnitte der Region 255-265 von Kontrollmäusen immunhistologisch mit Anti-NeuN-AK und Anti-Laminin-AK prozessiert (Kapitel 2.2.4). NeuN ist ein neuronales Kernantigen und wurde im Rahmen dieser Arbeit als Pan-Marker für Neurone verwendet, sodass eine Aussage über vorhandene Kerngebiete und Marklager getroffen werden konnte. Laminin ist ein extrazelluläres Protein und ein wichtiger Bestandteil von Basalmembranen. Basalmembranen sind Komponenten einer glialen Barriere [34].

In Abbildung 20 sind immunhistochemisch die Anheftungsstelle, die Referenzregion sowie das SFO dargestellt. Das rostral gelegene SFO ist eine rundliche, hochvaskularisierte Struktur mit speziellen Neuronen, welche mit der NeuN-Markierung dargestellt wurden (Abb. 20A, Pfeile). Ein nukleäres Markierungsmuster ist typisch für Anti-NeuN markierte Neurone. Am Boden des dritten Ventrikels sind weitere NeuN-positive Strukturen markiert, die zum Kerngebiet des Thalamus gehören. Im Vergleich dazu konnten an der Anheftungsstelle im dritten Ventrikel, welche unmittelbar dem SFO okzipital anliegt, keine Neurone immunhistochemisch nachgewiesen werden. Zu sehen ist eine schwache Hintergrundmarkierung, jedoch lässt sich kein typisches NeuN-Markierungsmuster finden. Die Referenzregion, die *Fimbriae hippocampi*, zeigt bei der NeuN-Markierung ähnlich wie die Anheftungsstelle eine Hintergrundfärbung ohne NeuN-positive Strukturen.

Die Laminin-Markierung zeigt an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* beziehungsweise an der Grenze zum Hirnparenchym Laminin-positive Strukturen (Abb. 20B). Ein extrazelluläres Markierungsmuster ist typisch für Anti-Laminin markierte Strukturen. Zu sehen sind kleinere, rundliche Laminin-positive Strukturen, welche als vaskuläre Basallamina identifiziert werden können. An der Anheftungsstelle sind weitere annähernd horizontal verlaufende Laminin-positive Strukturen zu erkennen, die eine Grenze zwischen *Plexus choroideus* und Hirnparenchym zu bilden scheinen (Abb. 20B, schwarze Pfeile). Im *Plexus choroideus* sind die Basallamina der choroidalen Gefäße sowie des Plexusepithels Laminin-positiv markiert. Im Vergleich dazu sind an der ebenfalls periventrikulär gelegenen Referenzregion keine Laminin-positiven Strukturen zu sehen. Die gestrichelten Pfeile zeigen an der Grenze zum Ventrikel das fehlende Laminin-Markierungsmuster (Abb. 20B). Das Ependym der *Fimbriae hippocampi* ist unspezifisch markiert, im Parenchym sind kleinere vaskuläre Laminin-positive Strukturen markiert.

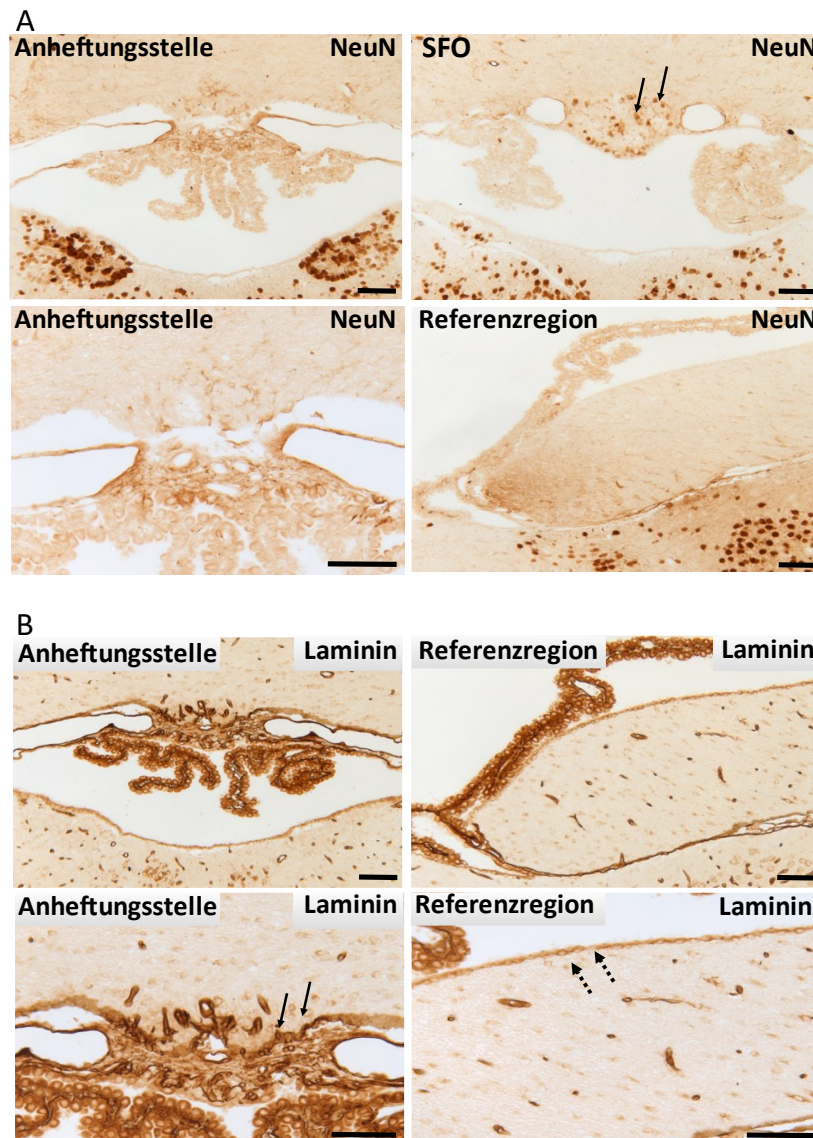


Abbildung 20: Histologische Charakteristika der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel. (A) Anti-NeuN-Markierung: Dargestellt sind die Anheftungsstelle, das rostral gelegene Subfornikalorgan (SFO) und die Referenzregion, die Fimbriae hippocampi. Das SFO (schwarzer Pfeil) ist eine hochvaskularisierte Struktur mit spezialisierten Neuronen, welche mit der NeuN-Markierung dargestellt werden konnten. Im Vergleich dazu konnten an der Anheftungsstelle, welche unmittelbar dem SFO okzipital anliegt, keine NeuN positiven Strukturen nachgewiesen werden. **(B)** Anti-Laminin-Markierung: Dargestellt sind die Anheftungsstelle und die Referenzregion. Die schwarzen Pfeile zeigen auf Laminin-haltige Strukturen an der Anheftungsstelle, die auf das Vorhandensein einer Basallamina hindeuten. Die gestrichelten Pfeile zeigen auf die periventrikulär gelegene Referenzregion, die keine Basallamina aufweist. Maßstab (A, B): 50 μ m.

3.2 Charakterisierung der glialen Barriere

3.2.1 Astrozytäre Barriere

Die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* bildet eine dorsale Kontaktstelle zum Hirnparenchym im dritten Ventrikel. Um die erste Arbeitshypothese, die Existenz einer glialen Barriere an dieser Kontaktstelle, zu überprüfen, wurden immunhistochemische Markierungen an Kontrollmäusen mit Anti-GFAP-Antikörpern durchgeführt. Anschließend wurden optische Dichtemessungen vorgenommen (Kapitel 2.4.3). Aufgrund der topographischen und histologischen Ähnlichkeiten

Ergebnisse

wurden die *Fimbriae hippocampi* als Referenzregion beibehalten (Kapitel 3.1). Die Werte der optischen Dichte sind in Tabelle 20 angegeben und in Abbildung 21 dargestellt. Um eine potentielle gliale Barriere besser feststellen und interpretieren zu können, wurden zusätzlich vergleichende optische Dichtemessungen an bekannten astrozytären Barrieren - wie der *Membrana limitans gliae superficialis* an der Hirnoberfläche und der *Membrana limitans gliae perivascularis* an Gefäßen - durchgeführt.

Tabelle 20: Ergebnisse der optischen Dichtemessungen in zehn konzentrischen Halbkreisen.

Konzentrischer Kreis	Anheftungsstelle Optische Dichte [%]	Referenzregion Optische Dichte [%]	<i>Membrana limitans gliae superficialis</i> Optische Dichte [%]	<i>Membrana limitans gliae perivascularis</i> Optische Dichte [%]
1	97,2 ± 1,6	74,1 ± 11,0	89,8 ± 8,1	50,6 ± 4,0
2	89,5 ± 6,8	55,8 ± 5,8	58,9 ± 19,1	20,2 ± 3,2
3	82,2 ± 13,2	38,2 ± 7,7	38,6 ± 15,2	15,7 ± 2,3
4	66,0 ± 13,0	32,6 ± 6,6	30,0 ± 11,2	12,7 ± 2,0
5	54,7 ± 10,9	27,1 ± 6,6	28,2 ± 10,2	10,6 ± 1,6
6	46,3 ± 10,7	25,9 ± 5,1	25,3 ± 6,6	9,5 ± 1,4
7	42,4 ± 9,7	22,3 ± 4,8	24,6 ± 3,4	9,1 ± 1,6
8	36,6 ± 7,8	19,8 ± 4,4	23,4 ± 6,1	9,4 ± 1,5
9	31,0 ± 6,9	19,3 ± 2,1	19,4 ± 6,1	8,7 ± 1,6
10	30,0 ± 5,7	20,1 ± 3,5	16,9 ± 4,1	8,6 ± 1,8

Die Unterteilung der ROI in zehn konzentrische Halbkreise ermöglicht es, eine Änderung der optischen Dichte in Entfernung zur unmittelbaren Anheftungsstelle festzustellen. Erwartungsgemäß sollte eine Grenzmembran eine erhöhte Dichte an GFAP-Immunreaktivität aufweisen. Die Auswertung zeigt, dass die optische Dichte der GFAP-Immunreaktivität, in den ersten drei Halbkreisen, also nahe der Anheftungsstelle, nahezu maximal ist. Der erste signifikante Abfall der optischen Dichte erfolgt zwischen dem dritten und vierten Halbkreis. Mit zunehmender Entfernung zur Anheftungsstelle sinkt die optische Dichte bis zum zehnten Halbkreis sukzessiv um circa 50%. Die Auswertung der Referenzregion zeigt, dass die optische Dichte im ersten konzentrischen Halbkreis, der Grenze zum Ventrikellumen, eine hohe optische Dichte aufweist. In den weiteren Halbkreisen fällt die optische Dichte um circa 40% auf ein nahezu konstant niedriges Niveau. Der erste signifikante Abfall erfolgt zwischen dem ersten und dem zweiten Halbkreis. Im

Ergebnisse

Bereich der *Membrana limitans gliae superficialis* und der *Membrana limitans gliae perivascularis* zeigt sich ebenfalls eine hohe optische Dichte an GFAP-Immunreaktivität in den ersten konzentrischen Halbkreisen. Der Abfall der optischen Dichte verhält sich in beiden *Membranae limitans gliae* ähnlich wie an der Referenzregion. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Anheftungsstelle eine breitere Front mit höherer optischer Dichte an GFAP-Immunreaktivität besitzt als die Referenzregion sowie die bekannten *Membranae limitans gliae*.

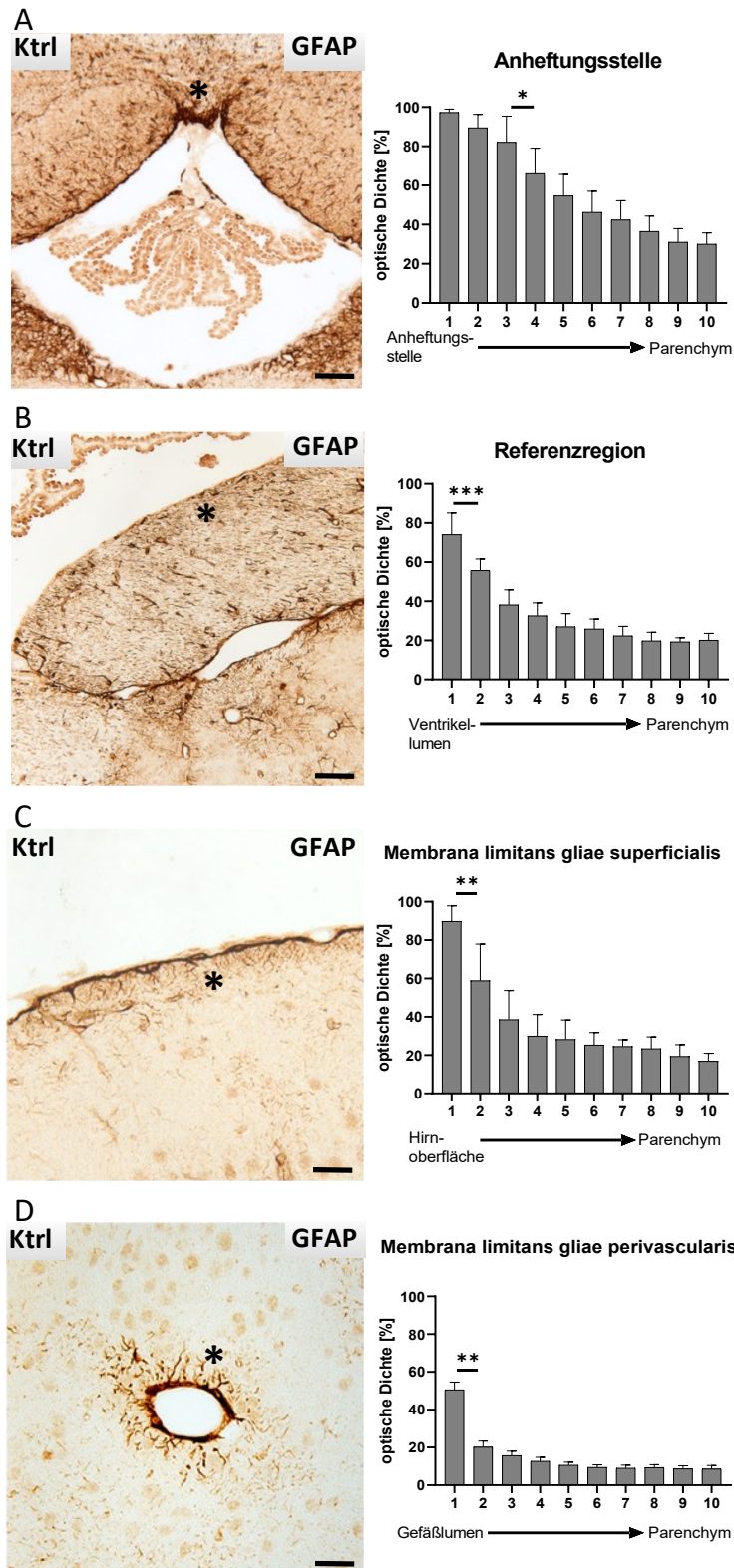


Abbildung 21: Untersuchung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus als astrozytäre Grenzstruktur. Die Untersuchung erfolgte mittels immunhistochemischer Markierung des astrozytären sauren Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein, GFAP) und optischen Dichtemessungen an fünf Kontrolltieren. Die optischen Dichtemessungen erfolgten durch eine Unterteilung der zu untersuchenden Region in jeweils zehn konzentrische Halbkreise mit einer Breite von 25µm pro Halbkreis. Die optische Dichte ist in Prozent angegeben. Die zu untersuchenden Regionen sind mit einem (*) markiert und liegen in Region 255-265. **(A)** Darstellung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus des dritten Ventrikels. Unterschiede der optischen Dichte in den Halbkreisen wurden mit dem one-way ANOVA Test ermittelt. **(B)** Darstellung der Fimbriae hippocampi als Referenzregion. Unterschiede der optischen Dichte in den Halbkreisen wurden mit dem one-way ANOVA Test ermittelt. **(C)** Darstellung der Membrana limitans gliae superficialis an der Hirnoberfläche. Unterschiede der optischen Dichte in den Halbkreisen wurden mit dem Mann-Whitney-Test ermittelt. **(D)** Darstellung der Membrana limitans gliae perivascularis an einem Gefäß. Unterschiede der optischen Dichte in den Halbkreisen wurden mit dem Mann-Whitney-Test ermittelt. n=5, Maßstab (A, B, C, D): 50µm.

3.2.2 Immunologische Barriere

Neben einer astrozytären Barriere kann eine weitere potentielle Barriere zu peripheren Zellen aus residenten Immunzellen wie Mikrogliazellen bestehen. Um dies zu überprüfen, wurden weitere immunhistochemische Markierungen mit dem ionisierten Kalzium-bindenden Adaptermolekül 1 (engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, IBA1) durchgeführt. Anti-IBA1-Antikörper markieren phagozytierende Zellen wie Monozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen. Anschließend wurden optische Dichtemessungen an der Anheftungsstelle und der Referenzregion an Kontrollmäusen durchgeführt (Kapitel 2.4.3). Die Werte der optischen Dichte sind in Tabelle 21 angegeben und in Abbildung 22 dargestellt.

Tabelle 21: Ergebnisse der optischen Dichtemessungen in zehn konzentrischen Halbkreisen.

Konzentrischer Halbkreis	Anheftungsstelle Optische Dichte [%]	Referenzregion Optische Dichte [%]
1	27,5 ± 7,1	11,4 ± 8,9
2	18,8 ± 6,8	8,1 ± 2,3
3	15,0 ± 7,3	6,5 ± 1,6
4	9,7 ± 5,1	7,3 ± 2,0
5	7,8 ± 2,5	6,1 ± 1,3
6	6,5 ± 1,9	6,7 ± 1,8
7	5,9 ± 1,2	6,3 ± 0,9
8	7,1 ± 2,2	5,9 ± 0,6
9	6,6 ± 1,7	6,1 ± 1,1
10	7,1 ± 1,6	6,3 ± 1,3

Die Auswertung zeigt, dass nahe der Anheftungsstelle die optische Dichte der IBA1-Immunreaktivität höher ist als im restlichen Hirnparenchym. Die optische Dichte sinkt nach dem ersten Halbkreis mit einer optischen Dichte von circa 30% stetig bis zum sechsten Halbkreis und bleibt dann auf einem relativ konstanten Niveau. Es kam zu keinem signifikanten Abfall der optischen Dichte in den ersten Halbkreisen. Die Auswertung der Referenzregion zeigt, dass die optische Dichte der IBA1-Immunreaktivität nahezu konstant in einem niedrigen Bereich bleibt. Das Niveau ist vergleichbar mit der optischen Dichte der letzten Halbkreise an der Anheftungsstelle und liegt bei circa 6-8%. Es zeichnet sich eine Verdichtung der IBA1-Immunreaktivität an der Anheftungsstelle ab.

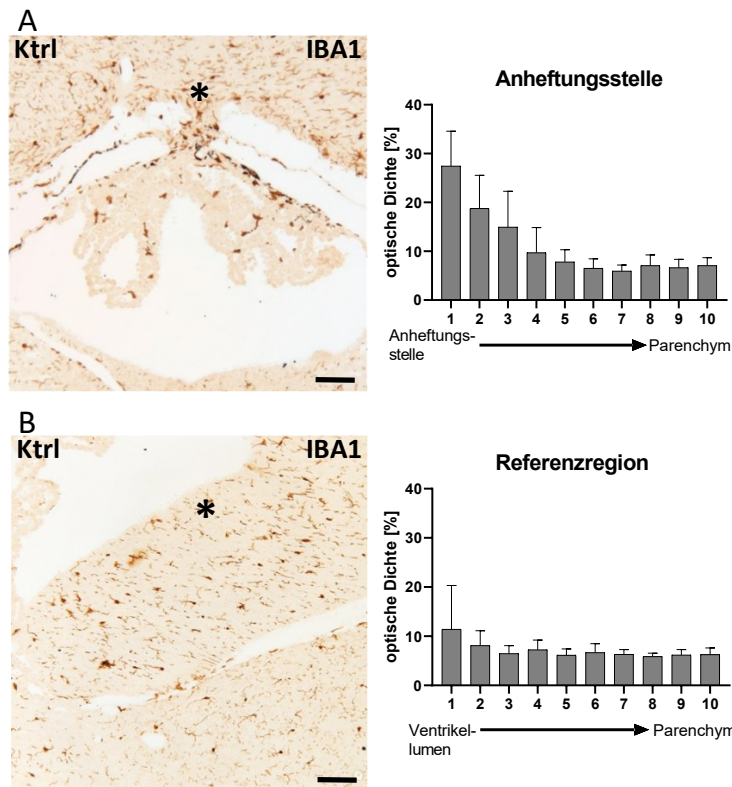


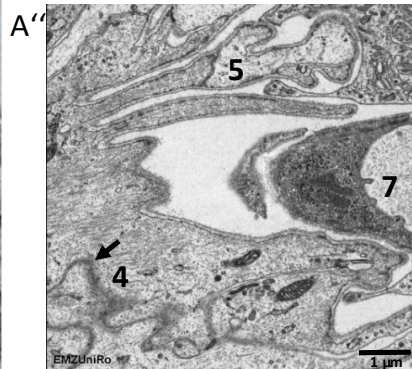
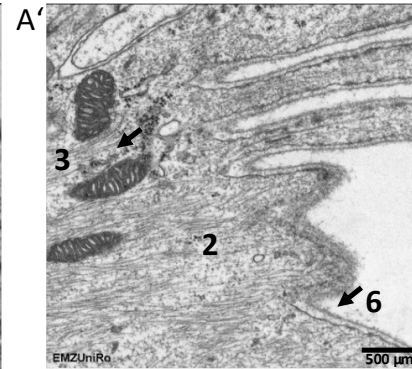
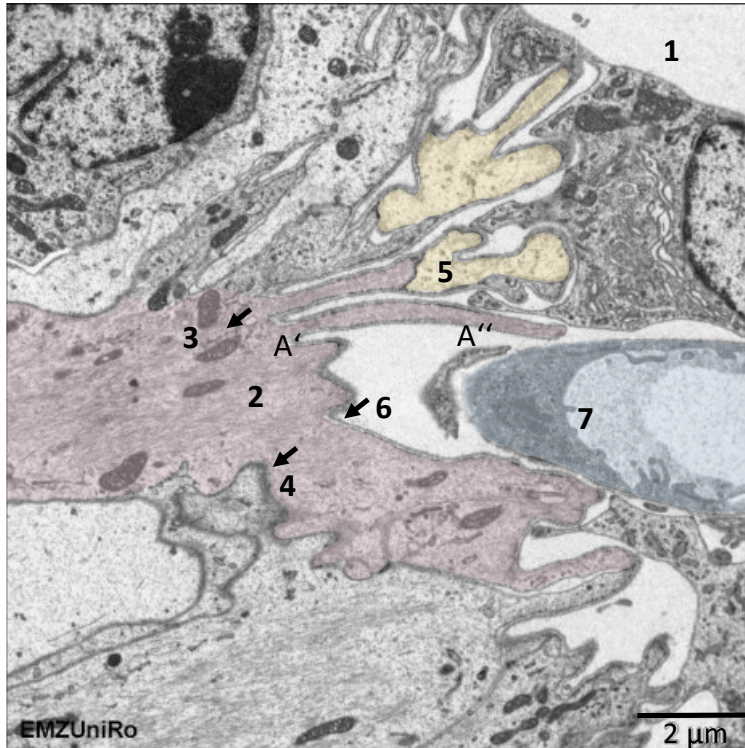
Abbildung 22: Untersuchung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus als immunologische Grenzstruktur. Die Untersuchung erfolgte mittels immunhistochemischer Markierung des Anti-ionisierten Kalzium-bindenden Adaptermolekül 1 (engl. ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA1). Die optische Dichte in zehn konzentrischen Halbkreisen ist in Prozent angegeben. Die zu untersuchenden Regionen sind mit einem (*) markiert. **(A)** Darstellung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel. **(B)** Darstellung der Referenzregion. $n = 5$, Maßstab **(A, B)**: 50 μm .

3.2.3 Ultrastrukturelle Morphologie der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*

Für eine detailliertere Darstellung der morphologischen Eigenschaften der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Es wurden die Anordnung der Zellen, das morphologische Verhältnis zueinander (siehe Kapitel 3.2.1) und die Merkmale einer glialen Barriere dargestellt. Hierzu wurden drei Kontrollmäuse entsprechend Kapitel 2.1.5.3 verwendet.

Nahe der Anheftungsstelle konnten komplex vernetzte Zellen identifiziert werden (Abb. 23A), welche an das Ventrikellumen (1) angrenzen. Diese Zellen (Abb. 23A, rot markiert) enthalten in ihrem Zytoplasma eine hohe Anzahl an Intermediärfilamenten (2), was darauf hindeutet, dass es sich um Astrozyten handelt. Im Zytoplasma dieser Zellen sind längs angeschnittene Zellorganellen mit typisch mitochondrialer Struktur (3, Pfeil) zu sehen (Abb. 23A'). Im Bereich des interzellulären Raumes zwischen benachbarten Astrozyten finden sich Verdichtungen (4, Pfeil), die auf enge Zellkontakte wie Tight Junctions hinweisen. Neben den Astrozyten lässt sich ein weiterer unbekannter Zelltyp (5) identifizieren, der nahezu keine Intermediärfilamenten im Zytoplasma enthält. Beide Zelltypen werden von einer gemeinsamen, durchgehenden Basallamina (6, Pfeil) umschlossen und bilden untereinander enge Zellkontakte aus, die den Zellkontakten zwischen den Astrozyten ähneln. Neben dieser Zellorganisation befinden sich choroidale Gefäße (7) und, nahe des Ventrikellumens, Zellen mit großen Zellkernen, die von der Basallamina ausgeschlossen sind und wahrscheinlich zu dem *Plexus choroideus* gehören.

A



B

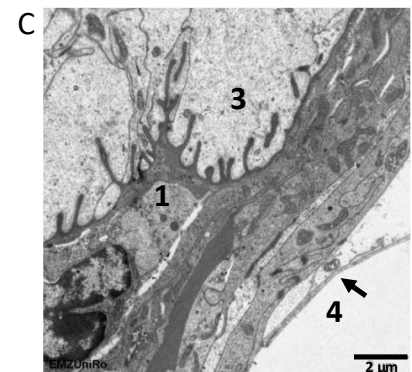
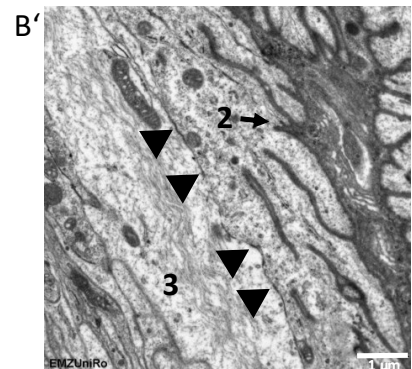
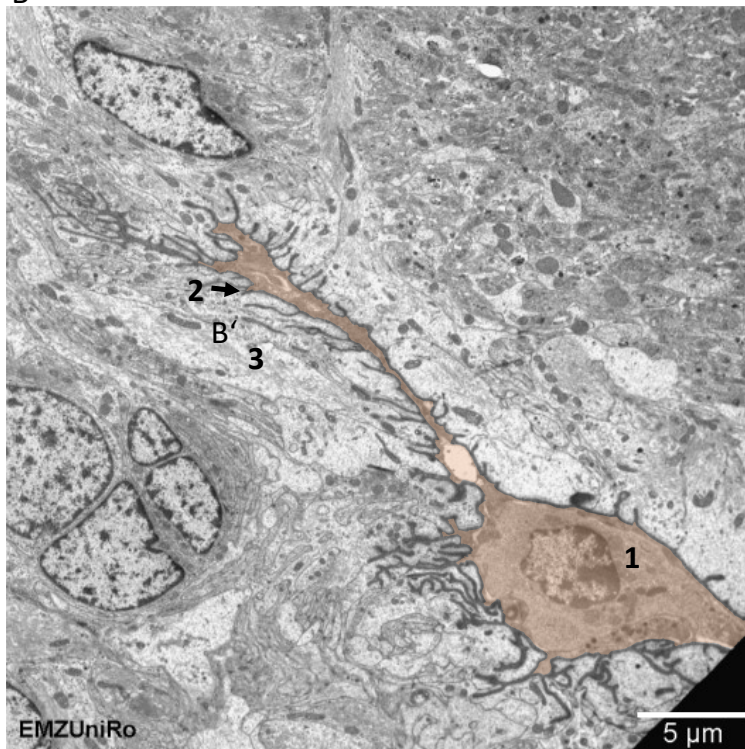


Abbildung 23: Repräsentative Darstellung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme von der Anheftungsstelle des Plexus choroideus des dritten Ventrikels. (A) 1. Ventrikellumen 2. Komplex vernetzte Zellen mit hoher Anzahl an Intermediärfilamenten im Zytoplasma; Astrozyt (rot). 3. Mitochondrien (Pfeil) 4. Zellkontakt-Verdichtungen zwischen Astrozyten (Pfeil) 5. Unbekannter Zelltyp (gelb) ohne Intermediärfilamente im Zytoplasma mit engem Zellkontakt zu Astrozyten 6. Gemeinsame Basallamina umschließt Astrozyten und unbekannten Zelltyp (Pfeil). 7. Choroidales Gefäß (blau) mit Gefäßendothel und Gefäßlumen. (B,C) 1. Verzweigte Zelle mit prominentem Zellkern (orange). 2. Elektronendichte Membran 3. Astrozytenfortsätze mit dichten Zellkontakten (B' Pfeilköpfe). 4. Subarachnoidalraum, Trabekel (Pfeil). Maßstab (A): 2 µm; (A', A''): 1 µm; (B): 5 µm; (B'): 1 µm; (C): 2 µm.

In Abschnitten der lateralen Ausläufe der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* (Abb. 23B) ist ein weiterer nicht genau definierter Zelltyp (1) zu erkennen, der durch fein verzweigte Ausläufer und eine elektronendichte Membran (2, Pfeil) charakterisiert ist. Dieser Zelltyp liegt dem Subarachnoidalraum (4) an und verzweigt sich tief in das Parenchym (Abb. 23). Die elektronendichte Membran weist auf eine mechanische Verankerung der Zellen im Parenchym hin, die durch enge Zellkontakte oder durch eine Doppelmembran ähnlich wie bei Mitochondrien erreicht werden kann. Dieser Zelltyp ist von dicht gelagerten Astrozytenfortsätzen und Endfüßen umgeben, die anhand der hohen Zahl von Intermediärfilamenten (Abb. 23B' 3) im Zytoplasma zu erkennen sind. Die Astrozytenfortsätze bilden untereinander enge Zellkontakte (Abb. 23B', schwarze Pfeilköpfe) aus, die auf Tight Junctions hinweisen. Das weitere umgebende Gewebe enthält ebenfalls eine Vielzahl an verzweigten Fortsätzen, die zu Astrozyten gehören. Dem Subarachnoidalraum (4) von innen angrenzend befinden sich weitere Zellen, die lockere und feine Trabekel (4, Pfeil) ausbilden und vermutlich Zellen der weichen Hirnhäute darstellen, wie zum Beispiel die der *Pia mater*.

3.2.4 Topographisches Verhältnis astrozytärer und Laminin-haltiger Strukturen

Die Technik der TEM bietet einen detaillierten, jedoch räumlich beschränkten Blick auf das zu untersuchende Gewebe. Um einen Überblick über das topographische Verhältnis von Astrozyten zu den umgebenden Laminin-positiven Strukturen (siehe Kapitel 3.2.3) an der Anheftungsstelle zu erhalten, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit Anti-GFAP-Antikörpern und Anti-Laminin-Antikörpern sowie eine nukleäre Markierung mit 4',6-diamidino-2-Phenylindole (DAPI) an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* des dritten Ventrikels in Kontrollmäusen durchgeführt.

Eine repräsentative Abbildung 24 zeigt einen engen, klaren Kontakt der GFAP-positiven Zellfortsätze (rot) zu den markierten Basallamina (grün). An der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* zeigt sich eine fokale Ansammlung, eine Front, GFAP-positiver Zellen, die sich mit weiterer Entfernung zur Anheftungsstelle auflöst (analog zu Kapitel 3.2.1). Die Laminin-positiven Strukturen an der Anheftungsstelle bilden eine horizontale Grenze zwischen dem *Plexus choroideus* und dem Hirnparenchym. Die Verdichtung der GFAP- und Laminin-positiven Strukturen bilden ein Konglomerat und grenzen sich zum *Plexus choroideus* ab. Im Hirnparenchym sind weitere Laminin-positive Strukturen markiert, die die vaskuläre Basallamina darstellen. Im *Plexus choroideus* sind die Basallamina der choroidalen Gefäße sowie des Plexusepithels Laminin-positiv markiert.

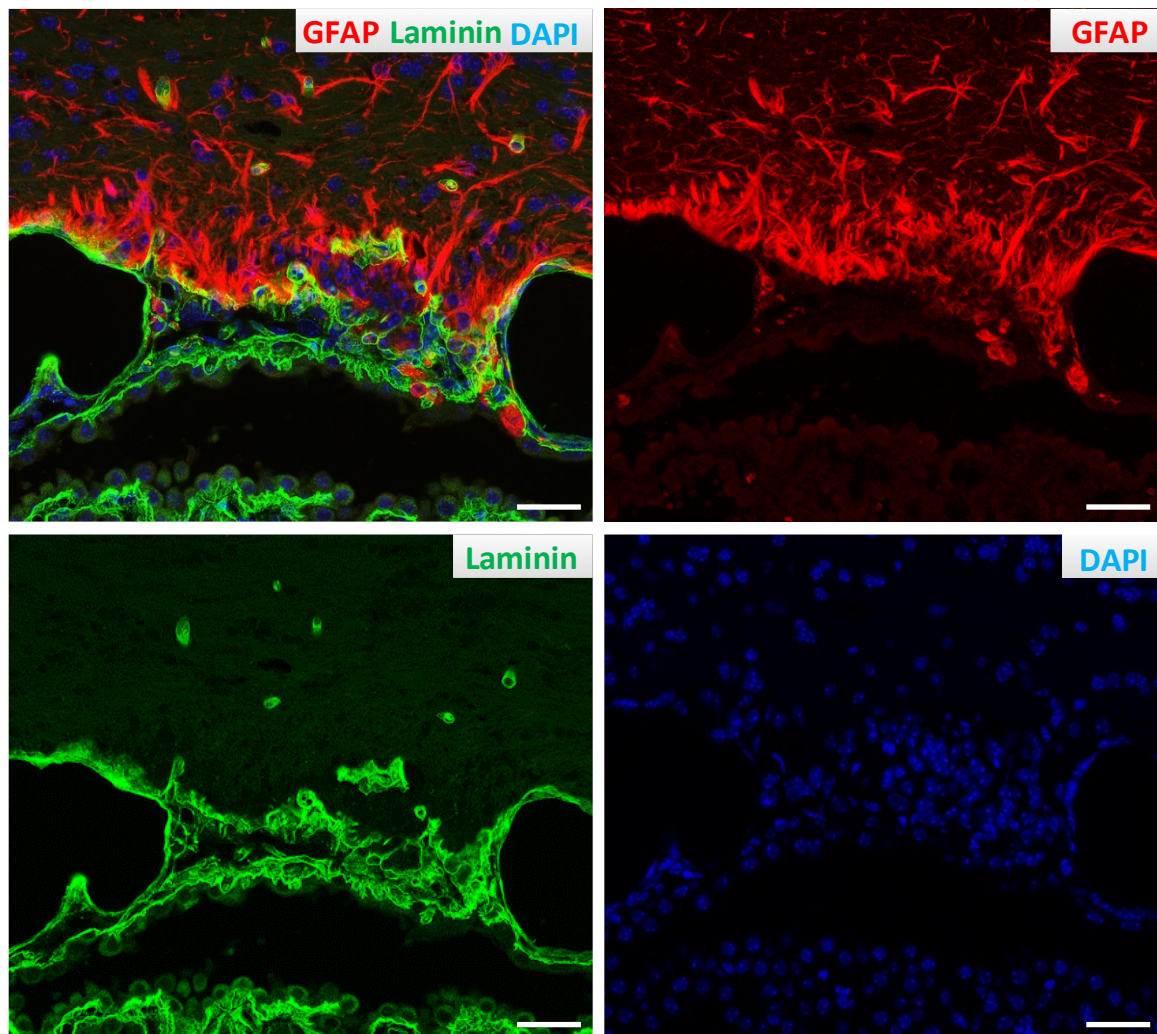


Abbildung 24: Repräsentative Darstellung einer Immunfluoreszenz Doppelmarkierung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel. Immunfluoreszenz Doppelmarkierung mit Anti-GFAP (rot) und Anti-Laminin (grün), nukleäre Markierung mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blau). Es zeigt sich eine fokale Ansammlung GFAP-positiver Zellen, welche durch laminäre Strukturen vom Plexus choroideus abgegrenzt werden. Weiter zu sehen sind laminäre Strukturen am Plexusepithel und choroidalen Gefäßen. Maßstab: 20 μ m.

3.2.5 Genexpressionsanalyse der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*

Basierend auf der relativen Expression ausgewählter Gene sollte eine molekularbiologische Charakterisierung des *Plexus choroideus* an gesunden Mäusen erfolgen. Die Anheftungsstelle (A in Abb. 25) sowie die Referenzregionen *Fimbriae hippocampi* (R1 in Abb. 25) und *Cortex* (R2) wurden mittels Laser Capture Microdissection aus unbehandeltem Gewebe isoliert und wie in Kapitel 2.3 beschrieben für die anschließende qPCR aufbereitet. Für die Analyse wurde die RNA-Expression von glialen Markern, wie *Gfap* (astrozytäres Gen), *Lamb1* (Gen der Basallamina), *Iba1* (mikrogliales Gen), *Jam1* und *Cldn1* (Tight Junction Gene) sowie *Cx43* (Gap Junction Gen) untersucht und als relative Expressionslevel zu den *Fimbriae hippocampi* angegeben (Abb. 25 und Tab. 22)

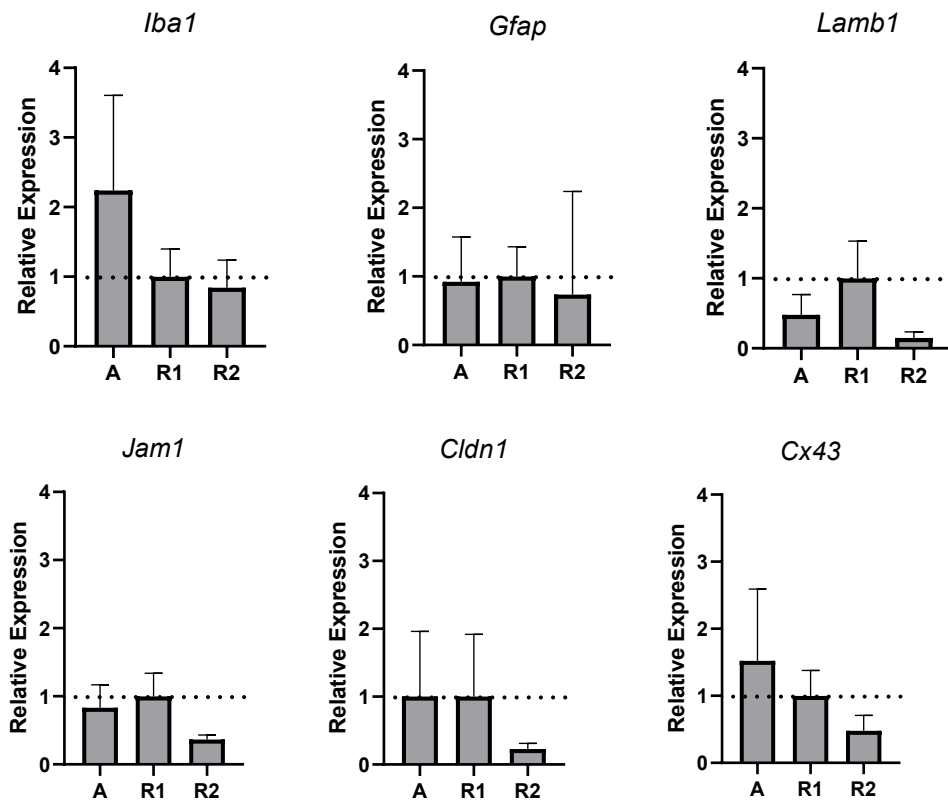


Abbildung 25: Ergebnisse der qPCR Analyse von Genen glialer Proteine der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel. Die Analyse von *Iba1* (mikrogliales Protein), *Gfap* (astrozytäres Protein), *Lamb1* (Protein der Basallamina), *Jam1* und *Cldn1* (tight junction Proteine) und *Cx43* (gap junction Protein) der Anheftungsstelle (A) im Vergleich zur den Fimbriae hippocampi (R1) und dem Cortex (R2) an gesunden Mäusen. Die Ergebnisse sind als relative Expressionslevel zu den Fimbriae hippocampi (R1) dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Regionen festgestellt. Auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test getestet.

Die RNA-Expression des mikroglialen Markers *Iba1*, sowie des Gap Junction Marker *Cx43* in der Anheftungsstelle im Vergleich zu den aufgeführten Referenzregionen relativ erhöht (*Iba1*: $2,8 \pm 1,4$; *Cx43*: $1,5 \pm 1$). Der gliale Marker *Gfap* und die Tight Junction Marker *Cldn1* und *Jam1* weisen im Hinblick auf die Referenzregion 1 hingegen vergleichbare Expressionslevel aufweisen. Einzig *Lamb1* zeigt eine relativ verringerte Expression (*Lamb1*: $0,5 \pm 0,3$). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Regionen festgestellt.

Tabelle 22: Ergebnisse der qPCR Analyse glialer Marker der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel. Ergebnisse als relative Genexpressionen im Vergleich zu den Fimbriae hippocampi angegeben.

	<i>Fimbriae hippocampi</i>	Anheftungsstelle	<i>Cortex</i>
<i>Iba1</i>	$1 \pm 0,4$	$2,8 \pm 1,4$	$1,1 \pm 0,4$
<i>Gfap</i>	$1 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,7$	$0,7 \pm 1,5$
<i>Lamb1</i>	$1 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$
<i>Jam1</i>	$1 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$
<i>Cldn1</i>	$1 \pm 0,9$	1 ± 1	$0,2 \pm 0,1$
<i>Cx43</i>	$1 \pm 0,4$	$1,5 \pm 1$	$0,5 \pm 0,2$

3.3 Rekrutierung von Immunzellen im Cuprizone/Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis – Modell

3.3.1 Immunzell-Dichte in periventrikulären Regionen

Die übergeordnete Hypothese dieses Arbeitsabschnitts ist, dass eine Invasion peripherer Immunzellen über die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* beziehungsweise über die gliale Grenzstruktur an der Anheftungsstelle hinweg in das Hirnparenchym stattfindet. Um dies zu überprüfen, wurden Hirnschnitte von fünf Kontrollmäusen und vier Cup/EAE-intoxikierten Mäusen immunhistochemisch mit Antikörpern gegen den T-Zell-Marker CD3, den T-Lymphozyten unabhängig vom Subtyp oder Aktivierungszustand exprimieren, prozessiert. Die Hirnschnitte wurden, wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben, in fünf periventrikuläre Regionen unterteilt und die Dichte CD3-positiver Zellen wurde quantifiziert (Tab. 23).

Tabelle 23: Ergebnisse der Auszählung CD3-positiver Strukturen in den periventrikulären Referenzregionen (RR).

	Cup/EAE-Gruppe [Zellen/mm ²]	Kontrollgruppe [Zellen/mm ²]
RR1	35,2 ± 20,0	0 ± 0
RR2	70,0 ± 39,0	2,7 ± 2,7
ROI	234,5 ± 163,3	0 ± 0
RR3	163,3 ± 52,6	0,4 ± 0,8
RR4	4,6 ± 3,7	0 ± 0

Eine typische CD3-Markierung zeigt ein membranöses Markierungsmuster (Abb. 26, Vergrößerung Pfeil). Die Zelldichte an CD3-positiven Zellen in Cup/EAE-intoxikierten Mäusen ist in den dem Plexusstroma-zugewandten Regionen (ROI und RR3) signifikant am höchsten. In der dem Ventrikel-zugewandten Region (RR4) fand nur eine geringe Zellrekrutierung ($4,6 \pm 3,7$ Zellen/mm²) statt. Die Zelldichte in den *Fimbriae hippocampi* (RR1 und 2: $35,2 \pm 20,0$ und $70,0 \pm 39,0$ Zellen/mm²) ist deutlich niedriger als in unmittelbarer Nähe zur Anheftungsstelle (ROI: $234,5 \pm 163,3$ Zellen/mm²). Zwischen der parietalen und der basalen Seite der *Fimbriae hippocampi* konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, wobei die Tendenz einer höheren Zellzahl zur basalen Seite hin erkennbar ist (RR1: $35,2 \pm 20,0$ Zellen/mm²; RR2: $70,0 \pm 39,0$ Zellen/mm²). In der Kontrollgruppe konnten fast keine CD3-positiven Zellen in den untersuchten Regionen nachgewiesen werden.

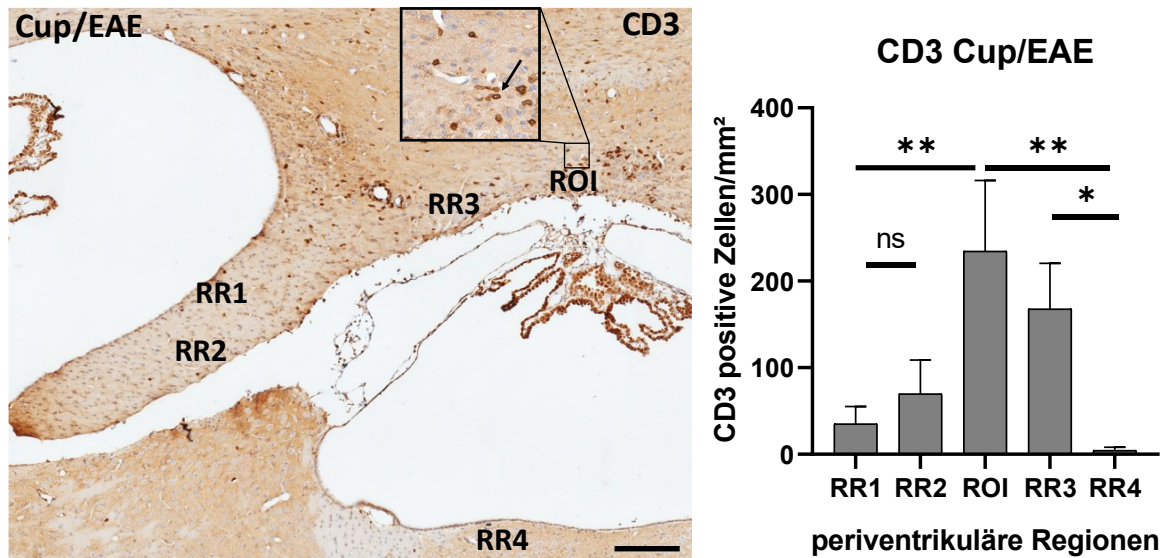


Abbildung 26: Immunzellrekrutierung in die periventrikulären Regionen des dritten Ventrikels. Repräsentativer, Anti-CD3-prozessierter Hirnschnitt einer Cuprizone/ Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (Cup/EAE)-intoxizierten Maus. Das zu untersuchende Gewebe wurde neben der Anheftungsstelle („region of interest“, ROI) in vier periventrikuläre Referenzregionen (RR1-4) unterteilt. Pfeil zeigt CD3-positive T-Zelle. Die Zelldichte an CD3 positiven Zelle ist in den Plexusstroma zugewandten Regionen (ROI und RR3) signifikant am höchsten. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Regionen wurden mit dem one-way ANOVA Test und Dunn-Sidak's Test ermittelt. Gruppengröße n= 4, Maßstab: 100 µm.

3.3.3 Gefäßdichte und prä- und postkapilläre Strukturen an der Anheftungsstelle

Es besteht die Möglichkeit, dass die in Kontrolltieren beobachtete erhöhte GFAP-Immunreaktivität an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel (Kapitel 3.2.1) im Zusammenhang mit einer erhöhten Gefäßdichte steht. Die Rekrutierung von Immunzellen über die BHS erfolgt auf Höhe der postkapillären Venolen [46]. Die beobachtete Immunzellrekrutierung in den dem Plexusstroma-zugewandten Regionen (Kapitel 3.3.1) könnte dementsprechend mit einer erhöhten Anzahl postkapillärer Venolen in diesen Regionen erklärt werden. Um dies zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen den pan-Endothelzell-Marker CD31 und α -Glattmuskel-Aktin (engl. *α -smooth muscle actin*, α -SMA) an Hirnschnitten von fünf Kontrollmäusen und vier Cup/EAE-intoxizierten Mäusen durchgeführt. Anti- α -SMA wird in Zusammenschau mit Anti-CD31 als Marker für prä- und postkapilläre Strukturen verwendet. Die Hirnschnitte wurden gemäß Kapitel 2.4.5 analysiert. Die Werte der Gefäßdichte und der Dichte prä- und postkapillärer Strukturen sind in Tabelle 24 aufgelistet und in Abbildung 27 dargestellt.

Tabelle 24: Ergebnisse der Auszählung CD31-positiver und α -SMA-positiver Gefäße in den periventrikulären Regionen.

	Kontrollgruppe		Cup/EAE-Gruppe	
	CD31 [Gefäße/mm ²]	α -SMA/CD31 [Gefäße/mm ²]	CD31 [Gefäße/mm ²]	α -SMA/CD31 [Gefäße/mm ²]
RR1	210,8 $\pm$ 18,9	5,8 $\pm$ 8,1	226,6 $\pm$ 32,8	10,5 $\pm$ 7,9
RR2	209,0 $\pm$ 9,2	5,5 $\pm$ 4,0	220,3 $\pm$ 28,7	10 $\pm$ 9,3
ROI	258,9 $\pm$ 41,9	26,3 $\pm$ 27,7	283,9 $\pm$ 94,1	8,3 $\pm$ 9,7
RR3	248,1 $\pm$ 29,1	5 $\pm$ 2,1	239,2 $\pm$ 41,1	2 $\pm$ 1,8
RR4	337,9 $\pm$ 31	12,5 $\pm$ 7,3	322,3 $\pm$ 36,0	11,5 $\pm$ 2,9

Wie Abbildung 27 erkennen lässt, ist die Gefäßdichte unmittelbar an der Anheftungsstelle gering. Es sind mit Entfernung zur Anheftungsstelle vereinzelt kleinere CD31-positive sowie CD31- und α -SMA-positive Gefäße markiert. Es zeigt sich keine fokale Ansammlung von CD31-positiven Strukturen, die mit der beobachteten GFAP-Expression (Kapitel 3.2.1) vergleichbar ist. Im Stroma des *Plexus choroideus* sind mehrere CD31- und α -SMA-positive Gefäße zu erkennen, die zum vaskulären Konvolut des *Plexus choroideus* gehören. Der statistische Vergleich der Kontrollgruppe und der Cup/EAE-Gruppe (Abb. 27A) zeigt, dass sich die Dichte an CD31-positiven Gefäßen beider Gruppen in keiner der fünf aufgeführten Regionen unterscheidet. Die Gefäßdichte ist in der dem Ventrikel-zugewandten Region am höchsten (RR4: Kontrollgruppe: 337,9 $\pm$ 31 Gefäße/mm²; Cup/EAE-Gruppe: 322,3 $\pm$ 36,0 Gefäße/mm²), gefolgt von der Anheftungsstelle (ROI: Kontrollgruppe: 258,9 $\pm$ 41,9 Gefäße/mm²; Cup/EAE-Gruppe: 283,9 $\pm$ 94,1 Gefäße/mm²). Es konnte demnach keine signifikant erhöhte Gefäßdichte an der Anheftungsstelle (ROI) im Vergleich zu den anderen periventrikulären Regionen nachgewiesen werden.

Für die Auswertung der Dichte prä- und postkapillärer Strukturen wurden die Zählergebnisse der Kontrollgruppe und der Cup/EAE-Gruppe zusammengefasst, da statistisch kein Unterschied in der Gefäßdichte beider Gruppen nachgewiesen werden konnte (Abb. 27B). An der Anheftungsstelle zeigt die Dichte α -SMA/CD31-doppelpositiver Strukturen große Schwankungen (ROI: 19,1 $\pm$ 23,3 Gefäße/mm²). In der lateralen Region der Anheftungsstelle ist die Dichte an prä- und postkapillären Strukturen am niedrigsten (RR3: 3,8 $\pm$ 2,5 Gefäße/mm²). Eine hohe Gefäßdichte zeigt die dem Ventrikel zugewandte Region mit 12,1 $\pm$ 5,7 Gefäße/mm². Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Dichte doppel-positiver Gefäße zwischen den periventrikulären Regionen nachgewiesen werden.

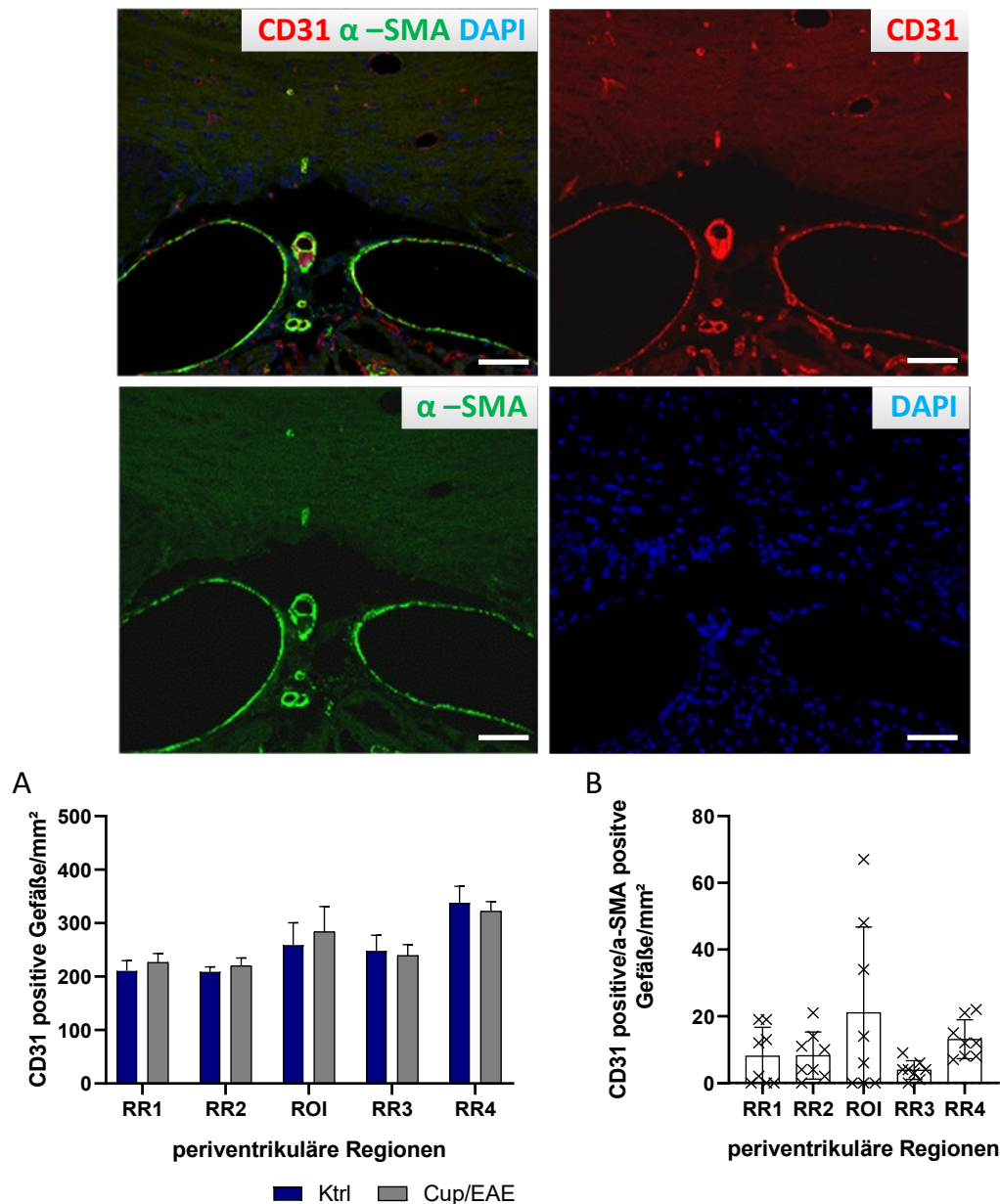


Abbildung 27: Gefäßdichte und Dichte prä- und postkapillärer Strukturen der periventrikulären Regionen. Repräsentative Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit Anti-CD31 (rot) und Anti- α -Glattmuskel-Aktin (engl. α -smooth muscle actin, α -SMA; grün), nukleäre Markierung mit DAPI (blau). Es wurden Hirnschnitte von Kontrollmäusen und Cup/EAE-intoxizierten Mäusen prozessiert. Das zu untersuchende Gewebe wurde neben der Anheftungsstelle (ROI) in vier Referenzregionen (RR1-4) unterteilt. (A, B) Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Regionen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunn-Sidak's Test ermittelt. Kontrollgruppe n= 5; Cup/EAE-Gruppe n= 4, Maßstab: 20 μ m.

3.4 Charakterisierung der Anheftungsstelle im Cup/EAE-Modell

3.4.1 Gliale Barrieren im Cup/EAE-Modell

Dieses Experiment soll die Veränderungen der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* unter neuroinflammatorischen Bedingungen untersuchen. Hierzu wurden Anti-GFAP- und Anti-IBA1-markierte Hirnschnitte verwendet, um Veränderungen der astrozytären und immunologischen Barrieren zu analysieren. Es wurden optische Dichtemessungen an Hirnschnitten von fünf

Cup/EAE-intoxikierten Mäusen durchgeführt. Die Anheftungsstelle und die Referenzregion (*Fimbriae hippocampi*) wurden in zehn konzentrische Halbkreise (Kapitel 2.4.3) unterteilt.

Tabelle 25: Ergebnisse der optischen Dichtemessungen der Cup/EAE-Gruppe in zehn konzentrischen Halbkreisen.

Konzentrischer Halbkreis	GFAP Optische Dichte [%]		IBA1 Optische Dichte [%]	
	Anheftungsstelle	Referenzregion	Anheftungsstelle	Referenzregion
1	96,7 ± 3,2	89,6 ± 8,2	67,2 ± 10,1	22,1 ± 12,4
2	97,0 ± 1,5	66,0 ± 9,8	56,9 ± 21,3	16,3 ± 6,0
3	88,1 ± 3,5	48,5 ± 9,5	48,3 ± 8,9	15,3 ± 5,0
4	80,1 ± 6,8	37,2 ± 6,1	43,8 ± 11,5	12,6 ± 3,7
5	73,9 ± 4,5	34,3 ± 5,9	40,1 ± 10,5	11,9 ± 2,6
6	71,8 ± 2,3	32,4 ± 2,0	37,5 ± 9,1	10,7 ± 3,0
7	69,9 ± 5,0	30,6 ± 2,9	32,9 ± 3,4	11,7 ± 5,8
8	71,7 ± 4,4	30,1 ± 2,5	32,0 ± 6,1	13,4 ± 5,8
9	73,3 ± 4,7	29,1 ± 3,5	30,2 ± 5,3	15,1 ± 7,4
10	73,6 ± 4,7	28,3 ± 2,2	29,0 ± 5,0	17,6 ± 7,5

Die Auswertung der Anti-GFAP-markierten Hirnschnitte zeigt an der Anheftungsstelle eine nahezu maximale optische Dichte in den ersten drei Halbkreisen, die im weiteren Verlauf bis zum fünften Halbkreis auf circa 70% sinkt und konstant auf diesem Niveau bleibt. Es zeigt sich ein hohes Hintergrundsignal der GFAP-Immunreaktivität in den letzten fünf Halbkreisen beziehungsweise im peripheren Hirnparenchym. Die Auswertung der *Fimbriae hippocampi* ergibt, dass die optische Dichte der GFAP-Immunreaktivität im ersten konzentrischen Halbkreis ebenfalls nahezu maximal ist. Diese fällt bis zum vierten Halbkreis auf ein konstant niedriges Niveau von circa 40 % optischer Dichte. Das Hintergrundsignal der Referenzregion ist niedriger als das der Anheftungsstelle.

Die Auswertung der Anti-IBA1-markierten Hirnschnitte zeigt nahe der Anheftungsstelle eine hohe optische Dichte der IBA1-Immunreaktivität, die mit größerem Abstand zur Anheftungsstelle stetig sinkt. Im Gegensatz dazu zeigt die Referenzregion keine erhöhte optische Dichte der IBA1-Immunreaktivität angrenzend an den Ventrikel. Die optische Dichte der IBA1-Immunreaktivität bleibt in allen konzentrischen Halbkreisen nahezu unverändert. Im Bereich der Anheftungsstelle ist die optische Dichte der IBA1-Immunreaktivität in allen Halbkreisen höher als in der Referenzregion.

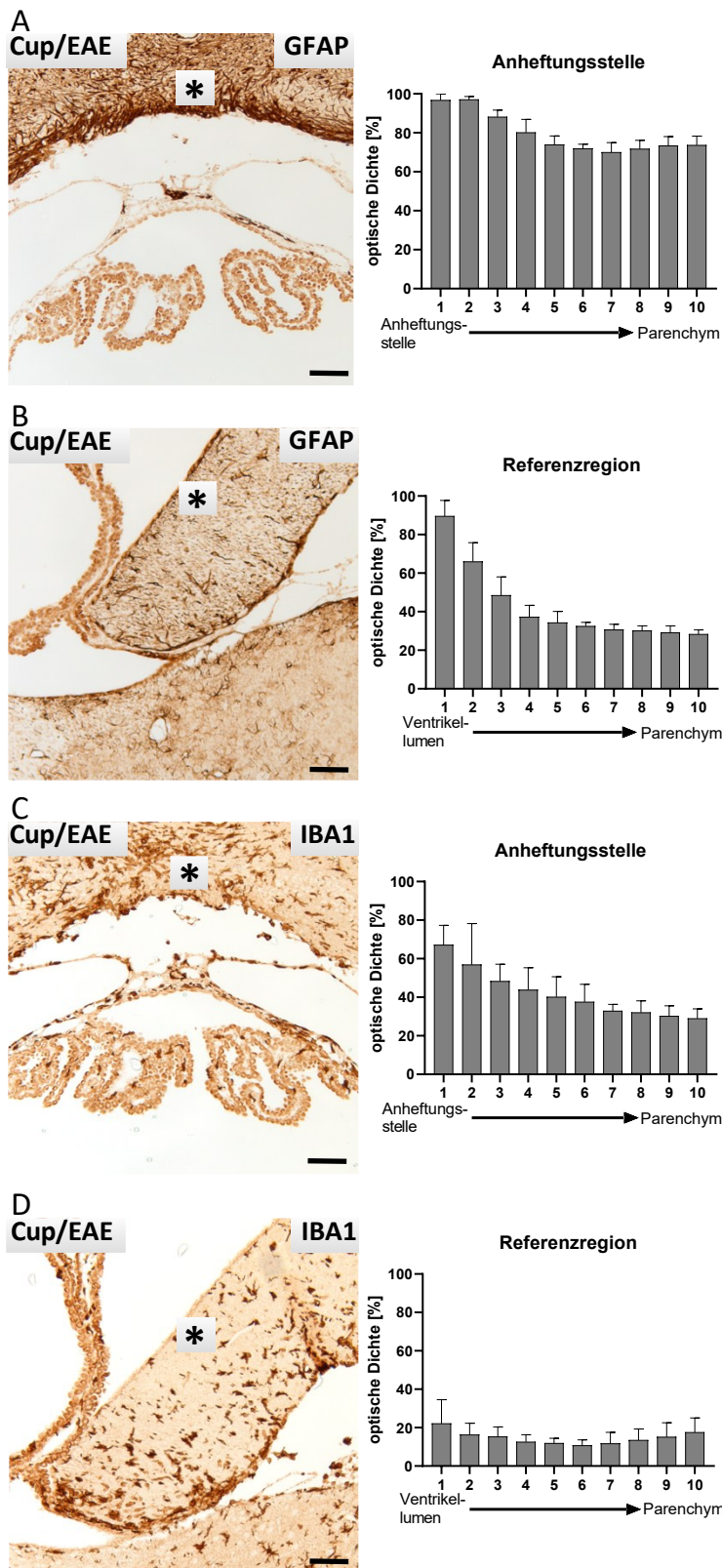


Abbildung 28: Densitometrische Untersuchung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus des dritten Ventrikels im Cup/EAE-Modell. Die optischen Dichtemessungen erfolgten durch eine Unterteilung der zu untersuchenden Region in jeweils zehn konzentrische Halbkreise mit einer Breite von 25µm pro Halbkreis. Die optische Dichte ist in Prozent angegeben. Die zu untersuchenden Regionen sind mit einem (*) markiert und liegen in Region 255-265. **(A)** Darstellung der Anti-GFAP-markierten Anheftungsstelle des Plexus choroideus des dritten Ventrikels. **(B)** Darstellung der Anti-GFAP-markierten Referenzregion. **(C)** Darstellung der Anti-IBA1-markierten Anheftungsstelle des Plexus choroideus des dritten Ventrikels. **(D)** Darstellung der Anti-IBA1-markierten Referenzregion. n= 4, Maßstab (A, B, C, D): 50µm.

3.4.2 Vergleich der glialen Barriere zwischen Kontrollgruppe und Cup/EAE-Gruppe

Um die Veränderungen der Anheftungsstelle im neuroinflammatorischen Zustand im Vergleich zum physiologischen Zustand besser beurteilen zu können, wurden die Graphen der Messungen der optischen Dichte (Tab. 20, 21, 25) der Kontrollgruppe mit der Cup/EAE-Gruppe statistisch verglichen. Beide Gruppen wurden zum selben Zeitpunkt und nach demselben Protokoll prozessiert.

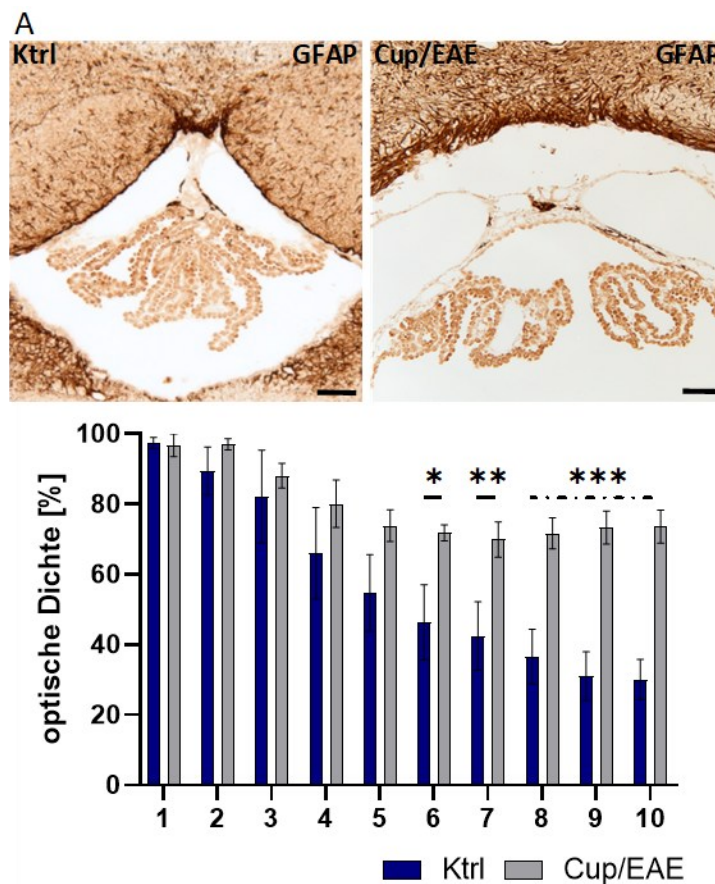


Abbildung 29: Statistischer Vergleich der astrozytären Barrieren der Anheftungsstelle des dritten Ventrikels. Zu sehen sind jeweils Darstellungen der Anti-GFAP markierten Anheftungsstellen des Plexus choroideus des dritten Ventrikels der Kontrollgruppe und Cup/EAE-Gruppe. Ab dem sechsten Halbkreis lässt sich ein signifikanter Unterschied in der optischen Dichte nachweisen, der bis zum zehnten Halbkreis zunimmt. Die optische Dichte der Cup/EAE-Gruppe bleibt in den letzten fünf Halbkreisen auf einem höheren Niveau. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem two-way ANOVA Test ermittelt. Kontrollgruppe $n=5$; Cup/EAE-Gruppe $n=4$, Maßstab: $50\mu\text{m}$.

Die Anheftungsstellen (Abb. 29) der GFAP-markierten Hirnschnitte zeigen in den ersten zwei konzentrischen Halbkreisen eine nahezu maximale optische Dichte. In beiden Gruppen sinkt die optische Dichte in den weiteren drei konzentrischen Halbkreisen. Ab dem sechsten Halbkreis lässt sich ein signifikanter Unterschied in der optischen Dichte nachweisen, der bis zum zehnten Halbkreis zunimmt, wobei die optische Dichte der Cup/EAE-Gruppe auf einem höheren Niveau bleibt.

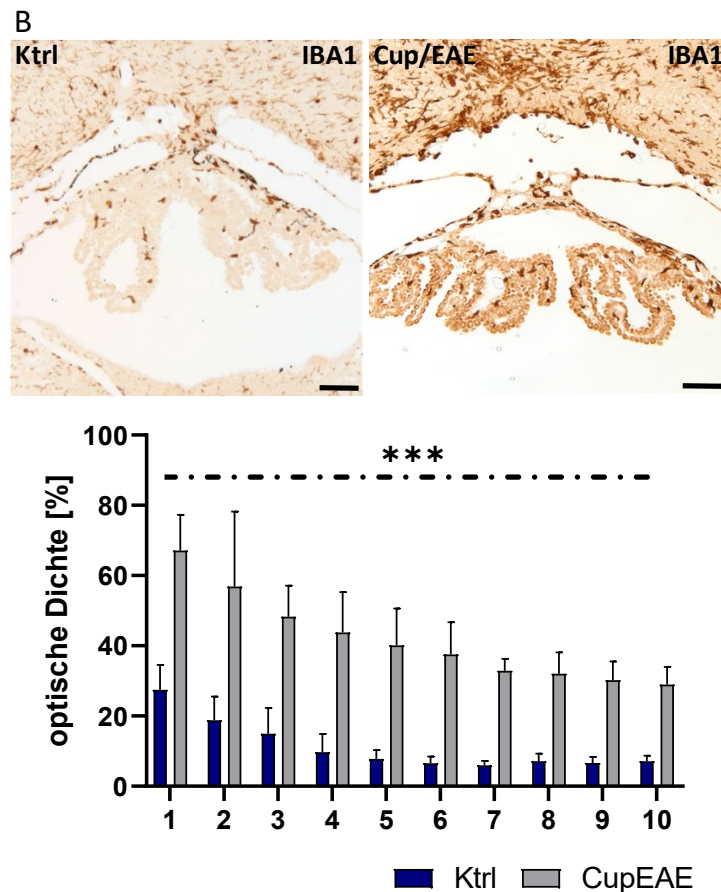


Abbildung 30: Statistischer Vergleich der immunologischen Barrieren der Anheftungsstelle des dritten Ventrikels. Zu sehen sind jeweils Darstellungen der Anti-IBA1-markierten Anheftungsstellen des Plexus choroideus des dritten Ventrikels der Kontrollgruppe und der Cup/EAE-Gruppe. Es zeigt sich über alle zehn Halbkreise ein signifikanter Unterschied in der optischen Dichte IBA1-positiver Zellen. Im Verlauf fällt die optische Dichte beider Gruppe mit ähnlicher Tendenz. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem multiplen t-Test ermittelt. Kontrollgruppe n= 5; Cup/EAE-Gruppe n= 4, Maßstab: 50µm.

Die Anheftungsstellen (Abb. 30) der IBA1-markierten Hirnschnitte zeigen über alle zehn Halbkreise in beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied in der optischen Dichte. Die optische Dichte der IBA1-Immunreaktivität ist in der Cup/EAE-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. In beiden Gruppen sinkt die optische Dichte mit ähnlichem Gefälle auf ein niedrigeres Niveau.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der angewandten Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die angewandten Methoden dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Eignung für die Fragestellungen diskutiert.

4.1.1 Diskussion der angewandten Tiermodelle

Das Cup/EAE-Modell ist eine Kombination aus dem inflammatorischen EAE-Modell und dem toxischen, zytodegenerativen Cuprizone-Modell. Es ist eines von vielen Tiermodellen, mit dem sich nur einige Teilaspekte und Charakteristika der humanen MS-Pathologie näher untersuchen lassen. Die MS-Pathologie ist von einem multifaktoriellen Krankheitsgeschehen geprägt, bei dem die Ätiologie und die Pathogenese weitgehend ungeklärt sind. Es nehmen wahrscheinlich Umwelteinflüsse, virale Infektionen und genetische Prädispositionen eine Rolle bei der Entstehung der Erkrankung ein [113, 114]. Bei dem kombinierten Cup/EAE-Modell sind die Auslöser der Pathologie bekannt und werden gezielt induziert, sodass die Komplexität der humanen Pathologie und die Pathogenese der MS nicht abgebildet werden können. Es gibt kein Tiermodell, mit dem sich die MS-Pathologie in Gänze abbilden lässt. Wie in Kapitel 1.4.1 einführend erläutert, wird für das kombinierte Cup/EAE-Modell zunächst eine Cuprizone-Intoxikation mit anschließender EAE-Induktion durchgeführt. Im Folgenden sollen sowohl das Cuprizone- und das EAE-Modell im Einzelnen als auch das kombinierte Cup/EAE-Modell diskutiert werden.

4.1.1.1 Das Cuprizone-Modell

Im Rahmen einer Cuprizone-Intoxikation kommt es zu einer Degeneration von reifer Oligodendrozyten und mit anschließenden zentralen Demyelinisierung [115, 116]. Die Wirkung der Cuprizone-Intoxikation ist von mehreren Faktoren abhängig, die die Reproduzierbarkeit der Demyelinisierung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinflussen. Hierzu gehören vor allem das Geschlecht und das Gewicht der Mäuse, der Mausstamm, das Alter der Mäuse, sowie die Applikationsdauer und die Dosis des Cuprizones [117–119]. Das Cuprizone-Modell ist ein gut etabliertes Tiermodell, welches sich durch seine sehr gute Reproduzierbarkeit auszeichnet. Mehrere Aspekte der Cuprizone-induzierten Pathologie simulieren hauptsächlich Charakteristika progressiver MS-Verlaufsformen, wie beispielsweise eine diffuse und kortikale Demyelinisierung, oxidativen Stress in Oligodendrozyten und axonale Schäden [120, 121]. Es kommt zu einer geringen Störung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität und zu keiner oder zu einer geringen Immunzellrekrutierung in die Bereiche der Demyelinisierung [97, 122, 123]. Autoimmun-immunologische Vorgänge lassen sich mit dem Cuprizone-Modell dementsprechend nicht untersuchen.

4.1.1.2 Das Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis-Modell

Die Induktion einer aktiven MOG-EAE führt, wie in der Einleitung beschrieben, zu einer Generierung von autoreaktiven Immunzellen, die spezifisch gegen das MOG₃₅₋₅₅-Peptid gerichtet sind [103]. Auch hier ist das Ausmaß der EAE von unterschiedlichen Variablen abhängig, wie dem Alter, dem Mausstamm und dem Geschlecht der Mäuse [107, 124]. Die Induktion einer MOG-EAE gilt am verwendeten C57BL/6 Stamm als gut reproduzierbar, wenngleich bei einer einheitlichen Durchführung des Experimentes die Mäuse eine unterschiedliche Ausprägung der MOG-EAE erfahren [107, 125]. Die akute MOG-EAE ist das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Erforschung der MS. Es kommt, anders als im Cuprizone-Modell, zu einer autoimmun-vermittelten geringen Demyelinisierung mit Bildung von inflammatorischen Immunzellinfiltraten im Rückenmark und Kleinhirn [104, 105]. Das Vorderhirn, einschließlich *Cortex* und *Corpus callosum* der Mäuse, bleibt bei der MOG-EAE von der Immunzellrekrutierung in das Parenchym weitgehend unbetroffen, was sich von der Lokalisation von MS-Läsionen grundlegend unterscheidet [108]. Darüber hinaus unterscheidet sich die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate im MOG-EAE-Modell von MS-Läsionen. In der akuten MOG-EAE werden hauptsächlich CD4⁺ T-Helferzellen und CD4⁺ Th17-Zellen rekrutiert, während in MS-Infiltraten CD8⁺ T-Lymphozyten dominieren [103, 126]. Das akute MOG-EAE-Modell eignet sich demnach zur Untersuchung der Mechanismen, die mit der T-Zell-Infiltration unter autoimmun-inflammatorischen Bedingungen verbunden sind [107], aber nicht für Fragestellungen mit dem Schwerpunkt auf Demyelinisierungsvorgänge.

4.1.1.3 Das kombinierte Cup/EAE-Modell

Im kombinierten Cup/EAE-Modell kommt es zur Bildung von Immunzellinfiltraten innerhalb Cuprizone-induzierter Demyelinisierungsherde. Dieses Tiermodell ermöglicht es, die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung als primären pathologischen Faktor und eine periphere Immunzellrekrutierung als sekundären pathologischen Faktor sowie deren Zusammenwirken zu untersuchen [107, 127]. Zudem kommt es im Cup/EAE-Modell fokal zum Zusammenbruch der BHS und zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel [109]. Im Gegensatz zu der akuten MOG-EAE migrieren die autoreaktiven CD4⁺ T-Lymphozyten vermehrt in das Parenchym des Vorderhirns, weshalb das Cup/EAE-Modell zur Überprüfung der Arbeitshypothese dieser Arbeit gewählt wurde [107, 109].

4.1.1.4 Klinische Relevanz

Ein Nachteil aller Tiermodelle ist die eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus. Während einige MS-Medikamente wie Natalizumab [128] oder Fingolimod [129] auf Basis der oben genannten Tiermodelle entwickelt werden konnten, erzielte das Medikament Laquinimod, das in Cuprizone-intoxikierten Mäusen die Pathologie reduziert [130], in klinischen MS-Studien nur moderate therapeutische Effekte [131]. Dennoch sind Tierexperimente ein wichtiger Teil der präklinischen experimentellen Forschung. Sie bieten die Möglichkeit, verschiedene Wechselbeziehungen innerhalb einer Pathologie in einem komplexen Organismus zu untersuchen.

4.1.2 Histologische Untersuchungsmethoden

Der Großteil der histologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurde an Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE)-Material durchgeführt. FFPE-Material zeichnet sich durch einen guten morphologischen Erhalt aus, der besonders bei feinen Strukturen wie dem *Plexus choroideus* und dessen Anheftungsstelle wichtig ist. Jedoch wird die Reaktivität mit den Antikörpern durch die Paraffin-Einbettung oft vermindert und kann verfälscht sein [132, 133].

4.1.2.1 Histologische Markierungen, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Für eine anatomisch-histologische und morphologische Untersuchung der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* wurden bewährte und etablierte Methoden der indirekten Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendet. Da ein dreidimensionales Verständnis bei der Auswertung einzelner koronarer Schnitte erschwert ist, wurden konsekutive Schnittserien mit histochemischen Färbungen wie der HE-Färbung markiert und analysiert.

Mit den verwendeten Methoden lassen sich gezielt ein oder mehrere Antigene visualisieren. Es können die Lokalisationen physiologischer und pathologisch-veränderter Expressionen von Antigenen in gesundem und in erkranktem Gewebe nachgewiesen werden. Mehrere Faktoren können zu unspezifischen Signalen und Autofluoreszenz führen. Darunter zählen unter anderem die erwähnte Formalin-Fixierung und weitere in Kapitel 2.2.3 aufgeführte Ursachen. Eine der häufigsten Fehlerquellen für ein unspezifisches Signal sind die verwendeten Primärantikörper, welche an Strukturen binden, die nicht dem Zielantigen entsprechen. Um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu erkennen, wurden zu jedem Arbeitsprotokoll Negativkontrollen sowie Kreuzkontrollen (Kapitel 2.2.7) mitgeführt. Ein Nachteil von Immunfluoreszenzmarkierungen ist, dass das fluorochrome Signal der markierten Schnitte mit anhaltender Licht-Exposition verbleicht. Die Aufnahmen aller Schnitte einer Markierung wurden am selben Tag und mit den selben

Belichtungs- und Intensitätseinstellungen am Mikroskop durchgeführt, wodurch eine Vergleichbarkeit zwischen den Aufnahmen und Gruppen gewährleistet werden konnte.

4.1.2.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die TEM ist eine bewährte Methode zur ultrastrukturellen Untersuchung der Morphologie von Gewebearealen. Im Gegensatz zu der angewandten Immunhistochemie und Immunfluoreszenz stellt die TEM ein direktes Nachweisverfahren von Strukturen dar. Mit der TEM können nach der Kontrastierung mehrere morphologische Informationen mit einer höheren Vergrößerung gleichzeitig abgeleitet werden. Voraussetzung für reproduzierbare morphologische Beobachtungen sind die exakte Ausrichtung und Dicke der Hirnscheiben, da bereits geringe Änderungen in der Ebene zu Problemen beim Auffinden der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* führen. Bei der TEM lassen sich jedoch keine konkreten Proteine visualisieren und dadurch beispielsweise Zell-Zell-Kontakte nicht charakterisieren (wie in Abb. 23). Möglich wäre eine immun-elektronenmikroskopische Markierung mittels sehr kleiner Goldpartikel zur genauen Identifizierung von Proteinen.

4.1.3 Genexpressionsanalysen

Genexpressionsanalysen mittels qPCR ermöglichen semiquantitative Aussagen über die Aktivität eines Gens und die Menge der in einem Gewebe enthaltenen mRNA eines Gens im Vergleich zu einem Kontrollgen. Es können Rückschlüsse auf die Aktivität dieses Gens gezogen werden, jedoch nicht auf die tatsächliche Menge des exprimierten Proteins, da Proteinabbau und alternative Proteinexpressionsregulation berücksichtigt werden müssten.

Die Genexpressionsanalysen dieser Arbeit stellen ein mehrteiliges Experiment dar und erfolgten gemäß Kapitel 2.3. Mit der Laser Capture Microdissection und der WTA wurden Methoden angewandt, die das Arbeiten mit sehr kleinen Probemengen ermöglichen. Die qPCR erfolgte semiautomatisiert sowie die Auswertung der qPCR standardisiert, sodass eine objektive Betrachtung der Ergebnisse gewährleistet ist. Zur Minimierung von Pipettier- Ungenauigkeiten wurden die Proben in Doubletten geführt, wobei Proben mit zu großen Abweichungen der Doubletten wurden ausgeschlossen. Positiv- und Negativkontrollen der Amplifikation und der qPCR wurden stets mitgeführt. Die Limitationen dieses Experimentes liegen in der Materialaufbereitung. Während der einzelnen Schritte, insbesondere während der Gewebeexzision und der Amplifikation, kann es zu Kontaminationen, Gewebsschäden und -verlusten kommen, die potentielle Fehlerquellen darstellen und so das Ergebnis beeinflussen und deren Beurteilung erschweren.

4.1.3 Quantifizierung der optischen Dichte, Zelldichte und Gefäßdichte

Die Quantifizierung der optischen Dichte erfolgte gemäß Kapitel 2.4.3 semiautomatisch. Der kritische Schritt ist dabei die Festlegung des Schwellenwertes für die Unterscheidung einer spezifischen Antigenmarkierung vom Hintergrundsignal. Dieser Schwellenwert bestimmt, welche Bildpunkte von der ImageJ-Software als schwarz und somit als spezifisch gewertet werden und welche Bildpunkte weiß und als Hintergrundsignal zu werten sind (siehe Kapitel 2.4.4). Die Auswahl eines nicht optimalen Schwellenwerts stellt eine potentielle Fehlerquelle dar und kann zur Verfälschung der Ergebnisse führen, indem zu viele oder zu wenige Bildpunkte als spezifisches Signal erkannt werden. Die optische Dichtemessung wurde automatisiert von der ImageJ-Software durchgeführt, nachdem der Algorithmus für die Schwellenwertermittlung vom Experimentator festgelegt wurde. Es wurde für jede Färbung individuell der Algorithmus gewählt, der die beste Abdeckung des Positivsignals bei stark sowie schwach gefärbten Schnitten gewährleistet. Dadurch muss der Experimentator den Schwellenwert nicht manuell für jede Aufnahme bestimmen, sondern alle Aufnahmen werden mit der gleichen objektiven Rechenoperation ausgewertet, vorausgesetzt die Schnitte wurden zeitgleich markiert und aufgenommen. Die Markierung der ROI sowie die Quantifizierung der Zell- und Gefäßdichte erfolgte manuell vom Experimentator. Dadurch ist es möglich, störende Einflüsse wie Gefäßlumen oder Schnittartefakte aus der Messung zu exkludieren und so die Ergebnisse vergleichbarer zu machen. Allerdings stellt eine Beeinflussung durch die Erwartungshaltung des Experimentators eine weitere potenzielle Fehlerquelle dar. Deshalb wurden die auszuwertenden Aufnahmen durch einen zweiten Experimentator verblindet. Die Kriterien zur Markierung der ROI und Referenzregionen wurden anhand topographischer Landmarken mit hoher Reproduzierbarkeit gewählt und sind in Kapitel 2.4.5 im Detail aufgeführt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden:

1. Eine erhöhte Konzentration von Astrozyten an der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel - nicht assoziiert mit einer erhöhten Dichte von Gefäßen an der Anheftungsstelle
2. Eine Astrozyten-Akkumulation an der Anheftungsstelle assoziiert mit Laminin-positiven Strukturen
3. Eine Akkumulation von CD3-positiven T-Lymphozyten in unmittelbarer Nähe der Anheftungsstelle im Cup/EAE-Modell
4. Eine erhöhte Astrozyten- und Mikroglia-Immunreaktivität an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im Cup/EAE-Modell

In den folgenden Abschnitten werden diese Ergebnisse unter Eingliederung in die aktuelle Literatur diskutiert.

4.2.1 Eine gliale Barriere an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*

Die histologisch-morphologische Beschaffenheit der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel wurde in der Literatur bislang noch nicht genau definiert. Als eine Kontaktstelle des *Plexus choroideus* zum Hirnparenchym ergibt sich hier womöglich ein direkter Zugangsweg für periphere Pathogene und Zellen aus dem Blutsystem [65, 134]. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es an kritischen Zutrittspunkten in das ZNS, wie beispielsweise Gefäßen, gliale Barrieren, die eine schützende Funktion erfüllen [40, 135]. Wichtiger Bestandteil einer glialen Barriere sind eine Basalmembran und Astrozyten [135].

Astrozyten als Teil einer glialen Barriere

Astrozyten stellen die häufigsten Gliazellen im ZNS dar, sie liegen aber nicht homogen über das gesamte ZNS verteilt vor [136]. Beispielsweise kommen GFAP-positive Astrozyten in der weißen Hirnsubstanz quantitativ häufiger vor als in der grauen Hirnsubstanz, unter diversen pathologischen Bedingungen kommt es zur Gliose (Akkumulation von Astrozyten) und schließlich sind Astrozyten wesentlicher Bestandteil glialer Grenzschichten [137, 138, 139]. Immunhistochemische Markierungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen, dass es sich bei dem Hirnparenchym der Anheftungsstelle um weiße Hirnsubstanz handelt (Abb. 20A). Obwohl die Anheftungsstelle dem SFO unmittelbar okzipital anliegt, befinden sich also keine Neurone des SFO [64] und potenziell keine Tanyzyten des SFO [50] in der Anheftungsstelle.

Astrozyten kommen an der Hirnoberfläche als Teil der *Membrana limitans gliae superficialis* in höherer Dichte vor [43, 44]. Hier nehmen die Astrozyten mit einer eigenen Basalmembran, die sich der *Pia mater* anlagert, die Rolle einer protektiven, mechanischen Barriere ein [44]. Die *Pia mater* grenzt dem Liquor-gefüllten Subarachnoidalraum direkt an [140]. Die Astrozyten sind an dieser Grenzmembran mit Wasserkanälen zur Regulation des Wasserhaushaltes ausgestattet [141, 142]. Die Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* befindet sich nicht nur in direkter Nähe zum *Liquor cerebrospinalis* des dritten Ventrikels sondern auch zum Liquor-gefüllten Subarachnoidalraum, der sich von der Hirnoberfläche bis zum Dach des dritten Ventrikels zieht (Abb. 17). Im humanen Gehirn entspricht dieser Raum dem *Cavum veli interpositi*, einer Liquor-gefüllten Hirnhautplatte, die sich über den dritten Ventrikel erstreckt [143]. Die optischen Dichtemessungen der GFAP-Markierungen zeigen eine erhöhte Immunreaktivität von Zellen an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* (Abb. 21A). Eine erhöhte, jedoch weniger ausgeprägte, optische Dichte der Immunreaktivität zeigt sich auch an der periventrikulär gelegenen

Referenzregion, den *Fimbriae hippocampi*. Es ist bekannt, dass dem basalen Abschnitt des Ventrikel-umkleidenden Ependyms ein Geflecht von Astrozyten aufsitzt [137, 144]. Diese GFAP-positiven Astrozyten sind mithilfe von Wasserkanälen an der Regulation des ZNS-Wasserhaushalts beteiligt [145, 146]. Die erhöhte periventrikuläre GFAP-Dichte an Ependym-umkleidenden Stellen, wie beispielsweise an den *Fimbriae hippocampi* (Referenzregion), lässt sich somit erklären und stellt keine gliale Barriere dar. Die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* ist nicht mit Ependym ausgekleidet und die Akkumulation GFAP-positiver Strukturen findet hier in einem höheren Maß als in der Referenzregion statt (Abb. 21A, B). Verglichen mit dem Verlauf der optischen Dichte der GFAP-Immunreaktivität bekannter glialer Grenzmembranen, wie der *Membrana limitans gliae perivascularis* (Abb. 21C, D), lässt sich an der Anheftungsstelle eine ähnlich starke Immunreaktivität beobachten. Das spricht dafür, dass die breite Zone der GFAP-Immunreaktivität an der Anheftungsstelle wie an den bekannten glialen Grenzmembranen eine mechanische Schutzfunktion in Form von Astrozyten übernehmen kann [40].

Die auf den immunhistochemischen Ergebnissen basierende Erwartung einer erhöhten relativen Expression von *Gfap* in den Genexpressionsanalysen (Abb. 25) konnte womöglich aufgrund des langwierigen Prozesses der Materialgewinnung nicht bestätigt werden. So bildet sich die morphologische Abgrenzung zu den *Fimbriae hippocampi* auf Genexpressionsebene der getesteten Marker kaum ab.

Wie bereits erwähnt kommen GFAP-positive Astrozyten als Bestandteil der *Membrana limitans gliae perivascularis* an intrakraniellen Gefäßen vor [34]. Eine weiterführende Fragestellung innerhalb dieser Arbeit lautet deshalb: „Resultiert die erhöhte optische Dichte von GFAP-positiven Zellen aus einer erhöhten Gefäßdichte an der Anheftungsstelle?“. Die Konzentration von GFAP-positiven Zellen an der Anheftungsstelle könnte Astrozyten entsprechen, die sich Gefäßen anlagern beziehungsweise eine *Membrana limitans gliae perivascularis* bilden. Um dies zu überprüfen wurde zur Visualisierung von Gefäßen an der Anheftungsstelle eine CD31-Markierung durchgeführt, die Endothelzellen markiert. Die Gefäßauszählung zeigt, dass die Anheftungsstelle keine signifikant höhere Gefäßdichte aufweist als andere periventrikulär gelegene Regionen (Abb. 27B). Es zeigt sich im Gegenteil die Tendenz, dass das Parenchym am Boden des dritten Ventrikels eine höhere Gefäßdichte aufweist. Dies bedeutet, dass die höhere GFAP-positive Immunreaktivität an der Anheftungsstelle wahrscheinlich nicht von Astrozyten der *Membrana limitans gliae perivascularis* sondern von residenten Gefäßen stammt. Die beobachteten Astrozyten an der Anheftungsstelle scheinen stattdessen einer eigenständigen glialen Barriere anzugehören.

Basallamina als Teil einer glialen Barriere

An bekannten glialen Grenzmembranen wie der *Membrana limitans gliae superficialis* ist die Basallamina Bestandteil von Basalmembranen und dient als mechanische Barriere dem Schutz des intrazerebralen Milieus [31, 147]. Eine Basallamina findet sich an Strukturen, an denen eine Abgrenzung zum umliegenden Gewebe erforderlich ist, wie beispielsweise an Gefäßen, Epithelien oder an der Hirnoberfläche [44, 147, 148]. An der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* konnten neben vaskulären Basallamina auch das Vorhandensein von nicht-vaskulär assoziierten Basallamina gezeigt werden (Abb. 20B).

Die Laminin-GFAP-Doppelmarkierung zeigt, dass die Laminin-haltigen Strukturen tatsächlich mit GFAP-positiven Zellen assoziiert als Konglomerat vorliegen. Es wird deutlich, dass die Basallamina zusammen mit dem GFAP-positiven Geflecht eine Grenze zwischen dem Hirnparenchym und dem *Plexus choroideus* schafft (Abb. 24), wobei die horizontale Grenze Laminin-positiver Strukturen wahrscheinlich in Abhängigkeit der Schnittebene nicht durchgängig erscheint. Hier wird ein weiterer morphologischer Gesichtspunkt einer glialen Barriere erfüllt. Dies zeigt sich ebenfalls in den TEM-Aufnahmen von Abschnitten nahe der Anheftungsstelle. Die Intermediärfilament-enhaltenden Zellen, die wahrscheinlich Astrozyten darstellen, sind von einer gemeinsamen, durchgängigen Basallamina umgeben (Abb. 23A'). Dies sind weitere Hinweise für das Vorhandensein einer glialen Grenzmembran an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*. In den Genexpressionsanalysen zeigt sich eine Tendenz zur höheren relativen *Lamb1* Expression an den *Fimbriae hippocampi* als an der Anheftungsstelle, jedoch kein signifikanter Unterschied (Abb. 25). Weiterführend könnte eine dreidimensionale Rekonstruktion aus TEM-Aufnahmen Aufschluss über die genaue Konstellation der astrozytären und Laminin-haltigen Strukturen bringen.

Zell-Zell-Kontakte als Teil einer glialen Barriere

Ein wesentlicher Bestandteil protektiver Barrieren ist eine mechanische Verdichtung in Form von Zell-Zell-Kontakten. An der BHS geschieht dies auf Höhe des Gefäßendothels durch Tight Junctions, an der BLS auf Höhe des Plexusepithels ebenfalls mittels Tight Junctions [34, 66]. Es gibt Hinweise dafür, dass Astrozyten neben Gap Junctions auch Tight Junctions ausbilden können [149]. In den TEM-Aufnahmen sind im Bereich des interzellulären Raumes zwischen benachbarten Astrozyten Verdichtungen zu sehen, die für Tight Junctions und eine solche mechanische Barriere gegenüber peripheren Stoffen aus dem *Liquor cerebrospinalis* sprechen (Abb. 23). Tight Junctions als Bestandteil einer Barriere an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* würden parazelluläre Diffusionswege unterbinden und eine ähnlich suffiziente Barriere wie die BHS darstellen [35, 36]. Es werden weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen benötigt, um diese Zell-Zell-

Verknüpfungen sicher als Tight Junctions identifizieren zu können. Betrachtet man die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen, zeigt sich eher eine erhöhte relative Expression des Gap Junctions Gens *Cx43* an der Anheftungsstelle im Vergleich zu den Referenzregionen (Abb. 25). Um diese Beobachtung einzuordnen, braucht es eine breitere Analyse möglicher beteiligter Gene an der Anheftungsstelle, beispielsweise mit Einzelzellanalysen (engl. *single cell sequencing*).

Die Astrozyten an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* zeigen auch zu anderen umgebenden Zellen, wie den beschriebenen Zellen ohne Intermediärfilamente, enge Verknüpfungen (Abb. 23A''). Diese Zellen, die sich mit den identifizierten Astrozyten eine gemeinsame Basallamina teilen, könnten angeschnittene Zellabschnitte von weiteren Astrozyten sein, die weniger GFAP-assoziierte Intermediärfilamente exprimieren und stattdessen mehr Vimentin-assoziierte Intermediärfilamente besitzen [150]. Vimentin-Intermediärfilamente stellen sich elektronenmikroskopisch weniger prominent dar. Eine solche Art von Gliazellen können auch Tanyzyten sein [151]. Tanyzyten besitzen im Gegensatz zu Astrozyten vermehrt Vimentin-Intermediärfilamente und weniger GFAP-assoziierte Intermediärfilamente [151, 152]. Außerdem kommen sie insbesondere im SFO vor und haben somit eine direkte Nähe zur Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* [50]. Um den Verdacht zu bestätigen, dass sich Tanyzyten des SFO an der potenziellen glialen Grenzmembran der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* beteiligen, ist eine immun-elektronenmikroskopische Markierung mittels Goldpartikeln eine gebräuchliche Methode zur genauen Identifizierung des unbekannten Zelltyps.

Phagozytierende Zellen an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*

Die erhöhte optische Dichte der IBA1-Markierung zeigt, dass es neben einer erhöhten Dichte einer GFAP-positiven Immunreaktivität auch zu einer Konzentration von phagozytierenden Zellen kommt. Die Messungen an der Referenzregion zeigen im Vergleich zur Anheftungsstelle eine niedrige optische Dichte IBA1-positiver Zellen (Abb. 22). Da Anti-IBA1-AK sowohl Mikrogliazellen als auch Monozyten und Makrophagen markieren, lässt sich nicht genau feststellen, ob es sich bei den markierten Zellen an der Anheftungsstelle ausschließlich um Mikrogliazellen handelt [153]. Auch die Genexpressionsanalysen zeigen eine erhöhte Expression von *Iba1* an der Anheftungsstelle (Abb. 25). Der *Plexus choroideus* besitzt innerhalb des Plexusstromas eine eigene Makrophagen-Population (Abb. 22), die entsprechend eine räumliche Nähe zu den IBA1-positiven Zellen an der Anheftungsstelle hat [79]. Betrachtet man jedoch die fein verzweigte Morphologie der Anti-IBA1-markierten Zellen an der Anheftungsstelle, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Mikrogliazellen. Residente Mikrogliazellen an der Anheftungsstelle können durch ihre phagozytären Eigenschaften eine protektive Funktion gegen ankommende periphere Toxine und Zellen aus dem *Plexus choroideus* erfüllen [26]. Mikrogliazellen sind in der Lage auf kleinste

Veränderungen im ZNS, wie beispielsweise Änderungen der Ionenkonzentration, zu reagieren [154]. Sie können wie bei der MS in einen proinflammatorischen Zustand übergehen, proinflammatorische Mediatoren sezernieren und somit Entzündungen begünstigen [155, 156]. Mikrogliazellen gehören zudem neben Makrophagen und dendritischen Zellen zu den wenigen Zellen des ZNS, die MHC Typ 2 exprimieren und in der Lage sind T-Lymphozyten Antigene zu präsentieren [157, 158, 159]. Bei der MS würden Mikrogliazellen somit die Rekrutierung von Immunzellen begünstigen, eine chemotaktische Migration an der Anheftungsstelle wäre denkbar und wird im nächsten Abschnitt diskutiert [160]. In den TEM-Aufnahmen konnten in der Nähe der Anheftungsstelle keine Mikroglia-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden, was auf eine regional inhomogene Verteilung der Mikrogliazellen an der Anheftungsstelle hindeutet.

Insgesamt zeigen die gesammelten Informationen, dass es mehrere morphologische Charakteristika gibt, die für die Organisation einer glialen Grenzmembran an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* sprechen.

4.2.2 Die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* als Migrationsroute für Immunzellen

Die BLS bildet auf Höhe des Epithels des *Plexus choroideus* eine Barriere zwischen Blut und Liquor [58]. Der *Plexus choroideus* gehört zu den wenigen Gehirnnarealen, die eine weniger stark ausgeprägte BHS aufweisen, denn das fenestrierte Endothel der choroidalen Gefäße ohne Tight Junctions oder eine angrenzende gliale Barriere ist für die Produktion des Liquors notwendig [65, 67, 68]. Dadurch besteht auch unter physiologischen Bedingungen die Möglichkeit, dass Immunzellen durch die choroidalen Gefäße migrieren können. So konnte in Studien gezeigt werden, dass der größte Zellanteil im physiologischen *Liquor cerebrospinalis* aus T-Lymphozyten besteht [86]. Diese T-Lymphozyten bestehen zum Großteil aus T-Gedächtniszellen und übernehmen neben Mikrogliazellen wahrscheinlich die Aufgabe einer ständigen immunologischen Überwachung des ZNS. Während inflammatorischer Prozesse im ZNS kommt es durch Mikrogliazellen zur Sekretion vieler Mediatoren wie beispielsweise CXCL10 und CCL2, die eine weitere Migration von T-Lymphozyten in das Hirnparenchym begünstigen [161, 162, 163]. Hinsichtlich möglicher Migrationswege eines T-Lymphozyten ergeben sich ausgehend vom choroidalen Gefäß zwei potenzielle Wege in das Hirnparenchym: zum einen die „klassische“ Migrationsroute über das Plexusepithel, den Liquor und die Ependymzellschicht, zum anderen die alternative Migrationsroute durch das Plexusstroma.

Über das fenestrierte Endothel des choroidalen Gefäßes sowie die vaskuläre Basalmembran erfolgt die Migration des T-Lymphozyten in das Plexusstroma. Nach der klassischen Migrationsroute kann der T-Lymphozyt ausgehend vom Plexusstroma über eine Basalmembran und das Plexusepithel mit Tight Junctions in den Liquor migrieren. Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1, die ein

T-Lymphozyt zur Migration benötigt, werden auf der apikalen Seite einer Plexusepithelzelle exprimiert [164]. Das Plexusepithel ist jedoch so ausgerichtet, dass der basale Zellpol dem Plexusstroma aufsitzt [58]. Zudem zeigt eine Studie, dass T-Lymphozyten vom Liquor in den *Plexus choroideus*, also in die entgegengesetzte Richtung, migrieren können [165]. Dies spricht gegen die klassische Migrationsroute über das Plexusepithel. Der T-Lymphozyt migriert in den Liquor und muss anschließend die Ependymzellschicht überqueren, um in das Hirnparenchym zu gelangen. In einer experimentellen Schlaganfall-Studie konnte gezeigt werden, dass die Lymphozyten-Migration über den *Plexus choroideus* in das Hirnparenchym nach Blockade des Liquorflusses nicht gestoppt werden konnte [89]. Dies deutet auf eine alternative, vom Liquorproduktionsweg unabhängige Migrationsroute hin. Auf dieser alternativen Migrationsroute würde der T-Lymphozyt im Plexusstroma verweilen, zur Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* migrieren und anschließend in das Hirnparenchym übertreten [72, 166]. Die alternative Route würde zu periventrikulär-gelegenen MS-Läsionen eine direktere und kürzere Migration repräsentieren. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich an der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* eine gliale Barriere befindet. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Migration von Immunzellen über die Anheftungsstelle beziehungsweise über diese gliale Barriere untersucht.

In dieser Arbeit konnte am Cup/EAE-Modell gezeigt werden, dass die Immunzellen insbesondere im Plexusstroma-zugewandten Hirnparenchym akkumulieren (Abb. 26). Besonders deutlich in der T-Lymphozyten-Auszählung war der Unterschied zwischen der Anheftungsstelle beziehungsweise dem lateralen Bereich der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* und der Region am Ventrikelboden (Abb. 26). Wenn die Migrationsroute über das Plexusepithel und letztendlich über die Ependymzellschicht (klassische Migrationsroute) ablaufen würde, wäre zu erwarten gewesen, dass ein Teil der T-Lymphozyten nach Überquerung des Ependyms im Hirnparenchym des Ventrikelbodens akkumuliert. Die nahezu ausbleibende Immunzellrekrutierung in diese Region spricht gegen die Migration durch den *Liquor cerebrospinalis*. Inwiefern die im Plexusstroma-zugewandten Hirnparenchym akkumulierten T-Lymphozyten gerichtet über die Anheftungsstelle migriert sind, lässt sich mit den angewandten Methoden nicht feststellen. Für eine genauere Untersuchung der Immunzellrekrutierung kann beispielsweise ein Tiermodell verwendet werden, das eine lokale Markierung von choroidalen T-Lymphozyten erlaubt. Mit Hilfe einer stereotaktisch in den Ventrikel implantierten Mikro-Lichtquelle können durch Photokonversion eines in Blutzellen exprimierten inaktiven Fluoreszenzfarbstoffes in seine aktive Form T-Lymphozyten lokal im *Plexus choroideus* markiert werden. Anschließend kann zu verschiedenen Zeitpunkten die Lokalisation dieser T-Lymphozyten immunhistochemisch beobachtet werden. Mittels immunhistochemischen Doppelmarkierungen oder durchflusszytometrischen Untersuchungen kann eine Aussage über die Subpopulationen der rekrutierten T-Lymphozyten an

der Anheftungsstelle und ihre mögliche Rolle bei der Immunzellrekrutierung getroffen werden. T-Helferzellen beispielsweise würden durch die Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon- γ und Interleukin-2 für eine Aktivierung von Makrophagen und weiteren T-Lymphozyten sorgen, die eine Entzündungsreaktion begünstigen [167, 168]. Die CD31 und α -SMA-Doppelauszählung zeigt, dass es an der Anheftungsstelle im Vergleich zu anderen periventrikulären Regionen keine signifikant höhere Dichte an prä- und postkapillären Gefäßen gibt (Abb. 27C). Es ist demnach unwahrscheinlich, dass die Akkumulation der CD3-positiven Immunzellen (Abb. 26) in dem Plexusstroma-zugewandten Hirnparenchym durch eine besonders hohe Anzahl postkapillärer Venolen erklärbar ist. Eine erhöhte Expression an Adhäsions-Rezeptoren kann auch bei einer geringen Anzahl von postkapillären Venolen zu einer erhöhten Immunzellrekrutierung in das Hirnparenchym führen, was in Zukunft durch weitere Genexpressionsanalysen näher untersucht werden sollte [169].

Im Cup/EAE-Modell findet sich eine höhere Akkumulation an Mikrogliazellen an der Anheftungsstelle im Vergleich zu der gewählten Referenzregion (Abb. 28C, D). Wie einführend beschrieben, kann eine Mikrogliazell-Aktivierung an der Anheftungsstelle wie bei der MS zu einer Akkumulation von Zytokinen und Chemokinen führen [162, 170], die die T-Lymphozyten in ihrer Migration chemotaktisch beeinflussen [161, 163]. Aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten sind dazu in der Lage MMPs und reaktive Sauerstoffspezies zu sezernieren, welche Barriere-Bestandteile wie Basalmembranen in ihrer Funktion stören und eine Migration der T-Lymphozyten in das Hirnparenchym während inflammatorischer Prozesse ermöglichen [56, 171, 172, 173, 174]. Ob das Astrozyten-Geflecht an der Anheftungsstelle durch die inflammatorischen Prozesse im Cup/EAE-Modell in seiner potenziell mechanischen Schutzfunktion gestört ist, muss durch weitere Experimente untersucht werden. Es wird jedoch deutlich, dass die optische Dichte der GFAP-Immunreaktivität besonders hoch in Regionen ist, in denen auch eine T-Lymphozyten-Akkumulation stattfand, was für eine Insuffizienz und Gliose des Astrozyten-Geflechts spricht (Abb. 28A).

Betrachtet man die gesammelten Informationen, gibt es einige Hinweise darauf, dass die Anheftungsstelle als mögliche Migrationsroute fungieren kann (Tab. 26).

Tabelle 26: Argumente für eine choroidal-parenchymale Migration beziehungsweise eine Plexus-epitheliale Migration.

Argumente für eine Migration über das Plexusepithel und die Ependymzellschicht	Argumente für eine Migration über die Anheftungsstelle des <i>Plexus choroideus</i>
Größter Zellanteil im physiologischen <i>Liquor cerebrospinalis</i> besteht aus T-Lymphozyten [86].	Die Lymphozyten-Migration über den <i>Plexus choroideus</i> in das Hirnparenchym konnte nach Blockieren des Liquorflusses nicht gestoppt werden [89].
Im <i>Liquor cerebrospinalis</i> von MS-Patienten ist die T-Lymphozyten-Anzahl erhöht [84].	Zur Migration notwendige Adhäsionsmoleküle befinden sich auf der apikalen Seite des Plexusepithels und sind für T-Lymphozyten im Plexusstroma unzugänglich [164].
Geringe Akkumulation von CD3-positiven T-Lymphozyten in den dem Ventrikel-zugewandten Regionen (Abb. 26).	Akkumulation von CD3-positiven T-Lymphozyten in den dem Plexusstroma-zugewandten Regionen (Abb. 26).
Die Ependymzellschicht besitzt keine Tight Junctions und keine Basalmembran [60, 61].	Das Plexusepithel des <i>Plexus choroideus</i> besitzt Tight Junctions und bildet eine Barriere zum <i>Liquor cerebrospinalis</i> [58, 66].
Existenz einer glialen Barriere an der Anheftungsstelle des murinen <i>Plexus choroideus</i> im dritten Ventrikel unter physiologischen Bedingungen (Kapitel 3.2).	Mikrogliazellen an der Anheftungsstelle als mögliche chemotaktische Quelle für T-Lymphozyten im Plexusstroma (Kapitel 3.4).

In einer anderen Arbeit wird davon ausgegangen, dass die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* durch seine geringe Größe irrelevant für die Immunzellrekrutierung sei [175]. Mehrere Beobachtungen dieser Arbeit deuten jedoch daraufhin, dass es nicht nur eine singuläre Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* des dritten Ventrikels gibt. Über die gesamte Länge des dritten Ventrikels zeigt sich in histologischen und immunhistochemischen Färbungen der *Plexus choroideus* durch weitere kleinere dorsale und anteriore Gewebebrücken (nicht dargestellt) mit den Ventrikelwänden verbunden. Die in dieser Arbeit behandelte Anheftungsstelle stellt dabei die prominenteste dar. Die kleineren Anheftungsstellen wurden vorerst nicht näher untersucht, jedoch ist denkbar, dass sich hier ebenfalls gliale Barrierestrukturen befinden. Unter inflammatorischen Bedingungen können proinflammatorische Mediatoren eine Immunzellrekrutierung auch über

Diskussion

diese Gewebebrücken begünstigen. Zusammengenommen lässt sich vermuten, dass die Anheftungsstellen des *Plexus choroideus* durchaus relevante Orte der Immunrekutierung darstellen.

5. Schlussfolgerung

Die Kenntnis anatomischer Rekrutierungsrouten für Immunzellen ist essenziell für das Verständnis von pathologischen Prozessen der MS und anderen inflammatorischen Erkrankungen des ZNS, und stellt eine Möglichkeit für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze dar.

Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass es an der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel eine glial organisierte Barrierestruktur gibt. Die Konzentration von Astrozyten in Kombination mit Laminin-haltigen Strukturen erfüllt die morphologischen Bedingungen einer glialen Barriere. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen enge Zell-Zell-Kontakte zwischen den Astrozyten und deuten auf eine mechanische Verdichtung sowie Schutz vor peripheren Substanzen und Zellen hin. In weiteren Experimenten muss die Funktion dieser Barriere nachgewiesen werden.

Weiterhin legt diese Arbeit nahe, dass während inflammatorischer Prozesse die Rekrutierung von Immunzellen über die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel eine mögliche und wahrscheinliche Migrationsroute darstellt. In weiteren Experimenten gilt es, die gerichtete Migration über die Anheftungsstelle nachzuweisen und molekularbiologische Untersuchungen über regulatorische Faktoren der Immunzellrekrutierung durchzuführen.

6. Thesen

1. Die Multiple Sklerose ist eine inflammatorische, chronisch-degenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), bei der es im Rahmen von Immunzellmigration zur Ausbildung von Entzündungsherden im ZNS kommt.
2. Bekannte Immunzellmigrationsrouten in das ZNS führen über die Blut-Hirn-Schranke, die Blut-Liquor-Schranke oder meningeale Gefäße und den perivaskulären Spalt.
3. Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit ist die Existenz einer weiteren Migrationsroute über das Gefäßkonvolut des Liquor-produzierenden *Plexus choroideus* in das Stroma und über die Anheftungsstelle des *Plexus choroideus*. Die Anheftung des *Plexus choroideus* am Hirngewebe stellt einen vulnerablen Punkt für die Invasion von Immunzellen dar. Es ist deshalb zu erwarten, dass sie mit spezifischen Grenzstrukturen geschützt ist.
4. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen an der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* eine hohe Konzentration von Astrozyten, die über enge Zell-zu-Zell-Kontakte verbunden sind.
5. Astrozyten der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* bilden ein Konglomerat mit einer gemeinsamen Basallamina und schaffen eine Barriere zum Hirngewebe.
6. Immunhistochemische und molekularbiologische Ergebnisse legen dar, dass die Anheftungsstelle eine hohe Konzentration ortsständiger phagozytierender Zellen besitzt.
7. Unter autoimmun-inflammatorischen Bedingungen akkumulieren T-Zellen in unmittelbarer Nähe der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus*. Am Ventrikelfboden akkumulieren unter gleichen Bedingungen weniger T-Zellen.
8. Die Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* weist keine höhere Gefäßdichte auf und ist nicht stärker vaskularisiert als andere Ventrikel-nahe Areale. Es herrschen diesbezüglich gleiche Verhältnisse für eine Immunzellmigration über Gefäße.
9. Unter autoimmun-inflammatorischen Bedingungen kommt es an der Anheftungsstelle des murinen *Plexus choroideus* im dritten Ventrikel zu einer Zellvergrößerung der Astrozyten und phagozytierenden Zellen.
10. Weitere Experimente sollen sich auf molekularbiologischer Ebene mit immunregulatorischen Prozessen an der Anheftungsstelle des *Plexus choroideus* beschäftigen.

7. Literatur

1. 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;14:263–73. doi:10.1016/S1474-4422(14)70267-4.
2. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*. 2019;26:27–40. doi:10.1111/ene.13819.
3. Howard J, Trevick S, Younger DS. Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin*. 2016;34:919–39. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.016.
4. Gelfand JM. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:269–90. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00011-X.
5. Aktas O, Wattjes MP, Stangel M, Hartung H-P. Diagnose der Multiplen Sklerose: Revision der McDonald-Kriterien 2017. [Diagnosis of multiple sclerosis: revision of the McDonald criteria 2017]. *Nervenarzt*. 2018;89:1344–54. doi:10.1007/s00115-018-0550-0.
6. Rovira A, Swanton J, Tintoré M, Huerga E, Barkhof F, Filippi M, et al. A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009;66:587–92. doi:10.1001/archneurol.2009.49.
7. Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, Miszkiel KA, Thompson AJ, Plant GT, Miller DH. Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77:830–3. doi:10.1136/jnnp.2005.073247.
8. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *The Lancet Neurology*. 2006;5:343–54. doi:10.1016/S1474-4422(06)70410-0.
9. Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple sclerosis. *Annu Rev Med*. 2002;53:285–302. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103909.
10. Katz Sand I. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*. 2015;28:193–205. doi:10.1097/WCO.0000000000000206.
11. Kelsey R. Prodromal symptoms might vary between multiple sclerosis subtypes. *Nat Rev Neurol*. 2019;15:186. doi:10.1038/s41582-019-0150-z.
12. Ontaneda D, Thompson AJ, Fox RJ, Cohen JA. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *The Lancet*. 2017;389:1357–66. doi:10.1016/S0140-6736(16)31320-4.
13. Zwibel HL, Smrtka J. Improving quality of life in multiple sclerosis: an unmet need. *Am J Manag Care*. 2011;17 Suppl 5 Improving:S139-45.

14. Lorscheider J, Jokubaitis VG, Spelman T, Izquierdo G, Lugaresi A, Havrdova E, et al. Anti-inflammatory disease-modifying treatment and short-term disability progression in SPMS. *Neurology*. 2017;89:1050–9. doi:10.1212/WNL.0000000000004330.
15. Wekerle H. Immune protection of the brain--efficient and delicate. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 2:S140-4. doi:10.1086/344937.
16. Alvarez JI, Saint-Laurent O, Godschalk A, Terouz S, Briels C, Larouche S, et al. Focal disturbances in the blood-brain barrier are associated with formation of neuroinflammatory lesions. *Neurobiol Dis*. 2015;74:14–24. doi:10.1016/j.nbd.2014.09.016.
17. 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*. 2009;132:1175–89. doi:10.1093/brain/awp070.
18. Wu C, Aichinger M, Nedjic J, Klein L. Thymic epithelial cells use macroautophagy to turn their inside out for CD4 T cell tolerance. *Autophagy*. 2013;9:931–2. doi:10.4161/auto.24374.
19. Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology*. 2010;17:295–306. doi:10.1016/j.pathophys.2009.10.007.
20. Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol*. 1996;6:275–88. doi:10.1111/j.1750-3639.1996.tb00855.x.
21. Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends in Neurosciences*. 1986;9:271–7. doi:10.1016/0166-2236(86)90077-9.
22. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 2007;28:12–8. doi:10.1016/j.it.2006.11.004.
23. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flügel A, Laman JD, Weller RO. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2016;132:317–38. doi:10.1007/s00401-016-1606-5.
24. Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol*. 2009;66:739–53. doi:10.1002/ana.21800.
25. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006;52:61–76. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.011.
26. O'Loughlin E, Madore C, Lassmann H, Butovsky O. Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018. doi:10.1101/cshperspect.a028993.
27. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:463–77. doi:10.1038/nri3705.

28. Clarner T, Janssen K, Nellessen L, Stangel M, Skripuletz T, Krauspe B, et al. CXCL10 triggers early microglial activation in the cuprizone model. *J.I.* 2015;194:3400–13. doi:10.4049/jimmunol.1401459.
29. Moore CS, Cui Q-L, Warsi NM, Durafour BA, Zorko N, Owen DR, et al. Direct and indirect effects of immune and central nervous system-resident cells on human oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J Immunol.* 2015;194:761–72. doi:10.4049/jimmunol.1401156.
30. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 2005;50:427–34. doi:10.1002/glia.20207.
31. Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol.* 1999;5:556–69. doi:10.3109/13550289909021285.
32. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol.* 2017;18:123–31. doi:10.1038/ni.3666.
33. Bouras C, Riederer BM, Kövari E, Hof PR, Giannakopoulos P. Humoral immunity in brain aging and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48:477–87. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.09.009.
34. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 1967;34:207–17. doi:10.1083/jcb.34.1.207.
35. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008;57:178–201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003.
36. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 2015;282:4067–79. doi:10.1111/febs.13412.
37. Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1485-94. doi:10.1152/ajpheart.00645.2001.
38. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels. *Folia Histochem Cytobiol.* 2004;42:67–75.
39. Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Methods Mol Med.* 2003;89:385–99. doi:10.1385/1-59259-419-0:385.
40. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2018;135:311–36. doi:10.1007/s00401-018-1815-1.
41. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adh Migr.* 2013;7:48–55. doi:10.4161/cam.22826.
42. Shibasaki H. Morphological basis of the blood-brain barrier. *Shinkei Kenkyu No Shimpo.* 1969;13:164–74.

43. Klika E, Antalíková L. The membrana limitans gliae superficialis in vertebrates. *Folia Morphol (Praha)*. 1969;17:342–7.
44. Wolf J. Fine relief configuration of the brain surface as determined by the surface of the membrana limitans gliae superficialis. *Folia Morphol (Praha)*. 1970;18:244–9.
45. Magari S. Microdissection studies on leptomeninges and membrana limitans gliae. *Arch Histol Jpn*. 1966;27:211–22. doi:10.1679/aohc1950.27.211.
46. Schneider-Hohendorf T, Rossaint J, Mohan H, Böning D, Breuer J, Kuhlmann T, et al. VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J Exp Med*. 2014;211:1833–46. doi:10.1084/jem.20140540.
47. Hashimoto PH. Chapter 57: Aspects of normal cerebrospinal fluid circulation and circumventricular organs. In: Ermisch A, editor. *Circumventricular organs and brain fluid environment: Molecular and functional aspects ; [Fourth Reinhardtbrunn Symposium on "Circumventricular Organs and Brain Fluid Environment - Molecular and Functional Aspects" ... held in Leipzig Germany, from March 24 to March 29, 1991]*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 439–443. doi:10.1016/S0079-6123(08)62364-X.
48. WEINDL A. Neuroendocrine aspects of circumventricular organs. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1973;3–32.
49. McKinley MJ, McAllen RM, Davern PJ, Giles ME, Penschow JD, Sunn N, et al. *The Sensory Circumventricular Organs of the Mammalian Brain: Subfornical Organ, OVLT and Area Postrema*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg; 2013.
50. AKERT K, POTTER HD, ANDERSON JW. The subfornical organ in mammals. I. Comparative and topographical anatomy. *J Comp Neurol*. 1961;116:1–13. doi:10.1002/cne.901160102.
51. Pócsai K, Kálmán M. Glial and perivascular structures in the subfornical organ: distinguishing the shell and core. *J Histochem Cytochem*. 2015;63:367–83. doi:10.1369/0022155415575027.
52. Millhouse OE. A Golgi study of third ventricle tanycytes in the adult rodent brain. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1971;121:1–13. doi:10.1007/BF00330913.
53. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*. 2012;33:579–89. doi:10.1016/j.it.2012.07.004.
54. Steffen BJ, Breier G, Butcher EC, Schulz M, Engelhardt B. ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *Am J Pathol*. 1996;148:1819–38.
55. Charabati M, Rabanel J-M, Ramassamy C, Prat A. Overcoming the Brain Barriers: From Immune Cells to Nanoparticles. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41:42–54. doi:10.1016/j.tips.2019.11.001.

56. Rempe RG, Hartz AMS, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36:1481–507. doi:10.1177/0271678X16655551.
57. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2006;203:1007–19. doi:10.1084/jem.20051342.
58. Wolburg H, Paulus W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119:75–88. doi:10.1007/s00401-009-0627-8.
59. Stratchko L, Filatova I, Agarwal A, Kanekar S. The Ventricular System of the Brain: Anatomy and Normal Variations. *Semin Ultrasound CT MR.* 2016;37:72–83. doi:10.1053/j.sult.2016.01.004.
60. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.* 1969;40:648–77. doi:10.1083/jcb.40.3.648.
61. Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsten TV, Karaman S, Detmar M, et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med.* 2015;212:991–9. doi:10.1084/jem.20142290.
62. Chow L, Lye SJ. Expression of the gap junction protein connexin-43 is increased in the human myometrium toward term and with the onset of labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170:788–95. doi:10.1016/s0002-9378(94)70284-5.
63. Nagata S, Rhoton AL, Barry M. Microsurgical anatomy of the choroidal fissure. *Surgical Neurology.* 1988;30:3–59. doi:10.1016/0090-3019(88)90180-2.
64. SPOERRI O. UBER DIE GEFAESSVERSORGUNG DES SUBFORNIKALORGANS DER RATTE. [CONCERNING THE VASCULARIZATION OF THE SUBFORNICAL ORGAN OF THE RAT]. *Acta Anat (Basel).* 1963;54:333–48.
65. Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee S-W, Kim WJ, Yu YS, Kim K-W. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39:339–45. doi:10.5483/bmbrep.2006.39.4.339.
66. MAXWELL DS, PEASE DC. The electron microscopy of the choroid plexus. *J Biophys Biochem Cytol.* 1956;2:467–74. doi:10.1083/jcb.2.4.467.
67. DANDY WE. AN EXPERIMENTAL, CLINICAL AND PATHOLOGICAL STUDY. *Am J Dis Child.* 1914;VIII:406. doi:10.1001/archpedi.1914.02180010416002.
68. Dandy WE. EXPERIMENTAL HYDROCEPHALUS. *Ann Surg.* 1919;70:129–42. doi:10.1097/00000658-191908000-00001.

69. Chen L, Elias G, Yostos MP, Stimec B, Fasel J, Murphy K. Pathways of cerebrospinal fluid outflow: a deeper understanding of resorption. *Neuroradiology*. 2015;57:139–47. doi:10.1007/s00234-014-1461-9.
70. Strazielle N, Gherzi-Egea J-F. Demonstration of a Coupled Metabolism–Efflux Process at the Choroid Plexus as a Mechanism of Brain Protection Toward Xenobiotics. *J. Neurosci*. 1999;19:6275–89. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-15-06275.1999.
71. Gherzi-Egea J-F, Strazielle N. Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.* 2001;52:83–8. doi:10.1002/1097-0029(20010101)52:1<83::AID-JEMT10>3.0.CO;2-N.
72. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:569–81. doi:10.1038/nri1130.
73. Svenningsson A, Andersen O, Edsbacke M, Stemme S. Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol*. 1995;63:39–46. doi:10.1016/0165-5728(95)00126-3.
74. Vrethem M, Dahle C, Ekerfelt C, Forsberg P, Danielsson O, Ernerudh J. CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls. *Acta Neurol Scand*. 1998;97:215–20. doi:10.1111/j.1600-0404.1998.tb00640.x.
75. Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*. 2005;26:485–95. doi:10.1016/j.it.2005.07.004.
76. Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Mohamed R, Hay J, Johnston M. Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *Am J Physiol*. 1999;276:R818–23. doi:10.1152/ajpregu.1999.276.3.R818.
77. Weller RO, Kida S, Zhang ET. Pathways of fluid drainage from the brain--morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain Pathol*. 1992;2:277–84. doi:10.1111/j.1750-3639.1992.tb00704.x.
78. Alves de Lima K, Rustenhoven J, Kipnis J. Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol*. 2020;38:597–620. doi:10.1146/annurev-immunol-102319-103410.
79. Nathanson JA, Chun LL. Immunological function of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:1684–8. doi:10.1073/pnas.86.5.1684.
80. 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. *J Neuroimmunol*. 2008;199:133–41. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.04.035.

81. Carrithers MD, Visintin I, Viret C, Janeway CA. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 2002;129:51–7. doi:10.1016/S0165-5728(02)00172-8.
82. Kaur C, Rathnasamy G, Ling E-A. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016;75:198–213. doi:10.1093/jnen/nlv030.
83. Szmydynger-Chodobska J, Strazielle N, Zink BJ, Gherzi-Egea J-F, Chodobski A. The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:1503–16. doi:10.1038/jcbfm.2009.71.
84. Han S, Lin YC, Wu T, Salgado AD, Mexhitaj I, Wuest SC, et al. Comprehensive immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in patients with neuroimmunological diseases. *J Immunol.* 2014;192:2551–63. doi:10.4049/jimmunol.1302884.
85. Rodríguez-Lorenzo S, Konings J, van der Pol S, Kamermans A, Amor S, van Horssen J, et al. Inflammation of the choroid plexus in progressive multiple sclerosis: accumulation of granulocytes and T cells. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8:9. doi:10.1186/s40478-020-0885-1.
86. Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, et al. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8389–94. doi:10.1073/pnas.1433000100.
87. Schmitt C, Strazielle N, Gherzi-Egea J-F. Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain. *J Neuroinflammation.* 2012;9:187. doi:10.1186/1742-2094-9-187.
88. Granados-Durán P, López-Ávalos MD, Grondona JM, Del Gómez-Roldán MC, Cifuentes M, Pérez-Martín M, et al. Neuroinflammation induced by intracerebroventricular injection of microbial neuraminidase. *Front Med (Lausanne).* 2015;2:14. doi:10.3389/fmed.2015.00014.
89. 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 Neuropathol.* 2017;134:851–68. doi:10.1007/s00401-017-1758-y.
90. Carlton WW. Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone. *Experimental and Molecular Pathology.* 1969;10:274–87. doi:10.1016/0014-4800(69)90057-4.
91. Carlton WW. Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sciences.* 1967;6:11–9. doi:10.1016/0024-3205(67)90356-6.
92. Kashani IR, Chavoshi H, Pasbakhsh P, Hassani M, Omid A, Mahmoudi R, et al. Protective effects of erythropoietin against cuprizone-induced oxidative stress and demyelination in the mouse

- corpus callosum. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2017;20:886–93. doi:10.22038/ijbms.2017.9110.
93. Hemm RD, Carlton WW, Welser JR. Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1971;18:869–82. doi:10.1016/0041-008X(71)90235-3.
94. Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity; 1978.
95. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting J-Y, Suzuki K, Matsushima GK. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*. 1998;92:38–49. doi:10.1016/S0165-5728(98)00168-4.
96. Experimental demyelination caused by primary oligodendrocyte dystrophy. Regional distribution of the lesions in the nervous system of mice [corrected]; 2005.
97. Bakker DA, Ludwin SK. Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. *J Neurol Sci*. 1987;78:125–37. doi:10.1016/0022-510X(87)90055-4.
98. Boretius S, Escher A, Dallenga T, Wrzos C, Tammer R, Brück W, et al. Assessment of lesion pathology in a new animal model of MS by multiparametric MRI and DTI. *NeuroImage*. 2012;59:2678–88. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.08.051.
99. Goldberg J, Clarner T, Beyer C, Kipp M. Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice. *J Mol Neurosci*. 2015;57:166–75. doi:10.1007/s12031-015-0595-5.
100. Martin R, McFarland HF. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 1995;32:121–82. doi:10.3109/10408369509084683.
101. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133:223–44. doi:10.1007/s00401-016-1631-4.
102. Waxman FJ, Fritz RB, Hinrichs DJ. The presence of specific antigen-reactive cells during the induction, recovery, and resistance phases of experimental allergic encephalomyelitis. *Cellular Immunology*. 1980;49:34–42. doi:10.1016/0008-8749(80)90053-2.
103. Duarte J, Carrié N, Oliveira VG, Almeida C, Agua-Doce A, Rodrigues L, et al. T cell apoptosis and induction of Foxp3+ regulatory T cells underlie the therapeutic efficacy of CD4 blockade in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.I.* 2012;189:1680–8. doi:10.4049/jimmunol.1201269.
104. Linington C, Lassmann H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol*. 1987;17:61–9. doi:10.1016/0165-5728(87)90031-2.

105. Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, Tigno JT, Tary-Lehmann M, Angelov DN, Lehmann PV. MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol.* 2007;189:31–40. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.06.016.
106. Bennett J, Basivireddy J, Kollar A, Biron KE, Reickmann P, Jefferies WA, McQuaid S. Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. *J Neuroimmunol.* 2010;229:180–91. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.011.
107. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol.* 2017;27:123–37. doi:10.1111/bpa.12454.
108. Scheld M, R  ther BJ, Gro  e-Veldmann R, Ohl K, Tenbrock K, Drey  m  ller D, et al. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci.* 2016;36:1410–5. doi:10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016.
109. R  ther BJ, Scheld M, Drey  mueller 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;65:1900–13. doi:10.1002/glia.23202.
110. Yakimov V, Schweiger F, Zhan J, Behrangi N, Horn A, Schmitz C, et al. Continuous cuprizone intoxication allows active experimental autoimmune encephalomyelitis induction in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol.* 2019;152:119–31. doi:10.1007/s00418-019-01786-4.
111. Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J.I.* 2002;169:117–25. doi:10.4049/jimmunol.169.1.117.
112. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7:3. doi:10.1186/1471-2199-7-3.
113. Fern  ndez-Men  ndez S, Fern  ndez-Mor  n M, Fern  ndez-Vega I, P  rez-  lvarez A, Villafani-Echaz   J. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. From evidence to therapeutic strategies. *J Neurol Sci.* 2016;361:213–9. doi:10.1016/j.jns.2016.01.013.
114. Mu  oz-Culla M, Irizar H, Otaegui D. The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates. *Appl Clin Genet.* 2013;6:63–73. doi:10.2147/TACG.S29107.
115. H  flich KM, Beyer C, Clarner T, Schmitz C, Nyamoya S, Kipp M, Hochstrasser T. Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain Research.* 2016;1650:125–33. doi:10.1016/j.brainres.2016.08.048.
116. Hesse A, Wagner M, Held J, Br  ck W, Salinas-Riester G, Hao Z, et al. In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiol Dis.* 2010;37:362–9. doi:10.1016/j.nbd.2009.10.016.

117. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:73. doi:10.3389/fncel.2014.00073.
118. Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK. SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol.* 2009;19:467–79. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00230.x.
119. 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. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30:607–29. doi:10.1007/s10571-009-9486-z.
120. Draheim T, Liessem A, Scheld M, Wilms F, Weißflog M, Denecke B, et al. Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia.* 2016;64:2219–30. doi:10.1002/glia.23058.
121. 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;128:2705–12. doi:10.1093/brain/awh641.
122. Berghoff SA, Düking T, Spieth L, Winchenbach J, Stumpf SK, Gerndt N, et al. Blood-brain barrier hyperpermeability precedes demyelination in the cuprizone model. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5:94. doi:10.1186/s40478-017-0497-6.
123. 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.* 2021;69:925–42. doi:10.1002/glia.23937.
124. 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. *J.I.* 1999;162:3096–102.
125. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp* 2014. doi:10.3791/51275.
126. 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. doi:10.1084/jem.192.3.393.
127. Trapp BD, Nave K-A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:247–69. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313.

128. Bauer M, Brakebusch C, Coisne C, Sixt M, Wekerle H, Engelhardt B, Fässler R. Beta1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:1920–5. doi:10.1073/pnas.0808909106.
129. Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rivera R, Lee C-W, Noguchi K, et al. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:751–6. doi:10.1073/pnas.1014154108.
130. Nedelcu J, Reinbach C, Riedler P, Brendel M, Rominger A, Kaye J, et al. Laquinimod ameliorates secondary brain inflammation. *Neurobiol Dis*. 2020;134:104675. doi:10.1016/j.nbd.2019.104675.
131. Vollmer TL, Sorensen PS, Selmaj K, Zipp F, Havrdova E, Cohen JA, et al. A randomized placebo-controlled phase III trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *J Neurol*. 2014;261:773–83. doi:10.1007/s00415-014-7264-4.
132. Cerio R, MacDonald DM. Effect of routine paraffin wax processing on cell membrane immunoreactivity in cutaneous tissue. *J Clin Lab Immunol*. 1986;20:97–100.
133. Shin HJ, Kalapurakal SK, Lee JJ, Ro JY, Hong WK, Lee JS. Comparison of p53 immunoreactivity in fresh-cut versus stored slides with and without microwave heating. *Mod Pathol*. 1997;10:224–30.
134. Taguchi T, Ohtsuka A, Murakami T. Light and electron microscopic detection of anionic sites in the rat choroid plexus. *Arch Histol Cytol*. 1998;61:243–52. doi:10.1679/aohc.61.243.
135. Goldstein GW, Betz AL. The blood-brain barrier. *Sci Am*. 1986;255:74–83. doi:10.1038/scientificamerican0986-74.
136. Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*. 2015;18:942–52. doi:10.1038/nn.4043.
137. Kuchelmeister K. Zellen des Zentralnervensystems und ihre Reaktionsformen. In: Feichter G, Klöppel G, Remmele W, editors. *Pathologie: Ein Lehr- und Nachschlagebuch*. 3rd ed. Berlin: Springer; 2012. p. 3–28. doi:10.1007/978-3-642-02324-8_1.
138. Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Research*. 1972;43:429–35. doi:10.1016/0006-8993(72)90398-8.
139. Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett*. 2014;565:23–9. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.030.
140. Weed LH. Meninges and Cerebrospinal Fluid. *J Anat*. 1938;72:181–215.
141. Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiological Reviews*. 2013;93:1543–62. doi:10.1152/physrev.00011.2013.

142. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;287:1–41. doi:10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3.
143. Tubbs RS, Louis RG, Wartmann CT, Loukas M, Shoja MM, Apaydin N, Oakes WJ. The velum interpositum revisited and redefined. *Surg Radiol Anat.* 2008;30:131–5. doi:10.1007/s00276-007-0293-2.
144. Kazanis I, Lathia JD, Vadakkan TJ, Raborn E, Wan R, Mughal MR, et al. Quiescence and activation of stem and precursor cell populations in the subependymal zone of the mammalian brain are associated with distinct cellular and extracellular matrix signals. *J Neurosci.* 2010;30:9771–81. doi:10.1523/JNEUROSCI.0700-10.2010.
145. Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends in Neurosciences.* 2008;31:37–43. doi:10.1016/j.tins.2007.11.003.
146. Nielsen S, Arnulf Nagelhus E, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Petter Ottersen O. Specialized Membrane Domains for Water Transport in Glial Cells: High-Resolution Immunogold Cytochemistry of Aquaporin-4 in Rat Brain. *J. Neurosci.* 1997;17:171–80. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-01-00171.1997.
147. DEMPSEY EW, WISLOCKI GB. An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. *J Biophys Biochem Cytol.* 1955;1:245–56. doi:10.1083/jcb.1.3.245.
148. Farquhar MG. The Glomerular Basement Membrane. In: Hay ED, editor. *Cell Biology of Extracellular Matrix.* Boston, MA: Springer US; 1988. p. 335–378. doi:10.1007/978-1-4613-0881-2_12.
149. Horng S, Therattil A, Moyon S, Gordon A, Kim K, Argaw AT, et al. Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J Clin Invest.* 2017;127:3136–51. doi:10.1172/JCI91301.
150. Pekny M. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. In: *Glial cell function:* Elsevier; 2001. p. 23–30. doi:10.1016/S0079-6123(01)32062-9.
151. Sufieva DA, Kirik OV, Alekseeva OS, Korzhevskii DE. Intermediate filament proteins in tanycytes of the third cerebral ventricle in rats during postnatal ontogenesis. *J Evol Biochem Phys.* 2016;52:490–8. doi:10.1134/S1234567816060082.
152. Roessmann U, Velasco ME, Sindely SD, Gambetti P. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Research.* 1980;200:13–21. doi:10.1016/0006-8993(80)91090-2.

153. Köhler C. Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell Tissue Res.* 2007;330:291–302. doi:10.1007/s00441-007-0474-7.
154. Gong L, Tian X, Zhou J, Dong Q, Tan Y, Lu Y, et al. Iron Dyshomeostasis Induces Binding of APP to BACE1 for Amyloid Pathology, and Impairs APP/Fpn1 Complex in Microglia: Implication in Pathogenesis of Cerebral Microbleeds. *Cell Transplant.* 2019;28:1009–17. doi:10.1177/0963689719831707.
155. Bogie JFJ, Stinissen P, Hendriks JJA. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2014;128:191–213. doi:10.1007/s00401-014-1310-2.
156. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958–69. doi:10.1038/nri2448.
157. Serot JM, Foliguet B, Béné MC, Faure GC. Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium. *Neuroreport.* 1997;8:1995–8. doi:10.1097/00001756-199705260-00039.
158. Yin J, Valin KL, Dixon ML, Leavenworth JW. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J Immunol Res.* 2017;2017:5150678. doi:10.1155/2017/5150678.
159. Perlmutter LS, Scott SA, Barrón E, Chui HC. MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *J Neurosci Res.* 1992;33:549–58. doi:10.1002/jnr.490330407.
160. Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:3116. doi:10.3389/fimmu.2018.03116.
161. 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. *Eur J Immunol.* 1997;27:111–5. doi:10.1002/eji.1830270117.
162. Wang K, Song F, Fernandez-Escobar A, Luo G, Wang J-H, Sun Y. The Properties of Cytokines in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. *Am J Med Sci.* 2018;356:552–60. doi:10.1016/j.amjms.2018.08.018.
163. 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. *J. I.* 2002;168:3195–204. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3195.
164. 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 Tissue Res.* 1999;296:259–69. doi:10.1007/s004410051287.

165. Strominger I, Elyahu Y, Berner O, Reckhow J, Mittal K, Nemirovsky A, Monsonego A. The Choroid Plexus Functions as a Niche for T-Cell Stimulation Within the Central Nervous System. *Front Immunol.* 2018;9:1066. doi:10.3389/fimmu.2018.01066.
166. Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO J.* 2014;33:7–22. doi:10.1002/embj.201386609.
167. Hahn S, Erb P. The immunomodulatory role of CD4-positive cytotoxic T-lymphocytes in health and disease. *Int Rev Immunol.* 1999;18:449–64. doi:10.3109/08830189909088493.
168. Tomiyama S. Th1: mediator lymphocytes in experimental autoimmune labyrinthitis. *Acta Otolaryngol.* 2001;121:673–8. doi:10.1080/00016480152583601.
169. Sher BT, Bargatze R, Holzmann B, Gallatin WM, Matthews D, Wu N, et al. Homing Receptors and Metastasis. In: : Elsevier; 1988. p. 361–390. doi:10.1016/S0065-230X(08)60226-2.
170. 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. doi:10.1016/S1044-5323(02)00125-2.
171. Maeda A, Sobel RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55:300–9. doi:10.1097/00005072-199603000-00005.
172. Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, Newcombe J. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55:1194–204. doi:10.1097/00005072-199612000-00002.
173. Nasi M, Gaetano A de, Bianchini E, Biasi S de, Gibellini L, Neroni A, et al. Mitochondrial damage-associated molecular patterns stimulate reactive oxygen species production in human microglia. *Mol Cell Neurosci.* 2020;108:103538. doi:10.1016/j.mcn.2020.103538.
174. Yan X-B, Zhao Y-F, Yang Y-M, Wang N, He B-Z, Qiu X-T. Impact of astrocyte and lymphocyte interactions on the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris).* 2019;175:396–402. doi:10.1016/j.neurol.2018.12.006.
175. Perin P, Rossetti R, Ricci C, Cossellu D, Lazzarini S, Bethge P, et al. 3D Reconstruction of the Clarified Rat Hindbrain Choroid Plexus. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:692617. doi:10.3389/fcell.2021.692617.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MS-Klassifikationen	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) an einer Kapillare	4
Abbildung 3: Membrana limitans gliae perivascularis	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines penetrierenden Gefäßes	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer post-kapillären Venole im physiologischen und inflammatorischen Zustand.....	6
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Plexus choroideus und der Blut-Liquor-Schranke (BLS).	8
Abbildung 7: Schematische Darstellung möglicher Migrationsrouten über den Plexus choroideus	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung der zellulären Prozesse im kombinierten Cuprizone/EAE Modell	12
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer möglichen choroidal-parenchymalen Migration einer Immunzelle über die Membrana limitans gliae perichoroidalis.	13
Abbildung 10: Ablauf der Intoxikation der Cup/EAE-Gruppe mit Cuprizone und MOG ₃₅₋₅₅ -Peptid .	15
Abbildung 11: Transkardiale Perfusion	18
Abbildung 12: Färbeprinzip einer immunhistochemischen Markierung	24
Abbildung 13: Prinzip einer fluoreszierenden Doppelfärbung	29
Abbildung 14: Isotypkontrolle des Anti-CD3-Antikörpers	31
Abbildung 15: Prinzip der Laser Capture Microdissection nach Laser Pressure Catapult- Technologie	32
Abbildung 16: Ablauf der Whole Transkriptome Amplification.	37
Abbildung 17: Untersuchte Hirnregion, HE-Färbung	41
Abbildung 18: Untersuchte Hirnregion, Hämatoxylin-Färbung (H)	42
Abbildung 19: Unterteilung der verschiedenen Referenzregionen (RR1-4) und der „region of interest“ (ROI).....	45
Abbildung 20: Histologische Charakteristika der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel.	49
Abbildung 21: Untersuchung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus als astrozytäre Grenzstruktur	52
Abbildung 22: Untersuchung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus als immunologische Grenzstruktur	54

Abbildung 23: Repräsentative Darstellung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme von der Anheftungsstelle des Plexus choroideus des dritten Ventrikels	55
Abbildung 24: Repräsentative Darstellung einer Immunfluoreszenz Doppelmarkierung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel	57
Abbildung 25: Ergebnisse der qPCR Analyse von Genen glialer Proteine der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel.....	58
Abbildung 26: Immunzellrekrutierung in die periventrikulären Regionen des dritten Ventrikels. ..	60
Abbildung 27: Gefäßdichte und Dichte prä- und postkapillärer Strukturen der periventrikulären Regionen	62
Abbildung 28: Densitometrische Untersuchung der Anheftungsstelle des Plexus choroideus des dritten Ventrikels im Cup/EAE-Modell.....	64
Abbildung 29: Statistischer Vergleich der astrozytären Barrieren der Anheftungsstelle des dritten Ventrikels	65
Abbildung 30: Statistischer Vergleich der immunologischen Barrieren der Anheftungsstelle des dritten Ventrikels.....	66

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchgeführtes Tierexperiment, Verlauf 6	14
Tabelle 2: Versuchsgruppen	16
Tabelle 3: Klinische Beurteilung von Mäusen nach EAE-Induktion.	16
Tabelle 4: Entwässerung und Einbettung.....	19
Tabelle 5: Entwässerung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie.....	20
Tabelle 6: Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit anschließender Dehydrierung.....	22
Tabelle 7: Deparaffinierung und Rehydratation.....	25
Tabelle 8: Primärantikörper, die an murinem Gewebe verwendet wurden.....	26
Tabelle 9: Sekundärantikörper, die an murinem Gewebe verwendet wurden.....	26
Tabelle 10: Dehydrierung.....	27
Tabelle 11: Arbeitsschritte einer immunhistochemischen Markierung.	28
Tabelle 12: Arbeitsschritte einer Immunfluoreszenzdoppelmarkierung.	30
Tabelle 13: Arbeitsschritte einer RNA-Isolation mit dem RNeasy-Spin-Säulen System von Qiagen.	34
Tabelle 14: Mastermixzusammensetzung für die Amplifikation mittels PCR.	37
Tabelle 15: PCR-Programm der WTA2-Technologie von Sigma.	37
Tabelle 16: Mastermixzusammensetzung für die qPCR.....	40

Tabelle 17: qPCR-Programm.....	40
Tabelle 18: Verwendete Primer.....	40
Tabelle 19: Arbeitsschritte bei der Quantifizierung der optischen Dichte mit ImageJ	44
Tabelle 20: Ergebnisse der optischen Dichtemessungen in zehn konzentrischen Halbkreisen.	50
Tabelle 21: Ergebnisse der optischen Dichtemessungen in zehn konzentrischen Halbkreisen.	53
Tabelle 22: Ergebnisse der qPCR Analyse glialer Marker der Anheftungsstelle des Plexus choroideus im dritten Ventrikel.....	58
Tabelle 23: Ergebnisse der Auszählung CD3 positiver Strukturen in den periventrikulären Referenzregionen (RR).	59
Tabelle 24: Ergebnisse der Auszählung CD31-positiver und α -SMA-positiver Gefäße in den periventrikulären Regionen.....	61
Tabelle 25: Ergebnisse der optischen Dichtemessungen der Cup/EAE-Gruppe in zehn konzentrischen Halbkreisen.	63
Tabelle 26: Argumente für eine choroidal-parenchymale Migration und für eine Plexus-epitheliale Migration.....	79

8.3 Materialien und Chemikalien

Tabelle 27: Übersicht über verwendete Materialien und Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller/Firma	Bestellnummer
Agarose Low Melt	Bio&Sell	BS20.47.025
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Chromogen	Dako	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Substrat	Dako	K3468
Citronensäure-Monohydrat	Merck	5949-29-1
Chloroform/Trichlormethan	Roth	3313.1
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	Alfa Aesar	A10628
Deckgläser (24x50mm)	Menzel-Gläser	19 00 02450
Depex	Serva	18243.02
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth	T877.1
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	1.065.801.000
EAE-Kit (MOG35-55)	Hook Laboratories	EK-2110
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
Fluoroshield™ with DAPI	SIGMA	SLCC1782

Anhang

Formaldehydlösung 37%	Merck	1.03999. 1000
Formaldehydlösung 37%	Roth	7398.4
Futtermehl	Ssniff	V1530-000
Glutaraldehydlösung 25%	Merck	1.04239.0250
Haltungsfutter	Ssniff	V1534-000
Heparin-Natriumsalz	PanReac AppliChem	A3004.0001
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
Natriumacetat, wasserfrei	Merck	1.062.680.250
Natriumchlorid	Roth	0962.2
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	1.063.461.000
Natriumnitrit	Merck	1.06549.0500
Natronlauge (NaOH)	Merck	1.064.691.000
Normales Eselserum	Sigma Aldrich	D9663
Normales Ziegenserum	Vector	S-1000
Paraffin, 57-60°C	Merck	1.071.589.025
Pertussis-Toxin in Glycerol	Hook Laboratories	BT-0105
Propanol-2 ROTIPURAN ≥99,8%, p.a., ACS, ISO	Roth	6752.4
Ringer Lösung	Braun	3570030
RNase-Free DNase Set	Quiagen	79254
RNeasy Micro Kit	Quiagen	74004
Salzsäure (HCl), 37%	Merck	1.003.171.000
SensiMix™ SYBR®&Fluorescin KIT	Bioline	QT615-05
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific	J1800AMNZ
5x Taq Reaction Buffer	Bioline	BIO-21108
TransPlex® Complete Whole Transcriptom Amplification Kit	Sigma	8819961536
Tris (PUFFERAN®)	Roth	AE15.2
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (UP H2O)	Thermo Scientific	10977
Wassergel	Clear H ₂ O	70-01-5022
Wasserstoffperoxid 35% (H ₂ O ₂)	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):
 - 400g Natriumchlorid
 - 10g Kaliumchlorid
 - 84g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
 - 13,5g Kaliumdihydrogenphosphat
 - 5000ml destilliertes Wasser
 - pH-Wert auf 7,4 eingestellt
- PBS-Puffer (1x Lösung):
 - 500ml PBS (10x Lösung)
 - 4500ml destilliertes Wasser
 - pH-Wert auf 7,4 eingestellt
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer:
 - 6,05g Tris
 - 1,85g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat
 - 5000ml destilliertes Wasser
 - pH-Wert auf 9,0 eingestellt
- Citratpuffer:
 - 11,5g Citronensäure-Monohydrat
 - 5000ml destilliertes Wasser
 - pH-Wert auf 6,0 eingestellt
- Blockserum (1):
 - Verdünnung 1:20
 - 2,5ml Normales Eselserum
 - 47,5ml PBS (1x)
- Blockserum (2):
 - Verdünnung 1:20
 - 2,5ml Normales Ziegenserum
 - 47,5ml PBS (1x)
- 0,35% Wasserstoffperoxid (H_2O_2):
 - Verdünnung 1:100
 - 1ml H_2O_2 (35%)
 - 99ml PBS
- 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Komplex:
 - Verdünnung 1:50
 - 20µl DAB-Chromogen
 - 980µl DAB-Substrat
- Fixierlösung:
 - 4.6g Natriumdihydrogenphosphat
 - 8.0g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
 - 100ml Formaldehydlösung 37%
 - 900ml destilliertes Wasser

Anhang

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

9. Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater, Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, für den Anstoß zur experimentellen Forschung, die Themenvergabe und seine wertvollen kritischen Anregungen. Unsere fachlichen und persönlichen Gespräche werden mir immer positiv in Erinnerung bleiben.

Ich möchte insbesondere der Gemeinnützigen Hertie-Stiftung danken – nicht nur für die monetäre Unterstützung, sondern auch für die Gelegenheit, über den Tellerrand hinauszublicken. Die Vernetzung mit anderen jungen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern wird mir auch in Zukunft von Nutzen sein.

Für die herausragende Betreuung danke ich Dr. rer. hum. Sarah Joost, die mir bei sämtlichen Fragen und Herausforderungen dieser Arbeit sowie darüber hinaus stets kompetent und fachlich zur Seite stand.

Meinen Dank richte ich auch an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Anatomie für die methodische Einarbeitung und die wertvolle Unterstützung bei meiner Arbeit. Besonders hervorheben möchte ich Elise Vankriekelsvenne, Susann Lehmann und Leo Heinig, die mir auch bei persönlichen Anliegen stets zur Seite standen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie. Besonders möchte ich meiner Schwester Kristina Manzhula danken, die mir in dieser Zeit eine immense Unterstützung war und sich zu einer hervorragenden Wissenschaftlerin entwickelt hat. Meinen Eltern, Oksana und Sergiy Manzhula, danke ich für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und mein Studium. Meinem Partner, Bastian Freundt, danke ich für den entscheidenden Glauben an mich im letzten Abschnitt dieses Weges.

10. Eidesstaatliche 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. Wissenschaftlicher Lebenslauf

Persönliches

Name: Katerina Manzhula

Geburtstag: 12.06.1999

Geburtsort: Schmerinka, Ukraine

Staatsangehörigkeit: deutsch

Anschrift: Ulmenstraße 13, 18057 Rostock

Akademischer Werdegang

2017 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,2) am Thor-Heyerdahl-Gymnasium, Kiel

seit 2017 Studium der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Rostock

2019 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2023 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/2023 Beginn des Praktischen Jahres

Wissenschaftliche Nebentätigkeit und Leistungen

seit 2019 Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock

2019 Tutorin im Kursus für mikroskopische Anatomie

2020 Tutorin im Kursus für makroskopische Anatomie

seit 2020 Medizinische Doktorandin im Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock

09/2021 Teilnahme an der CTNR Summerschool

2021 Stipendiatin der Gemeinnützigen Hertie-Stiftung im Rahmen der MS-Forschung

09/2022 Teilnahme an der 116. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Berlin

Wissenschaftliche Arbeiten

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.

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.

Beecken M, Baumann L, Vankriekelsvenne E, **Manzhula K**, Greiner T, Heinig L, Schauerte S, Kipp M, Joost S. The Cuprizone Mouse Model: A Comparative Study of Cuprizone Formulations from Different Manufacturers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Jun 23; doi: 10.3390/ijms241310564.