

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität
Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün

**Korrelation der Elastizität von Rückenmarksgewebe und
histologischen Veränderungen in einem Tiermodell der
Multiplen Sklerose**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät**

**der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Sofie Claire Groth

aus Esslingen am Neckar

Würzburg, August 2018

Referent bzw. **Referentin**: Prof. Dr. Stefanie Kürten

Koreferent bzw. **Koreferentin**: Prof. Dr. Carmen Villmann

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.März 2019

Die Promovendin ist Zahnärztin

Meiner Oma

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.1.1 Ätiologie	1
1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild.....	3
1.1.3 Pathogenese der MS	5
1.2 Tiermodelle der MS	9
1.2.1 Cuprizon-Modell	9
1.2.2 Tiermodell der murinen Theiler-Virus-Enzephalomyelitis.....	10
1.2.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	11
1.2.3.1 Induktion	12
1.2.3.2 Phänotypen des EAE-Modells	14
1.3 Pathophysiologische Veränderungen des ZNS durch MS	15
1.3.1 Inflammation.....	15
1.3.2 Demyelinisierung.....	17
1.3.3 Astrogliose	19
1.3.4 Axonale Schädigung	20
1.4 Mechanische Veränderungen bei MS	22
1.5 Zelluläre Reaktionen auf mechanische Veränderungen im ZNS	25
1.6 Ziel der Arbeit.....	29
2 Material und Methoden.....	30
2.1 Mäuse und Induktion der EAE.....	30
2.1.1 Mäuse	30

2.1.2	EAE-Induktion	30
2.1.3	Tierversorgung während der EAE.....	33
2.2	Akute Schnittpräparation	33
2.2.1	Chemikalien	33
2.2.2	Präparation.....	34
2.2.3	Schnittpräparation	35
2.3	Rasterkraftmikroskop	35
2.3.1	Einstellungen und Messungen	35
2.4	Histologie.....	36
2.4.1	Vorbehandlung.....	36
2.4.2	Paraffin-Schnitte.....	36
2.4.3	Immunhistologische Färbung des Rückenmarks	37
2.4.4	Immunhistologie für MBP	38
2.4.5	Immunhistologie für GFAP und Iba1	39
2.4.6	Immunhistologie Färbung für CD3 ⁺	39
2.4.7	Bildaufnahme	40
2.5	Datenanalyse	40
2.5.1	Semiquantitatives Scoring-System	41
2.5.2	Bestimmung der Zelldichte mittels ImageJ	43
2.5.3	Intensitätsmessung mittels ImageJ	44
2.6	Statistik.....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Histologische Veränderungen im Krankheitsverlauf der EAE	46
3.1.1	Inflammation.....	47
3.1.2	Demyelinisierung.....	52
3.1.3	Astrogliose	57

3.1.4	T-Zellinfiltration.....	62
3.2	Veränderung der Signalstärke im Krankheitsverlauf der EAE.....	66
3.2.1	Inflammation.....	66
3.2.2	Demyelinisierung.....	68
3.2.3	Astrogliose	71
3.3	Veränderung der Zelldichte im Krankheitsverlauf der EAE	72
3.4	Mechanische Eigenschaften und histologische Strukturen bei gesunden Tieren.....	75
3.5	Zusammenhänge zwischen den histologischen Parametern	76
3.6	Mechanische Veränderungen und histologische Veränderungen bei erkrankten Tieren	82
3.6.1	Zusammenhang zwischen Steifheit und semiquantitativem Score beziehungsweise Intensität	84
3.6.2	Zusammenhang zwischen Steifheit und Zelldichte.....	89
3.7	Zusammenhang zwischen der Schwere der EAE und den histologischen Veränderungen	91
4	Diskussion	96
5	Zusammenfassung	109
6	Literaturverzeichnis	111
7	Abbildungsverzeichnis.....	126
8	Tabellenverzeichnis.....	129
9	Danksagung	130
10	Lebenslauf.....	132
11	Eidesstattliche Erklärung	133

Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>Atomic force mikroskop</i>
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BBB	<i>Blood brain barrier</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
CFA	<i>Complete Freund's adjuvans</i>
CIS	<i>Clinically isolated syndrome</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GluR6	Glutamat-Rezeptor 6
Iba1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IFA	<i>Incomplete Freund's Adjuvans</i>
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin 1
IL-17	Interleukin 17
IL-6	Interleukin 6
INF- γ	Interferon- γ
K ⁺	Kalium
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	<i>Myelin basic protein</i>

MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Metallo-Matrixproteasen
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MP4	<i>MBP-PLP fusion protein</i>
MRE	Magnetresonanzelastografie
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
Na ⁺	Natrium
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NPG	n-Propylgallat
O ₂	Sauerstoff
OKB	Oligoklonale Banden
OPCs	<i>Oligodendrocyte progenitor cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	Primär progrediente MS
ROI	<i>Region of interest</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RRMS	<i>Relapsing-remitting MS</i>
SPMS	Sekundär progrediente MS
TMEV	<i>Theiler's Murines Enzephalomyelitis Virus</i>
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Krankheit, die mit vielen Fragezeichen behaftet ist. Bei der MS handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Ätiologie und Pathophysiologie noch weitgehend unbekannt sind. MS ist eine der häufigsten und bedeutsamsten entzündlichen Autoimmunerkrankungen bei jungen Erwachsenen^{1,2}. Die typischen histopathologischen Kennzeichen der MS sind Inflammation, Demyelinisierung (= Zerstörung der Myelinscheide), Untergang von Axonen und reaktive Gliose^{1,3}. Klinisch zeigen MS-Patienten ein heterogenes Krankheitsbild. Die klinischen Kennzeichen reichen von sensorischen wie auch motorischen Defiziten bis hin zu psychischen Problemen¹⁻⁴. Aus diesem Grund wird MS auch die Krankheit mit den 1.000 Gesichtern genannt.

1.1.1 Ätiologie

Bis heute gilt MS als unheilbare Krankheit. Ein Grund dafür könnte die immer noch unbekannt Ätiologie sein. Die Krankheit tritt in der Regel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf^{1,2}. Deutschlandweit leiden ca. 200.000 Menschen an MS⁵. Weltweit sind ca. 2,5 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen, wobei geografisch eine ungleichmäßige Verteilung der Krankheitsprävalenz ersichtlich ist^{1,3,6}: Am Äquator ist die Prävalenz an MS zu erkranken vergleichsweise gering, während sie zu den Polen hin ansteigt¹.

Die genaue Ursache für MS ist noch nicht geklärt. Vielmehr wird der Grund für die Erkrankung als multifaktoriell angesehen. In der Fachliteratur werden genetische wie auch Umweltfaktoren als auslösende Faktoren diskutiert. Ätiopathogenetisch ist anzunehmen, dass bei betroffenen Individuen eine genetische Prädisposition vorliegt, die durch das Vorhandensein von zusätzlichen Umweltfaktoren das Krankheitsbild der MS auslösen kann^{1,3}. Es konnte anhand von Bevölkerungs-, Familien- und Zwillingsstudien gezeigt werden, dass ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Familienmitgliedern

von MS-Patienten feststellbar ist ^{1,3}. Untersucht man eineiige Zwillinge, so zeigt sich eine Konkordanz von ca. 25 % ^{1,3,6,7}, bei dizygoten Zwillingen liegt die Konkordanz bei ca. 5 % ^{1,3,6,7}. Außerdem werden HLA-DR-Gene und DQ-Gene, welche auf Chromosom 6p21 lokalisiert sind, mit MS assoziiert ^{1-3,8}. Die Beziehung zwischen den veränderten Allelen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) und MS unterstreicht die genetische Komponente.

Generell erkranken Frauen 1,6–2,0 mal häufiger als Männer ^{1,2}. Ursache hierfür könnten hormonelle Faktoren sein. Bei der Bildgebung mittels Magnetresonanztomografie (MRT) korrelieren erhöhte Östrogen- und niedrige Progesteronspiegel mit einer verstärkten Krankheitsaktivität ¹. Unterstützt wird die Annahme eines hormonellen Einflusses durch eine geringere Schubrate während der Schwangerschaft und einem Anstieg der Schubrate in den ersten Monaten nach der Geburt ⁹. Ferner kommt es zur Verschlechterung des Krankheitsbildes während der Menstruation ¹. Der urbane Lebensstil, die Industrialisierung sowie die immer stärker werdende Umweltverschmutzung werden in der Fachliteratur ebenfalls als Risikofaktoren diskutiert ^{1,3}. So ist beispielsweise die Prävalenz für MS in Südostasien überwiegend gering, während in Japan, dem fortschrittlichsten Land in diesem Teil der Welt, die Prävalenz am höchsten ist ¹.

Wie bereits oben erwähnt, zeigt sich eine ungleichmäßige geografische Verteilung der Prävalenz auf der Erde. Nordamerika, Nordeuropa oder auch Australien sowie Neuseeland zählen zu den Ländern mit dem höchsten Risiko, an MS zu erkranken ^{3,6}. Das zu den Polen ansteigende Erkrankungsrisiko unterstützt die Vermutung, dass Vitamin-D-Mangel beziehungsweise unzureichende Sonnenexposition weitere Risikofaktoren darstellen könnten ^{1,3,6,10}. Herpesviren wie das Herpes-simplex-Virus ¹, Epstein-Barr-Virus (EBV) ^{1,11} oder auch das Humane Herpesvirus 6 ¹ zählen ebenfalls zu möglichen Risikofaktoren. Sie stehen im Verdacht, sowohl die Krankheit selbst auslösen zu können als auch einen erneuten Schub zu veranlassen.

Die multimodale Ätiologie lässt keinen klaren Krankheitserreger erkennen, das Krankheitsbild wird wahrscheinlich sowohl durch eine Vielzahl an potenziellen

genetischen Risikofaktoren als auch durch verschiedenste Umweltfaktoren verursacht.

1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Die MS ist durch ein heterogenes klinisches Erscheinungsbild gekennzeichnet. Der klinische Verlauf und die Schubrate ermöglichen eine Einteilung der Krankheit in verschiedene Stadien. Man unterscheidet drei unterschiedliche Formen der MS:

1. Schubförmig remittierendes Erscheinungsbild (schubförmig remittierende MS; engl. *Relapsing-remitting MS*, RRMS)
2. Sekundär progredientes Erscheinungsbild (sekundär progrediente MS, SPMS)
3. Primär progredientes Erscheinungsbild (primär progrediente MS; PPMS)

Von der schubförmig remittierenden MS sind etwa 85 % der MS-Erkrankten betroffen ^{1,2,4,12}.

Als Schub wird ein mindestens 24 Stunden anhaltender neuer oder wiederkehrender neurologischer Ausfall definiert ¹³. Dieser ist nicht mit einer Änderung der Körpertemperatur oder im Rahmen von Infektionen erklärbar. Er tritt mindestens 30 Tage nach einer vorausgegangenen Verschlechterung auf ¹³. Die RRMS ist durch das plötzliche Auftreten von neurologischen Ausfallerscheinungen mit anschließend teilweiser oder vollständiger Regenerationsphase gekennzeichnet ^{3,4,12,14}. Auf eine solche Regenerationsphase folgt direkt oder zeitlich versetzt ein erneuter Schub ¹². Während eines Schubs kommt es zu einer fokalen Entzündung und Demyelinisierung des ZNS ¹². Die Demyelinisierung wird in der akuten Phase durch die Rekrutierung beziehungsweise Aktivierung von Immunzellen im ZNS verursacht. Der klinische Zustand der Patienten zwischen den Schüben kann stabil bleiben oder auch zu einer fortschreitenden Behinderung führen ⁴. Ein Schub dauert in der Regel zwischen einer Woche und ein paar Monaten ^{2,14}. Die klinischen Symptome variieren je nach Lokalisation der Entzündung im ZNS ³ und werden durch die Zerstörung der Myelinscheiden und Axone verursacht ¹⁵. Die Anzahl der Schübe variiert bei unbehandelten Patienten zwischen ein- bis

zweimal pro Jahr ^{2,4}. Obwohl MS nicht heilbar ist, kann die Schubrate durch medikamentöse Immuntherapien signifikant reduziert werden ¹³.

Nach ca. 10–20 Jahren kann die RRMS in eine sekundär progrediente Form übergehen ^{1,2,4,12,15}. Dies passiert bei ca. 80 % der Erkrankten ¹². Klinisch zeichnet sich die SPMS durch kontinuierliche irreversible neurologische Defizite aus ^{2,15}. Diese sind unabhängig von einem Schub. Die charakteristischen entzündlichen Läsionen sind bei der SPMS nicht mehr vorhanden. Stattdessen wird die fortschreitende neurologische Behinderung von einer Atrophie des ZNS begleitet ¹². Als Grund für diese Erscheinungsform wird in der Fachliteratur die fortschreitende axonale Degeneration und der axonale Verlust, den das ZNS nicht mehr kompensieren kann, diskutiert ¹⁶⁻¹⁸.

Die PPMS ist die dritte und am seltensten auftretende Erscheinungsform. Sie tritt bei etwa 10–15 % der MS-Patienten auf ^{2,17}. Klinisch zeichnet sich diese Form durch seltene Schübe oder deren fast vollständige Abwesenheit aus ². Es kommt zu einem immer weiter fortschreitenden Verlust der neurologischen Funktionen ohne Genesung ¹⁷. Das durchschnittliche Erkrankungsalter ist mit 39 Jahren in der Regel 10 Jahre später als bei der RRMS ². Histopathologisch zeigt sich ein reduziertes Vorhandensein von aktiven demyelinisierten Entmarkungsherden, während fokale demyelinisierte Läsionen in der weißen Substanz immer noch vorhanden sind ¹⁹.

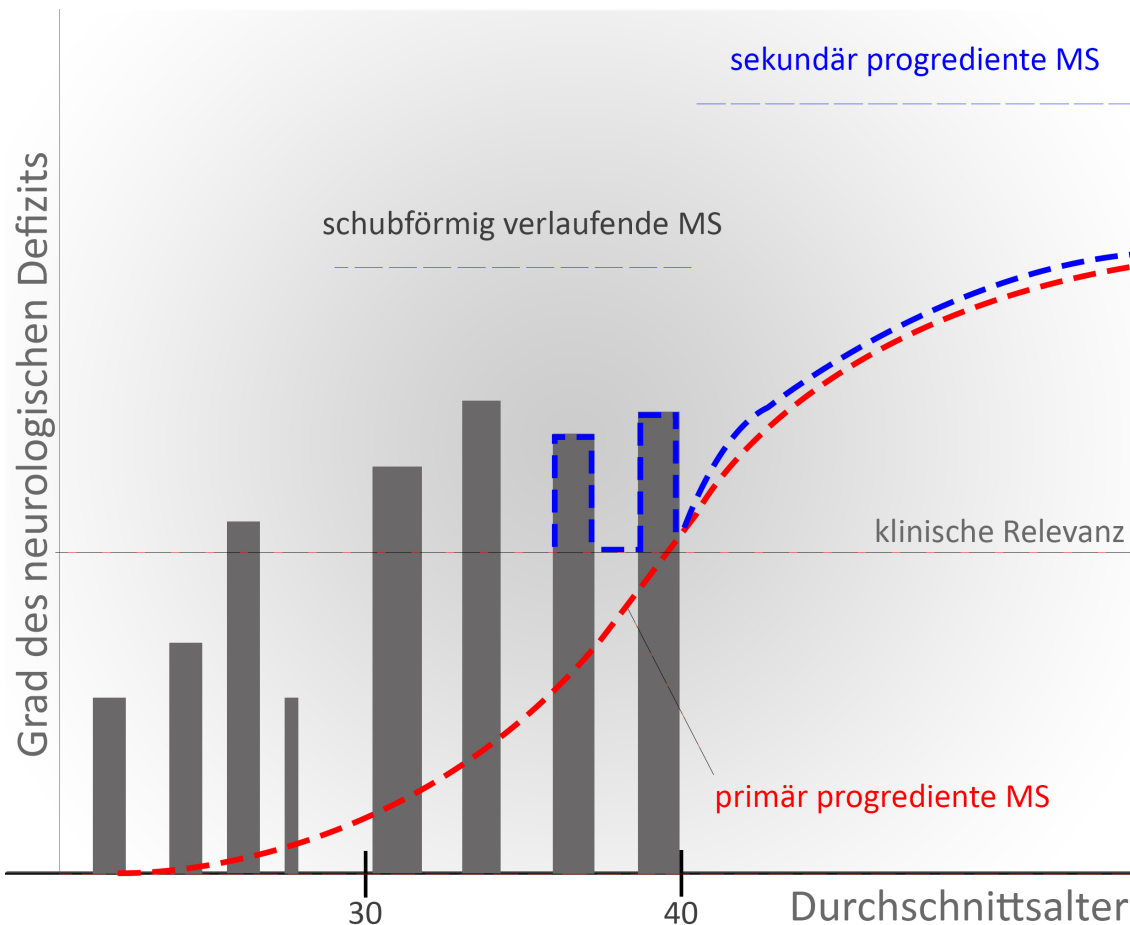


Abbildung 1 Übersicht über die verschiedenen Verlaufsformen der MS. Die grauen Balken zeigen die Verlaufsform der RRMS. Nach ca. 10-20 Jahren geht diese bei ca. 80% der Erkrankten in die SPMS über (blaue Linie). Die rote Linie spiegelt die PPMS wieder. Diese tritt bei ca. 10% der Erkrankten auf. Grafik in Anlehnung an Dendrou et al. ¹².

Etwa 10 % der Erkrankten sind 10 Jahre nach Krankheitsbeginn unfähig, selbstständig einen Haushalt zu führen ¹⁵, und ca. 50 % der Betroffenen können nach 25 Jahren nicht mehr selbstständig laufen und sind auf einen Rollstuhl angewiesen ^{12,15}. MS ist bis heute eine unheilbare, aber nicht tödliche Erkrankung. Die Lebenserwartung von MS-Erkrankten ist unabhängig von der Erscheinungsform um 6 bis 10 Jahre gegenüber der durchschnittlichen Lebenserwartung reduziert ²⁰⁻²².

1.1.3 Pathogenese der MS

MS ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS, bei der es zur Destruktion von Myelinscheiden in der weißen Substanz des Rückenmarks und des Gehirns kommt ²³. In der Fachliteratur wurde lange Zeit ein T-Zell-vermittelter

Entzündungsprozess für die Entstehung verantwortlich gemacht ²³. In neueren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die traditionelle und vereinfachte Annahme, MS sei eine reine T-Zell-vermittelte Erkrankung, zu oberflächlich ist und dass auch B-Zellen eine immer wichtigere Rolle in der Pathogenese einnehmen ²⁴⁻²⁶.

Die Anwesenheit von großen demyelinisierten, multifokalen Entmarkungsherden, den sogenannten Plaques, mit zusätzlicher Bildung von reaktiven Glianarben, unterscheidet MS von anderen inflammatorischen Erkrankungen des ZNS ²³. Nach Lassmann et al. wird die Destruktion der Myelinscheiden von einem Entzündungsprozess begleitet, der hauptsächlich aus Makrophagen und T-Zellen besteht ²³. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Krankheitsentstehung der MS sind komplex, heterogen und bis heute noch nicht vollständig geklärt. In der Fachliteratur wird als auslösendes Ereignis der Krankheit die Umwandlung von aktivierten CD4⁺-T-Zellen in T_H1- und T_H17-Subtypen verantwortlich gemacht ^{1,26}. Durch noch unbekannte auslösende Faktoren können autoreaktive T-Zellen in der Peripherie aktiviert werden ¹, die im Anschluss die Blut-Hirn-Schranke (engl. *blood brain barrier*, BBB) passieren. Diese Aktivierung erfolgt vermutlich über molekulare Mimikry ^{1,27} oder durch Bystander-Aktivierung ^{1,12}. Das Hochregulieren von Adhäsionsmolekülen wie z. B. VLA-4 (engl. *very late antigen 4*) führt zur Adhäsion von T-Zellen am Endothel ^{1,27} mit anschließender Migration der T-Zellen in das ZNS. Die Invasion der T-Zellen wird durch die Zerstörung der extrazellulären Matrix durch endogene Metallo-Matrixproteasen (MMP) gefördert ^{28,29}. Nach der Passage der aktivierten autoreaktiven Lymphozyten durch die BBB führt die Präsentation von Antigenen auf dendritische Zellen und Mikrogliazellen zur Reaktivierung der CD4⁺-T-Zellen ^{1,25}. Die reaktivierten T-Zellen sezernieren unter anderem proinflammatorische Zytokine (z. B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interferon- γ (INF- γ), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α)) und Chemokine ¹, wodurch ein Entzündungsprozess in Gang gesetzt wird. Das Ergebnis dieses Prozesses ist eine undicht gewordene BBB und die Bildung von entzündlichen ödematösen Gewebeläsionen ^{1,2}. Durch die Freisetzung der verschiedenen Mediatoren und Proteasen kommt es neben der Rekrutierung von B-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und

Mastzellen aus dem peripheren Blut auch zur Aktivierung von residenten Zellen wie Astrozyten und Mikrogliazellen¹. Ansässige Makrophagen werden ebenfalls rekrutiert und wandern zu den Läsionen, wo sie entzündliche und toxische Moleküle wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO), IL-6, IL-1 oder TNF- α sezernieren^{1,25}. Des Weiteren kommt es durch die Freisetzung von proinflammatorischen und neurotoxischen Mediatoren sowie durch einen von direktem Zellkontakt abhängigen Mechanismus zur Zerstörung und Schädigung von Myelinscheiden sowie Destruktion von Axonen¹². Die entstehende Immunantwort richtet sich gegen verschiedene Myelinproteine und Lipide der Myelinscheide²⁷. Die Ursache der Reaktivierung ist noch nicht vollständig geklärt.

Lange Zeit spielten B-Zellen bei der Pathogenese der MS nur eine untergeordnete Rolle. Ihre Funktion wurde auf die Produktion von pathogenen Antikörpern reduziert. Die untergeordnete Rolle von B-Zellen im klassischen Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE-Modell) könnte ein möglicher Grund dafür sein²⁵. Heutzutage geht man allerdings davon aus, dass B-Zellen eine weitaus gewichtigere Funktion in der Pathogenese der Erkrankung zukommt als bisher angenommen²⁴⁻²⁶. Diesbezüglich wird das Vorhandensein von oligoklonalen Banden (OKB) im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten in der Fachliteratur diskutiert²⁴. Bei 95 % der MS-Patienten konnten OKB im Liquor nachgewiesen werden^{24,30}. OKB entstehen durch intrathekale Antikörpersynthese²⁴. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die ein klinisch isoliertes Syndrom (engl. *clinically isolated syndrome*, CIS) aufweisen, die Anwesenheit von oligoklonalen Immunglobulinen das Risiko, an definitiver MS zu erkranken, erhöht³¹. Das CIS wird häufig als Vorstufe der MS betrachtet. Definitionsgemäß fasst das CIS die zuerst sichtbaren neurologischen Symptome zusammen, die mit dem Krankheitsbild der MS assoziiert sind³². Die neurologischen Symptome können nicht auf Fieber, Infektion oder Enzephalopathie zurückgeführt werden³². Dieser Zustand dauert mindestens 24 Stunden lang³². Des Weiteren korreliert die Anwesenheit von OKB mit der Schwere des Krankheitsverlaufs bei MS-Patienten^{24,33}.

Ein weiterer Hinweis, dass B-Zellen an der Pathogenese der MS beteiligt sind, ist die Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität von MS-Patienten und der Anzahl von B-Zellen im Liquor cerebrospinalis ^{24,34-36}.

Auch Lucchinetti et al. konnten zeigen, dass nicht nur T-Zellen und Makrophagen, sondern auch B-Zellen und Antikörper eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen können. In besagter Studie wurden vier verschiedene Formen von MS-Läsionen beschrieben ³⁷. Alle Läsionstypen zeigten eine Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in den entzündlichen Läsionen. Die am häufigsten aufgetretene Läsionsform war jedoch Antikörper- und Komplementfaktor-assoziiert ³⁷.

Darüber hinaus unterstützt die Tatsache, dass die selektive CD20⁺-B-Zell-Depletion ein potenziell wirksamer Ansatz bei der Behandlung von RRMS ist, die Annahme, dass B-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von MS spielen ³⁸. Hauser et al. konnten in einer placebokontrollierten Studie zeigen, dass der CD20-Antikörper Rituximab signifikant die Schubrate bei RRMS-Patienten reduziert ³⁸. Montalban et al. konnten ebenfalls in einer placebokontrollierten Studie nachweisen, dass durch den humanisierten monoklonalen CD20-Antikörper Ocrelizumab die Progression auch bei PPMS-Patienten reduziert werden konnte ³⁹. Da Hauser et al. in der oben genannten Studie zudem nachweisen konnten, dass sich der Immunglobulin (Ig)-Titer nach Rituximab-Behandlung nicht veränderte ³⁸, scheint es unwahrscheinlich, dass B-Zellen nur durch die Produktion von Autoantikörpern zur Pathogenese beitragen ²⁴. Bei der MS modulieren die B-Zellen die T-Zell-Funktionen, indem sie als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) fungieren ²⁴. Rivera et al. konnten in einer *in vivo*-Studie veranschaulichen, dass insbesondere bei geringer Antigenmenge B-Zellen eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation zukommt ⁴⁰. Auch Harp et al. konnten in einer *in vitro*-Studie belegen, dass periphere aktivierte B-Zellen als Myelin-spezifische APZ agieren können ⁴¹. Molnarfi et al. konnten durch die Antigenpräsentation von MHC-Klasse-II-Komplexen auf B-Zellen das Krankheitsbild der EAE auslösen ⁴².

Die Hypothese, dass B-Zellen in der Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen, wird zusätzlich durch das Auffinden von meningealen ektopischen

follikelähnlichen Strukturen bekräftigt. Neben dendritischen Zellen, Plasmazellen und T-Zellen sind auch B-Zellen in den follikelähnlichen Strukturen nachweisbar⁴³. Ein schwererer Verlauf der Erkrankung und ein früherer Krankheitsbeginn konnten mit diesen Strukturen in Verbindung gebracht werden⁴⁴. Des Weiteren konnte eine erhöhte Demyelinisierungsrate festgestellt werden⁴⁴.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pathogenese der MS aus vielen verschiedenen Komponenten besteht und nicht, wie ursprünglich angenommen, ein rein CD4⁺-T-Zell-abhängiger Prozess ist^{1,45}. Es spielen sowohl Komponenten des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Krankheit¹.

1.2 Tiermodelle der MS

Unser heutiges Verständnis über die Pathogenese der MS basiert größtenteils auf den Erkenntnissen, die durch die Verwendung von Tiermodellen gewonnen wurden. Die daraus gewonnenen Informationen dienen nicht nur dem Verständnis der Krankheit, sondern ermöglichen bestenfalls, weitere diagnostische Parameter zu evaluieren oder auch neue Behandlungsstrategien zu etablieren. Aufgrund der Komplexität der MS-Erkrankung gibt es nicht das eine Tiermodell, das das gesamte Spektrum der MS abdeckt^{46,47}. Durch die Verwendung verschiedener Tiermodelle wird versucht, möglichst viele MS-spezifische Komponenten abzudecken^{46,47}. Zu den wichtigsten Tiermodellen gehört das Cuprizon-Modell, das Tiermodell der murinen Theiler-Virus-Enzephalomyelitis sowie das Tiermodell der EAE. Der folgende kurze Exkurs beschreibt zum besseren Verständnis der MS-Pathophysiologie die unterschiedlichen Tiermodelle, bevor im nächsten Kapitel die pathophysiologischen Veränderungen von MS besprochen werden.

1.2.1 Cuprizon-Modell

Zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsprozessen der MS eignet sich das Cuprizon-Modell^{46,48,49}. Dabei wird eine reproduzierbare Demyelinisierung in relativer Abwesenheit einer Entzündungsreaktion in verschiedenen Hirnregionen durch den toxischen Kupfer-Chelator Cuprizon induziert^{48,50}.

Andere Zellen des ZNS mit Ausnahme von Oligodendrozyten werden durch Cuprizin nicht geschädigt ^{46,49}.

Cuprizin wird den Tieren üblicherweise über die Nahrung verabreicht. Eine fast vollständige Demyelinisierung des Corpus callosum ist nach einer 5 bis 6-wöchigen Cuprizin-Diät nachweisbar ⁴⁸. Wird die Cuprizin-Diät unterbrochen und werden die Tiere wieder mit gesundem Futter ernährt, zeigt sich innerhalb von vier Wochen ein Remyelinisierungsprozess ^{48,49}. Die genauen Ursachen der Demyelinisierung durch eine Cuprizin-Intoxikation sind noch nicht vollständig geklärt. In der Fachliteratur wird die Hemmung von mitochondrialen Enzymen der Atmungskette diskutiert, die Kupfer als Co-Faktor benötigen ⁴⁷. Diese Hemmung könnte durch die Kupfer-Chelat-Bildung des Cuprizin verursacht werden ⁴⁷. Durch die Inhibierung der Atmungskettenenzyme kommt es zum oxidativen Stress ⁴⁷. Als Konsequenz dessen kommt es zur Apoptose von Oligodendrozyten, mit zusätzlicher Astrozyten- und Mikrogliazellen-Aktivierung ^{47,49}. Aufgrund der fehlenden Autoimmunkomponente ähnelt das Cuprizin-Modell der MS nur vage ⁵⁰.

1.2.2 Tiermodell der murinen Theiler-Virus-Enzephalomyelitis

Die Injektion des murinen Theilers Enzephalomyelitis-Virus (engl. *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus*, TMEV) in Mäuse ist ein weiteres Tiermodell für die Pathogenese der MS. Ziel ist es, die Rolle von Viren in der Autoimmunität des ZNS zu evaluieren ⁵⁰. Es wird davon ausgegangen, dass es eine mögliche Verbindung zwischen demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS und Viren geben könnte ⁵¹. Bislang wurde allerdings noch keine Virusinfektion gefunden, die direkt mit MS in Verbindung gebracht werden konnte. Einige Hinweise deuten darauf hin, dass eine Infektion mit EBV eine Rolle bei der Pathogenese spielen könnte ^{11,51,52}.

Das TMEV-Tiermodell basiert auf einer virusinduzierten Demyelinisierung ⁴⁶. Das Theiler-Virus ist ein einzelsträngiges RNA-Virus aus der Familie der Picornaviridae-Viren. Man kann das Virus in zwei verschiedene Subgruppen (GDVII und TO) unterteilen. GDVII- und FA-Stränge gehören zur ersten Subgruppe. Diese Subgruppe ist für Mäuse äußerst neurovirulent und löst eine

akute Enzephalitis aus, die letztlich zum Tod führt ^{46,51}. BeAn- und DA-Stränge gehören zur zweiten Subgruppe, die auch als *Theiler's original* bekannt ist ⁵¹. Diese verursacht eine akute Polioenzephalomyelitis ⁴⁶.

Die Infektion der Mäuse mit TMEV führt zu einer diphasisch verlaufenden Erkrankung des ZNS. Zuerst kommt es zu einer akuten Krankheitsphase mit späterer chronischer Demyelinisierung ⁵¹. Das Virus verursacht in der frühen Phase Polioenzephalomyelitis. In der grauen Substanz kommt es zur Virusreplikation ⁵¹. Charakteristisches Merkmal der frühen akuten Phase ist die unterschiedlich starke und multifokale Inflammation ⁵¹. Durch die Autoimmunreaktion des ZNS kommt es zur Destruktion ⁵¹ und Apoptose ⁵³ von Neuronen in der grauen Substanz. Die Infektion von Makrophagen und Gliazellen mit dem Virus leitet die chronische Phase ein. Es kommt zur inflammatorischen Demyelinisierung mit axonaler Degeneration und Apoptose von Oligodendrozyten ⁵³. Das TME-Virus kann ausschließlich in Mäusen induziert werden und führt anders als beim EAE-Modell zu einem chronisch progredienten Verlauf ⁴⁶.

1.2.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Mithilfe des Tiermodells der EAE wurden viele weitreichende Erkenntnisse zur Immunpathogenese der MS generiert. Aufgrund der Ähnlichkeit zum humanen Krankheitsbild wird dieses experimentelle Tiermodell am häufigsten verwendet ⁵⁴. Sowohl die humane MS als auch die EAE führen zur Zerstörung der Myelinscheiden im ZNS und weisen ähnliche klinische und histopathologische Merkmale auf, wie in der Entzündungsreaktion oder in der Zusammensetzung der Infiltrate ^{45,50,52,54,55}. Anders als bei anderen Tiermodellen wird die Krankheit durch autoimmune Mechanismen ausgelöst. Im Gegensatz zu der beim Menschen auftretenden MS wird die EAE durch Immunisierung mit Eigenantigenen des ZNS verursacht ^{46,50,54,56}.

Zamvil et al. beschreiben das EAE-Modell als Prototypen der T-Zell-vermittelnden Autoimmunerkrankungen ⁵⁶. Der Ursprung des Verfahrens geht auf das Jahr 1855 zurück, als Louis Pasteur bei seinem Versuch zur Entwicklung eines Tollwutimpfstoffs das Verfahren erstmals anwendete ⁵⁷. Koritschoner und

Schweinburg konnten 1925 zeigen, dass „Paralysen und Rückenmarksentzündungen durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe“ induziert werden konnten⁵⁸. Basierend auf den Erkenntnissen von Koritschoner und Schweinburg führte der Virologe Thomas M. Rivers in den 1930er-Jahren eigene Studien mit Rhesusmakaken und Kaninchen durch⁵⁷, da er eine Parallele zwischen den neurologischen Komplikationen, die durch Tollwut hervorgerufen werden konnten, und denen von Viruserkrankungen, die das ZNS beeinträchtigen, feststellen konnte⁵⁷. Rivers et al. konnten zeigen, dass durch die Injektion von Emulsionen von normalem Kaninchenhirngewebe EAE in Primaten induziert werden kann⁵⁹. Durch die Entwicklung des kompletten Freund-Adjuvans (engl. *complete Freund's adjuvans*, CFA)⁶⁰ kann die EAE mit nur einer Immunisierung induziert werden⁶¹. Eine Vielzahl der heutigen Erkenntnisse der MS basiert auf der Verwendung von EAE-Modellen. So konnten beispielsweise die Rolle des Immunsystems, die Demyelinisierung und die axonale Schädigung im EAE-Modell genauer untersucht werden. Die daraus gewonnenen Informationen liefern wichtige Anhaltspunkte für die Therapie der MS. *In vivo* wären solche Analysen nur schwer oder gar nicht durchführbar.

1.2.3.1 Induktion

Das EAE-Modell wird heutzutage hauptsächlich bei Nagetieren wie Ratten oder Mäusen verwendet. Abhängig von der jeweiligen Fragestellung und den vorhandenen Tierstämmen können zur Auslösung der EAE verschiedene Modelle in Betracht gezogen werden. Man unterscheidet zwischen der aktiven Immunisierung, dem adoptiven passiven Transfer von T-Zellen und dem spontan induzierten EAE-Modell.

Das klassische Konzept ist die aktive Immunisierung mit Antigenen des ZNS. Die Impfung mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), basischem Myelinprotein (engl. *myelin basic protein*, MBP), Proteolipid-Protein (PLP) oder bestimmten Peptidsequenzen führt zu einer Immunreaktion des ZNS^{52,54,61}. Die Antigene werden dabei in CFA gelöst. CFA besteht aus Paraffinöl, Mannid-Monooleat und inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis*. CFA führt zu einer

vermehrten Präsentation von Antigenen, wodurch die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen stimuliert wird ⁵². Um die Krankheit in Mäusen auszulösen, wird in den meisten Fällen zusätzlich noch Pertussistoxin benötigt ⁵². Die Wirkung von Pertussistoxin kann in einer Interaktion zwischen T-Zellen und APZ resultieren ⁶². Pertussistoxin aktiviert APZ, die wiederum die T-Zell-Differenzierung fördern ⁶². Des Weiteren stimuliert das bakterielle Toxin die Bildung von Interleukin 17 (IL-17) produzierenden T_H17-Zellen ⁶³. Das proinflammatorische Zytokin IL-17 fördert die Aktivierung von pathogenen T-Zellen und spielt so eine wichtige Rolle in der Entwicklung der EAE ⁶⁴.

Durch die Myelin-Antigene werden CD4⁺-T-Zellen in der Peripherie aktiviert. Die aktivierten T-Zellen überqueren die BBB und migrieren ins ZNS, wo sie anschließend reaktiviert werden und eine Entzündungsreaktion auslösen.

Neben der aktiven Immunisierung kann die EAE auch über den passiven Transfer ausgelöst werden. Der Unterschied zur aktiven Immunisierung besteht darin, dass Myelin-spezifische T-Zelllinien oder Myelin-reaktive CD4⁺-T-Zellen, die zuvor aus der Milz und den Lymphknoten von immunisierten Spendertieren ⁶⁵ isoliert wurden, in naiven Tieren EAE induzieren können ^{52,61}. Bevor die T-Zellen in das naive Tier injiziert werden können, müssen sie aktiviert werden. Dies erfolgt *in vitro* durch enzephalitogene Antigene in Gegenwart von APZ ⁶⁵.

Zur Identifizierung von immunologischen Mechanismen, die für die Auslösung des Krankheitsprozesses der MS verantwortlich sind, wurde das spontane EAE-Modell entwickelt ⁵². Wie bei der MS wird die EAE-Erkrankung spontan ausgelöst. Dazu werden T-Zellrezeptor-transgene Mäuse, die einen MOG-spezifischen T-Zellrezeptor tragen, verwendet. Diese MOG-spezifischen T-Zellrezeptor-transgenen Mäuse entwickeln erst in den ersten Monaten nach der Geburt das Krankheitsbild der EAE ⁵². Bettelli et al. konnten zeigen, dass diese Mäuse eine spontan isolierte Optikusneuritis entwickeln können, ohne dass es einen Nachweis einer EAE gibt ⁶⁶. Erst durch die Immunisierung mit MOG und Pertussistoxin entwickeln die MOG-spezifischen T-Zellrezeptor-transgenen Mäuse das Krankheitsbild der EAE ⁶⁶. Poellinger et al. konnten in einem neu entwickelten T-Zellrezeptor-transgenen Mausmodell eine spontane schubförmig verlaufende EAE in SJL/J Mäusen induzieren ⁶⁷. Dieses Modell zeigt die

charakteristischen Merkmale der RRMS⁶⁷. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass transgene T-Zellen MOG-spezifische B-Zellen rekrutieren können⁶⁷. In Folge dessen kommt es zu einer erhöhten Antikörperproduktion gegen das MOG-Protein, wodurch die EAE-Episoden verstärkt werden⁶⁷.

Die unterschiedlichen Tiermodelle der EAE weisen Ähnlichkeit zur MS-Pathogenese auf. Sie zeigen wie die MS einen multifokalen Entzündungsprozess des ZNS auf und sind charakterisiert durch Demyelinisierung und axonale Degeneration. Die ersten klinischen Symptome der EAE treten in der Regel etwa 9–14 Tage nach der Immunisierung auf^{54,61}. Erstes Anzeichen einer EAE-Erkrankung ist das Erschlaffen der Schwanzspitze mit anschließender Lähmung der Hinterläufe. Im weiteren Verlauf der Krankheit sind die Tiere unfähig, sich aus der liegenden Position aufzurichten. Diesem Zustand folgt die Quadriplegie. Der weitere Verlauf der EAE kann zum Tode führen.

1.2.3.2 Phänotypen des EAE-Modells

EAE kann durch die Immunisierung mit verschiedenen Myelinantigenen ausgelöst werden. Je nach verwendetem Tierstamm und verwendetem Myelinantigen können unterschiedliche Krankheitsverläufe der EAE induziert werden^{52,54,61,68}. Es kann sowohl eine monophasische ZNS-Entzündungsreaktion als auch eine schubförmig remittierende Enzephalomyelitis verursacht werden. Eine monophasische und chronische Form der EAE kann z. B. in C57BL/6-Mäusen ausgelöst werden^{52,54}. Dies erfolgt durch die aktive Immunisierung mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid^{46,54}. Charakteristische Merkmale der monophasischen EAE sind multifokale Entzündungsareale, Demyelinisierung⁵⁴ sowie axonale Schädigung. Kuerten et al. konnten durch die Verwendung des MBP-PLP Fusionsproteins (engl. *MBP-PLP fusion protein*, MP4) ein weiteres EAE-Modell für C57BL/6-Mäuse etablieren⁶⁹. Im MP4-induzierten EAE-Modell tragen neben T-Zellen auch B-Zellen zur Krankheitspathologie bei. Werden C57BL/6-Mäusen mit MP4 immunisiert, so zeigen sie die klassischen Merkmale der murinen EAE⁶⁹.

Durch die aktive Immunisierung von SJL/J-Mäusen mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ kann eine schubförmig remittierende Verlaufsform induziert werden^{46,54,70}. Typische

Kennzeichen sind neben der Demyelinisierung die Astrogliose und die Schädigung von Axonen ⁵⁴. Ein monophasischer Krankheitsverlauf konnte in Lewis-Ratten, B10.PL-Mausstämmen oder auch PL/J-Mäusen durch MBP ausgelöst werden ⁵⁰. C57BL/6-Mäuse zeigen sich dagegen resistent gegenüber MBP ^{71,72}.

1.3 Pathophysiologische Veränderungen des ZNS durch MS

Infiltration von Immunzellen, Demyelinisierung, Astrogliose und axonale Schädigung zählen zu den typischen histopathologischen Kennzeichen der MS ^{1,3}. Durch die Rekrutierung von Immunzellen aus dem ZNS oder durch lokale Aktivierung von Immunzellen bei einem akuten Anfall wird ein Entzündungsprozess in Gang gesetzt, der letztlich zu Demyelinisierung, Astrogliose und axonaler Schädigung führt ¹². Die auftretenden klinischen Symptome sind abhängig von der Läsionslokalisation im ZNS ^{1,3,12}.

1.3.1 Inflammation

MS wird als eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS betrachtet. Die Entzündungsreaktion des ZNS, die durch Immunzellen ausgelöst wird, ist in allen Krankheitsstadien der MS zu erkennen. Diese Reaktion tritt verstärkt in der akuten und schubförmig verlaufenden Krankheitsform auf, ist allerdings auch in der progredienten Form wiederzufinden ⁷³. Die chronisch-entzündlichen Infiltrate bestehen hauptsächlich aus CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und aktivierten Mikrogliazellen sowie Makrophagen ^{12,74}.

Makrophagen und aktivierte Mikrogliazellen sind in den frühen aktiven Läsionen die vorherrschenden Zellen ¹² und können durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren zur Zerstörung des ZNS führen ⁶⁵. Die Aufgabe von Mikrogliazellen kann mit der Aufgabe von Makrophagen verglichen werden. Mikrogliazellen sind residente Immunzellen des ZNS ^{65,75}. Es handelt sich um Phagozyten, die eine wichtige Rolle im Abwehrprozess des Immunsystems spielen ^{65,75}. Es wird zwischen zwei verschiedenen Phänotypen von Mikrogliazellen/Makrophagen unterschieden, denen verschiedene Aufgaben im ZNS zukommen. M1-Mikrogliazellen/Makrophagen haben einen proinflammatorischen Charakter ^{75,76}. Ihre Aufgaben sind vielfältig: Sie reichen von der Produktion von Zytokinen,

Sauerstoffradikalen (engl. *reactive oxygen species*, ROS) ⁷⁶ oder auch Aminosäuren wie Glutamat, über die Phagozytose bis hin zur Präsentation von Antigenen ^{65,76}. Im Gegensatz dazu hat die zweite Subpopulation, die sogenannten M2-Mikrogliazellen/Makrophagen, einen antiinflammatorischen und immunregulatorischen Charakter ^{75,76}.

Im gesunden ZNS scannen die Mikrogliazellen das Parenchym auf schädliche Eindringlinge, die die Neuronen oder Makrogliazellen schädigen könnten ⁷⁵. Wenn jedoch aktivierte Lymphozyten in das ZNS eindringen, kommt es zu einer Aktivierung der residenten Mikrogliazellen. In diesem Zustand verändern die Mikrogliazellen ihre Morphologie ^{65,77,78} und fungieren nun als Makrophagen. Zusammen mit den infiltrierten Makrophagen stimulieren diese Zellen den Entzündungsprozess ^{75,79} und fördern gleichzeitig die Remyelinisierung ^{75,80-83}.

In aktiven Läsionen sind Makrophagen und aktivierte Mikrogliazellen nur schwer zu unterscheiden und werden deshalb oft unter dem Begriff Mikrogliazellen/Makrophagen zusammengefasst ⁷⁵.

Durch den Stimulus der Entzündung kommt es zur Aktivierung von Mikrogliazellen ⁷⁵. Diese können nun T-Zellen rekrutieren ⁷⁵ und CD4⁺-T-Zellen über MHC-II-präsentierende Makrophagen reaktivieren ⁸⁴. Die von Mikrogliazellen sezernierten MMP führen zur Zerstörung der BBB ⁶⁵ und ermöglichen den vermehrten Eintritt von Immunzellen in das ZNS. Durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 oder TNF- α wird zusätzlich ein Entzündungsprozess im ZNS in Gang gesetzt ^{65,75}. Weiterhin induzieren die proinflammatorischen Zytokine wie TNF- α und IFN- γ die Freisetzung von Glutamat ⁷⁵. N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren binden die Aminosäure Glutamat. Wird zu viel Glutamat an NMDA-Rezeptoren gebunden, sterben die Mitochondrien ebenso wie die Neuronen und Oligodendrozyten ab ⁸⁵.

Zusammen mit den infiltrierenden Makrophagen phagozytieren die Mikrogliazellen/Makrophagen zum einen Zellreste und zum anderen Bestandteile der Myelinscheide und fördern sowohl die Demyelinisierung ⁶⁵, die axonale Schädigung ⁸⁶ als auch die Remyelinisierung ⁷⁵. Diese Prozesse führen

zusammen mit den infiltrierten Immunzellen zur Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die von Mikrogliazellen/Makrophagen sezernierten Produkte zur Entzündungsreaktion des ZNS beitragen. Mikrogliazellen/Makrophagen fördern sowohl die Zerstörung der Myelinscheiden als auch die axonale Degeneration. Auf der anderen Seite tragen die Immunzellen aber auch zum Heilungsprozess bei, indem sie durch die Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen die Remyelinisierung fördern.

1.3.2 Demyelinisierung

Die primäre Demyelinisierung, d. h. die Zerstörung von Myelinscheiden mit der Bildung von fokalen, sklerotischen Plaques ist ein charakteristisches Merkmal der MS.

Im ZNS sind Oligodendrozyten für die Bildung und den Erhalt der Myelinscheide verantwortlich. Die Markscheide der myelinisierten Axone setzt sich zum größten Teil aus Lipiden und Proteinen zusammen⁸⁷. Ihre Aufgabe besteht in der elektrischen Isolation des Axons von seiner Umgebung⁸⁷. Die Isolierung ermöglicht eine sprunghafte Reizweiterleitung und verhindert, dass sich ein Aktionspotenzial nicht entlang der gesamten isolierten Strecke, sondern nur an den Ranvier-Schnürringen aufbauen muss, wodurch die Erregungsleitungsgeschwindigkeit deutlich erhöht wird⁸⁷.

Die bei der MS beobachtete Demyelinisierung wird durch die Zerstörung der Myelinscheide und der Oligodendrozyten verursacht⁶⁵. Die durch reaktivierte Lymphozyten ausgelöste Immunantwort richtet sich dabei gegen Bestandteile der Myelinscheide wie beispielsweise MBP, MOG oder PLP^{27,29}. Die Zerstörung der Myelinscheide wird als Endergebnis eines Entzündungsprozesses im ZNS betrachtet^{65,88}. Demyelinisierte Plaques sind in allen Krankheitsstadien der MS wiederzufinden⁸⁹.

Zu den histopathologischen Läsionsmerkmalen der aktiven Demyelinisierung gehört nach Lucchinetti et al. eine unregelmäßige Anordnung von Axonen und eine Reduktion der Dichte von markhaltigen Nervenfasern³⁷. Die Läsionen mit aktiv fortschreitender Demyelinisierung zeigen eine Infiltration von T-Zellen,

Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen auf³⁷. Lucchinetti et al. beschreiben in der besagten Studie vier verschiedene MS-Läsionstypen. Diese unterscheiden sich durch unterschiedliche Mechanismen der Myelinzerstörung³⁷. Die Zerstörung der Markscheide wird in Läsionstyp I vermutlich durch aktivierte Makrophagen und deren sezernierte Produkte verursacht^{23,37}. Das von Makrophagen freigesetzte TNF- α trägt nachweislich zum Demyelinisierungsprozess bei^{65,90-92} und hat vielfältige Aufgaben. Es ist ein inflammatorisches Zytokin, das sowohl die Apoptose als auch die Proliferation einiger Zellen bewirken kann⁹³. In der MS ist TNF- α in der Lage, sowohl die Myelinscheide als auch die Oligodendrozyten *in vitro* zu schädigen⁹¹. Die verstärkte demyelinisierende Wirkung von TNF- α beruht wahrscheinlich darauf, dass das Zytokin die Apoptose von Oligodendrozyten induziert⁹³. In Läsionstyp II ist die Demyelinisierung mit der Anwesenheit von Antikörperablagerungen assoziiert^{23,37}. In diesen Läsionen konnte Immunglobulin G auf der Oberfläche und im Zytoplasma von myelinabbauenden Makrophagen nachgewiesen werden⁹⁴. Neben den Antikörperablagerungen konnten auch Ablagerungen von Komplementfaktoren in diesem Läsionstyp gefunden werden⁹⁵. In Bereichen aktiver Demyelinisierung konnte ausschließlich der Komplementfaktor C9neo nachgewiesen werden⁹⁵. Die Demyelinisierung wird vermutlich durch eine Komplement-vermittelte Lyse verursacht⁹⁵. Die Zerstörung der Myelinscheiden ist im dritten Läsionstyp mit distaler Oligodendrogliopathie assoziiert³⁷. Die Demyelinisierung geht mit einem Verlust von Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) und der Apoptose von Oligodendrozyten einher^{37,96}. MAG ist im distalen Bereich der Myelinscheide lokalisiert. Aus pathologischer Sicht ähnelt dieses Muster einer ischämisch bedingten Schädigung der weißen Substanz⁹⁷. Als Entstehungsursache wird in der Fachliteratur eine Mikrozirkulationsstörung durch eine begleitende Vaskulitis oder ein Energiedefizit der Mitochondrien durch Entzündungsmediatoren diskutiert⁹⁸. Der zugrunde liegende Mechanismus der Demyelinisierung beruht wahrscheinlich auf einer funktionellen Störung von Oligodendrozyten^{37,99}, die Folge einer unbekanntem Virusinfektion^{97,100} oder Schädigung durch ein unbekanntes Toxin sein könnte³⁷.

In einer Untergruppe der progredient verlaufenden MS ist ein selten auftretendes viertes Läsionsmuster erkennbar ^{19,37}. Dieses geht mit einer primären Oligodendrozyten-Dystrophie mit sekundärer Demyelinisierung einher ^{23,37}. In diesem Läsionsmuster ist die Demyelinisierung mit einem nicht-apoptosevermittelten Tod von Oligodendrozyten assoziiert ³⁷. In der Fachliteratur wird eine Vulnerabilität der Oligodendrozyten gegenüber Entzündungsmediatoren diskutiert ⁹⁶. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt ²³.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Demyelinisierung unterschiedliche Ursachen haben kann. Die Folgen der Demyelinisierung sind jedoch bei allen Läsionsmustern die gleichen: Durch die Destruktion der Myelinscheide werden die Axone nicht mehr von der Umwelt isoliert. Die fehlende Isolation führt letztlich dazu, dass die saltatorische Erregungsleitung durch eine kontinuierliche Leitung ersetzt wird. Die kontinuierliche Erregungsleitung verläuft langsamer und der Energiebedarf wird erhöht. Infolge der gestörten Reizweiterleitung kann es zu neurologischen Ausfallerscheinungen kommen, die bis zu einem gewissen Grad reversibel sind.

1.3.3 Astrogliose

In der MS spielten Astrozyten lange Zeit nur eine untergeordnete Rolle, obwohl die Krankheit einst als eine Erkrankung der Astrozyten betrachtet wurde ¹⁰¹. Heutzutage geht man davon aus, dass Astrozyten mehrere Funktionen haben und in die Pathophysiologie von MS involviert sein könnten ¹⁰¹.

Astrozyten sind die am häufigsten vorkommenden Zellen des ZNS ¹⁰². Je nach Morphologie und der Lokalisation der Astrozyten im ZNS unterscheidet man zwei verschiedene Astrozytentypen ¹⁰³: Die protoplasmatischen Astrozyten können in der grauen Substanz nachgewiesen werden, während man die fibrilliären Astrozyten in der weißen Substanz findet ^{103,104}. Die Gliazellen erledigen viele Aufgaben, um die Hämostase im ZNS aufrecht zu erhalten ¹⁰⁵. Zu ihrem Aufgabengebiet gehören beispielsweise der Metabolismus von Neurotransmittern, die neuronale Entwicklung sowie die Regulation des extrazellulären pH-Werts oder der Kaliumkonzentration ^{103,105}. Des Weiteren

tragen die Gliazellen zur Immunantwort, die sich gegen pathogene Angriffe richtet, bei ^{101,104,106}. Infolge solcher Angriffe kommt es zur Aktivierung von Astrozyten, was als reaktive Gliose beziehungsweise Astrogliose bezeichnet wird ¹⁰¹. Durch die Aktivierung der Astrozyten kommt es zur Astrozyten-Proliferation, Hypertrophie der zellulären Prozesse ¹⁰¹, Veränderung in der Morphologie ¹⁰⁵ und zur verstärkten Expression von saurem Gliafaserprotein (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) ^{101,104,105}. Des Weiteren kommt es durch die Aktivierung von Astrozyten zur vermehrten Expression von beispielsweise Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteasen und Protease-Inhibitoren ^{101,106}. Astrogliose ist ein charakteristisches Merkmal der MS ^{65,107} und anderer neurodegenerativer Erkrankungen des ZNS ^{104,105}. Demyelinisierte Plaques von MS-Patienten sind am stärksten von reaktiven Astrozyten besiedelt ¹⁰¹.

Wie Makrophagen können aktivierte Astrozyten Neurone, Axone, Oligodendrozyten und Myelin schädigen ¹⁰⁸. Die Schädigung erfolgt durch die Freisetzung direkt toxischer Mediatoren wie Glutamat ^{106,108}, ROS sowie NO oder Adenosintriphosphat (ATP) ¹⁰⁸. Durch den Kontakt mit ATP kommt es zur Proliferation von Astrozyten und Hypertrophie der Zellkörper, wodurch eine Glianarbe gebildet werden kann ^{103,109}. Die Bildung einer Glianarbe ist die Reaktion der Astrozyten auf die destruktiven Vorgänge im ZNS. Es wird vermutet, dass die Glianarbe eine Art physikalische Barriere um demyelinisierte Areale darstellt ¹⁰⁴. Die Barriere könnte verhindern, dass sich die Gewebeerstörung weiter ausbreitet ¹⁰³. Weiterhin wird vermutet, dass das von den Astrozyten gebildete physikalische Hindernis auch einen negativen Effekt auf regenerative Prozesse ausübt, da es sowohl die Remyelinisierung als auch die axonale Regeneration verhindert ^{103,106}.

1.3.4 Axonale Schädigung

Der Übergang von der RRMS zur SPMS könnte durch die fortschreitende axonale Schädigung erklärt werden ^{2,15}. Die dabei auftretenden irreversiblen neurologischen Defizite sind möglicherweise Folgen des fortschreitenden axonalen Verlusts, der vor allem in der progredienten Phase der Krankheit auftritt

2,15,86,110,111. Der axonale Verlust kann viele Ursachen haben, z. B. infolge des Demyelinisierungsprozesses^{2,15,110,112} oder infolge des akuten Entzündungsprozesses^{86,92,113-116}. In der Fachliteratur wird häufig ein Ungleichgewicht zwischen Energiebedarf und Energiezufuhr aufgrund der Demyelinisierung und/oder des Entzündungsprozesses als eine mögliche Ursache diskutiert^{2,112,114,117}.

Im gesunden Gewebe sorgt die Myelinscheide für die schnelle Reizweiterleitung und dient gleichzeitig als Energiespeicher¹⁶. Durch die Schädigung der Markscheiden kommt es jedoch zu einer Veränderung in der Reizweiterleitung. Die schnelle saltatorische Erregungsleitung wird durch eine, durch die fehlenden Myelinscheiden langsamere und energieaufwendigere kontinuierliche Erregungsweiterleitung ersetzt. Damit die Reizweiterleitung aufrecht erhalten werden kann, werden über das ganze demyelinisierte Axon Natriumkanäle in die Zellmembran eingebaut¹¹⁸. Während der Reizweiterleitung strömt Natrium (Na^+) in das Zytoplasma. Zur Repolarisation benötigen die demyelinisierten Axone ATP-abhängige Natrium/Kalium (Na^+/K^+)-ATPasen, um dem Ioneneinstrom entgegenzuwirken, wodurch der Energiebedarf steigt². Infolgedessen steigt der Mitochondriengehalt in den demyelinisierten Axonen¹¹⁹. Mediatoren von Entzündungszellen interferieren mit den Mitochondrien und können so die Energieproduktion reduzieren¹¹⁴⁻¹¹⁶. Dass es einen Zusammenhang zwischen der Entzündungsreaktion und der axonalen Degeneration gibt, konnte in diversen Studien gezeigt werden^{73,86,92,113}. Wie bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben, sezernieren die in den entzündlichen Läsionen vorkommenden Immunzellen proinflammatorische Zytokine, Glutamat, ROS und NO, wodurch ein neurotoxisches Milieu entsteht, das Axone schädigen kann². Bei der inflammatorisch bedingten axonalen Degeneration spielt das von Mikrogliazellen/Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen sezernierte NO eine wichtige Rolle^{2,114-116,120}. NO interferiert mit dem mitochondrialen Metabolismus^{120,121}: Es bewirkt einerseits eine Hemmung der Atmungskette¹²¹ und kann andererseits zu einer Blockade der Erregungsweiterleitung führen^{114,115,120}. Durch die NO-induzierte Hemmung der Atmungskette kann es aufgrund des fehlenden ATPs zur Inaktivierung von axonalen zellmembranansässigen Na^+/K^+ -ATPasen

kommen². Die Folge des Ungleichgewichts im Energiemetabolismus und des daraus resultierenden Energiedefizits ist, dass das während der Erregungsleitung eingeströmte Na^+ nicht mehr durch extrazelluläres K^+ ausgetauscht werden kann, wodurch die Repolarisation und in Folge die Erregungsweiterleitung erschwert werden². Die intrazelluläre Akkumulation von Na^+ aktiviert den Austausch von intrazellulärem Na^+ gegen extrazelluläres Kalzium (Ca^{2+}) über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher^{2,117}. Das intrazellulär akkumulierte Ca^{2+} trägt maßgeblich zur axonalen Schädigung bei, indem es einen „Teufelskreis“ auslöst^{2,16}. Es aktiviert beispielsweise degenerative Enzyme, hemmt mitochondriale Funktionen und schädigt den axonalen Transport¹⁶. Eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration kann auch durch andere Mechanismen wie beispielweise die Aktivierung des Glutamat-Rezeptor-6 (GluR6) erfolgen¹²². Des Weiteren konnten Ouardouz et al. zeigen, dass es durch die Stimulation von GluR6 zu einer erhöhten NO-Produktion kommt¹²². NO wiederum erhöht die intrazelluläre Kaliumkonzentration und führt zur axonalen Degeneration.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die axonale Schädigung während des Krankheitsverlaufs verschiedene Ursachen haben kann. Die zugrunde liegenden pathogenen Mechanismen können u. a. auf ein Wechselspiel zwischen der Demyelinisierung und der Entzündungsreaktionen mit Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren sowie der mitochondrialen Veränderung zurückgeführt werden.

1.4 Mechanische Veränderungen bei MS

Der Begriff „Sklerose“ (griechisch: σκληρός = *hart*) beschreibt in der Medizin eine krankhafte Verhärtung des Gewebes. Der Neuropathologe Jean-Martin Charcot konnte im 19. Jahrhundert eine Verbindung zwischen den klinischen Symptomen und der „disseminierten Sklerose in Plaques“ im Nervensystem feststellen und beschrieb MS erstmalig als eigenständige Krankheit¹²³. Bei der MS handelt es sich also, wörtlich betrachtet, um eine Erkrankung, die durch diverse verhärtete Läsionen im ZNS gekennzeichnet ist. Diese konnten durch Palpationen, die an Leichen durchgeführt wurden, festgestellt werden¹²³. Durch die Einführung der

bildgebenden Magnetresonanztomografie konnten enorme Fortschritte in der MS-Forschung gemacht werden ¹²⁴. Die daraus entwickelte Magnetresonanzelastrografie (MRE)-Forschung ermöglichte die Erforschung biomechanischer Eigenschaften neuronaler Strukturen *in vivo* ^{125,126}. Die in der MRE aufgezeichnete Viskoelastizität beschreibt die Rückstellkraft des Gewebes auf Deformation ¹²⁶. Durch die Einführung dieser Größe konnten die durch Palpation subjektiv gewonnenen Informationen in ein quantifizierbares objektives Maß übertragen werden ¹²⁶. Diverse Studien konnten durch die Verwendung der MRT zeigen, dass das Krankheitsbild der MS nicht wie in den histopathologischen Untersuchungen mit einer Versteifung des ZNS einhergeht, sondern dass es vielmehr zu einer Reduktion der Steifheit kommt ¹²⁵⁻¹²⁸. Sowohl Wuerfel et al. als auch Streitberger et al. konnten an MS-Patienten eine Reduktion der Viskoelastizität um 13–20,5 % feststellen ^{125,128}. Fehlner et al. konnten sogar bei CIS-Patienten eine Reduktion der Gewebesteifheit feststellen ¹²⁹.

Auch in verschiedenen Tiermodellen der MS konnte eine Reduktion der Steifheit nachgewiesen werden ^{126,127}. Nicht nur die MS, sondern auch andere neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson zeigen eine Reduktion der Steifheit in neuronalen Strukturen des Gehirns ^{130,131}. In einer Studie von Sack et al. konnte sogar die Erweichung des Nervengewebes während des physiologischen Alterungsprozesses nachgewiesen werden ¹³². Die Ursachen für die Erweichung des Nervengewebes sind noch nicht vollständig geklärt. In der Fachliteratur wird als mögliche Ursache eine Reduktion der neuronalen Zellzahl diskutiert ¹³³. Klein et al. konnten in einer *in vivo*-Studie darstellen, dass durch adulte Neurogenese die Gewebesteifheit erhöht werden kann ¹³³. Die aus der Studie gewonnenen Ergebnisse bekräftigen die Theorie, dass die Steifheit mit der Zellzahl zusammenhängen kann. Auch Freimann et al. konnten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Steifheit des Gehirngewebes und der Reduktion der neuronalen Dichte nach Verschluss der mittleren Hirnarterie feststellen ¹³⁴.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion der Zellzahl zwar bei den oben genannten Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen könnte, bei MS jedoch

müssen noch weitere Ursachen diskutiert werden, denn in verschiedenen Studien konnten die biomechanischen Veränderungen der MS nicht auf eine Reduktion der Zellzahl zurückgeführt werden ^{126,127,135}. Vielmehr konnte anhand von Tiermodellstudien gezeigt werden, dass biomechanische Veränderungen des ZNS auch mit MS-typischen histologischen Veränderungen wie Demyelinisierung oder Immuneinfiltration einhergehen ^{126,127,135}.

Schregel et al. konnten signifikante biomechanische Veränderungen bei toxisch induzierter Demyelinisierung durch eine Cuprizin-Diät feststellen ¹²⁶. Sowohl Demyelinisierung als auch Veränderungen in der extrazellulären Matrix führten zu einer Reduktion der Steifheit ¹²⁶. Riek et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der bei der MS auftretenden Entzündungsreaktion des ZNS und der Steifheit feststellen ¹²⁷. Im schubförmig remittierenden EAE-Modell konnte während der akuten Inflammation eine Reduktion sowohl der Viskosität als auch der Elastizität nachgewiesen werden ¹²⁷. Auch Millward et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Makrophageninfiltration und der Veränderung der mechanischen Eigenschaften im Kleinhirn feststellen ¹³⁵. Das Ergebnis unterstützt die Theorie, dass die mechanischen Eigenschaften durch eine Entzündungsreaktion des ZNS beeinflusst werden könnten. Trotz aller Bemühungen bleibt die genaue Ursache der biomechanischen Veränderungen des ZNS bis heute noch ungeklärt. Obwohl sich diese Studien nur auf das Gehirn oder eine bestimmte Interessensregion des Gehirns konzentrieren und deshalb die Validität für Veränderungen in spezifisch lokalisierten Strukturen des ZNS reduziert ist, kann eine klare Beziehung zwischen den mechanischen Eigenschaften und den strukturellen Veränderungen im Krankheitsbild der MS festgestellt werden.

Dass strukturelle, gewebespezifische Unterschiede einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften haben könnten, bekräftigen auch diverse Studien, die sich mit den unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der weißen und grauen Substanz beschäftigen ¹³⁶⁻¹³⁹. Während Koser et al. und Christ et al. eine Erhöhung der Steifheitswerte in der grauen Substanz feststellten ^{136,137}, konnten Kruse et al. eine Reduktion der Steifheit in der grauen Substanz verglichen mit

der weißen Substanz feststellen¹³⁹. Ozawa et al. konnten keine substanzspezifischen Unterschiede nachweisen¹³⁸.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Veränderung der mechanischen Eigenschaften bei MS mit hoher Wahrscheinlichkeit durch zelluläre Veränderungen erklärt werden könnten. Die genauen Mechanismen sind bis heute jedoch nicht vollständig geklärt. Auch die kontroversen Ergebnisse bezüglich regionaler Unterschiede lassen auf unterschiedliche neuronale Zelleigenschaften der weißen und grauen Substanz schließen¹⁴⁰. Es bedarf jedoch noch weiterer Studien, um die genaue Beziehung zwischen den histologischen Veränderungen und den mechanischen Eigenschaften bei einer MS-Erkrankung zu klären.

Die Mechanosensitivität von ZNS-Zellen könnte möglicherweise die mechanischen Gewebeveränderungen erklären. Wäre dies der Fall, würde die Mechanosensitivität von ZNS-Zellen aktiv zum Krankheitsgeschehen beitragen, indem sie die mechanischen Eigenschaften moduliert. Ferner könnte das Erkennen von veränderten mechanischen Gewbeeigenschaften durch klinisch anwendbare bildgebende Verfahren einen neuen diagnostischen Ansatz für das Erkennen der MS darstellen.

1.5 Zelluläre Reaktionen auf mechanische Veränderungen im ZNS

Das ZNS zählt zu den weichsten Geweben des Körpers und wird von außen durch ein Exoskelett, bestehend aus Schädel oder Wirbelsäule, und im Inneren durch andere steife Materialien wie die Sklera, *Pia mater* oder *Dura mater* vor mechanischen Reizen geschützt und von der Umgebung isoliert^{140,141}. Bei neurodegenerativen Erkrankungen kommt es, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, zu Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Gewebes. Die mechanischen Veränderungen der neuronalen Strukturen sind nicht, wie etwa bei einem mechanischen Trauma, auf eine Degeneration des Exoskeletts zurückzuführen, sondern man nimmt an, dass die Ursache vielmehr in einer Veränderung der Gewebemorphologie neuronaler Strukturen innerhalb des Stützgewebes liegt¹⁴⁰. Nach Franze et al. könnten diese Veränderungen auf zellulärer oder subzellulärer Ebene der betroffenen Gewebe auftreten¹⁴⁰.

Zellen kommunizieren mit ihrer Umgebung und können so adäquat auf Reize ihres Umfelds reagieren. Es wird davon ausgegangen, dass der Großteil der Zellen des Nervensystems rein über biochemische Signale kommuniziert und so den Reiz zum Ausüben der Zellfunktion auslöst¹⁴². Diese Annahme wurde in den letzten Jahren kritisch hinterfragt, und wissenschaftliche Studien belegen, dass nicht nur chemische Signale eine wichtige Rolle in der Zellfunktion spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Zellfunktionen, Morphologie und die Proteinexpression von mechanischen Eigenschaften der Umgebung beeinflusst werden können – also, dass Zellen mechanosensitiv sind^{140,141,143}.

Mechanosensitivität beschreibt also die Fähigkeit von Zellen, auf mechanische Einflüsse ihrer Umgebung zu reagieren. Sensorische Neurone, die beispielsweise das Hören, das Gleichgewicht sowie Berührung und Propriozeption steuern, reagieren auf mechanische Signale und sind somit mechanosensitiv¹⁴². Diverse Studien konnten zeigen, dass sowohl Neurone als auch Gliazellen mechanosensitive Eigenschaften aufweisen¹⁴⁴⁻¹⁵³. Es kann also angenommen werden, dass neben biochemischen Signalen auch mechanische Signale im ZNS eine wichtige Rolle spielen und die Zellfunktion beeinflussen können¹⁴⁴⁻¹⁵³.

Im Krankheitsbild der MS kommt es wie oben beschrieben zu Veränderungen der mechanischen Eigenschaften. Es könnte daher möglich sein, dass zelluläre Reaktionen auch durch mechanische Veränderungen des Gewebes gesteuert werden und so maßgeblich zur MS-Pathophysiologie beitragen könnten. Die MS ist durch eine Entzündungsreaktion des ZNS charakterisiert. Das ZNS reagiert durch die Aktivierung von Mikrogliazellen auf die Entzündungsreaktion. Die aktivierten Mikrogliazellen wandern zur Läsion. Damit die Mikrogliazellen zur Entzündungsläsion migrieren können, müssen die Mikrogliazellen Kräfte auf ihre Umwelt ausüben¹⁴⁹. Gleichzeitig untersuchen sie die mechanischen Eigenschaften des Gewebes¹⁴⁰ und passen ihre Morphologie sowie ihr Zytoskelett an die Steifheit ihrer Umgebung an^{146,149}. Moshayedi et al. konnten zudem darstellen, dass auf steiferem Gewebe Mikrogliazellen die Entzündungsreaktion fördern, indem sie Gene, die Entzündungsmediatoren exprimieren, hochregulieren¹⁴⁶. Neben den Mikrogliazellen tragen auch

Astrozyten zur Immunantwort bei. Analog zu den Mikrogliazellen können auch Astrozyten die Entzündungsreaktion fördern, indem sie ebenfalls Entzündungsmediatoren hochregulieren ¹⁴⁶. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich das Astrozytenverhalten mit zunehmender Substratsteifigkeit verändert ^{145,151}, beispielsweise ändern Astrozyten in mechanisch verändertem ZNS-Gewebe ihre Morphologie ^{145,151}. Weitere Studien lassen zudem vermuten, dass die Anzahl der Astrozyten mit zunehmender Substratsteifigkeit zunimmt ^{145,147,154}.

Die durch reaktive Astrozyten gebildete Glianarbe könnte die neuronale Regeneration beeinflussen. So könnte die Glianarbe zum einen eine mechanische Barriere für neuronale Zellprozesse darstellen ¹⁵⁵ und zum anderen wachsen die Neuronen bevorzugt auf weicherem Gewebe und meiden so möglicherweise die vermeintlich steifere Glianarbe ^{145,147}.

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben, kommt es im Krankheitsverlauf der MS infolge der Entzündungsreaktion zur Schädigung der Markscheide von Axonen und infolgedessen zur Bildung von fokalen demyelinisierten Arealen. Der akuten Phase folgt anfänglich eine Regenerationsphase. In dieser Phase versucht der Körper, die demyelinisierten Axone wieder zu remyelinisieren und so ihre Funktion wiederherzustellen. Der Remyelinisierungsprozess der Axone versagt allerdings häufig in der MS. Die ursprüngliche und die neugebildete Myelinscheide werden von Oligodendrozyten gebildet. Diese differenzieren sich aus Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (engl. *oligodendrocyte progenitor cells*, OPC). Sowohl der Entwicklungsprozess der Myelinisierung als auch der regenerative Prozess der axonalen Remyelinisierung benötigen also anfänglich die Proliferation und Migration von OPC ¹⁴⁴. Ebenso wie Neuronen sind auch OPC mechanosensitiv ^{144,150,152}. OPC passen ihr Überleben, ihre Differenzierung und ihre Proliferation an die Steifheit ihres Substrats an ¹⁴⁴. Die MS-bedingten veränderten mechanischen Gewebeeigenschaften könnten eine suboptimale mechanische Umgebung für OPC darstellen ¹⁴⁴. Infolgedessen könnten einige OPC-Funktionen gehemmt werden und die suboptimale Umgebung könnte direkt zu ineffizienter OPC-Differenzierung und Remyelinisierung beitragen ¹⁴⁴. Jagielska et al. konnten zeigen, dass sich OPC auf steiferem Gewebe besser

differenzieren als auf weicherem ¹⁴⁴. Nach Schregel et al. kommt es jedoch während der Demyelinisierung zur Reduktion der Steifheit ¹²⁶. Es könnte also möglich sein, dass die Remyelinisierung aufgrund der schlechteren Differenzierung auf nachgiebigerem Gewebe scheitert.

Auf Grund der oben genannten Aspekte scheint es daher möglich, dass im Krankheitsverlauf der MS manche ZNS-ansässigen Zellen auf die auftretenden mechanischen Veränderungen im erkrankten ZNS-Gewebe reagieren könnten. Infolgedessen könnten die Zellen veränderte Signale erhalten und so ihre Zellfunktion verändern. Es scheint daher möglich, dass die Mechanosensitivität ZNS-ansässiger Zellen zur Krankheitsprogression der MS beitragen könnte ¹⁴⁰.

1.6 Ziel der Arbeit

MS ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS. Obwohl die klassischen histopathologischen Kennzeichen wie Immunzellinfiltration, Demyelinisierung, Astrogliose und axonale Schädigung bekannt sind, ist die genaue Ursache und Pathophysiologie noch weitgehend unbekannt. Tiermodellstudien zeigten, dass biomechanische Veränderungen des ZNS auch mit MS-typischen histologischen Veränderungen wie Demyelinisierung oder Immunzellinfiltration einhergehen^{126,127,135}. Auch stellten diverse Studien fest, dass strukturelle, gewebespezifische Unterschiede einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften haben könnten¹³⁶⁻¹³⁹. Der genaue Zusammenhang zwischen den mechanischen Eigenschaften des Gewebes und den zugrunde liegenden histologischen Veränderungen ist derzeit jedoch noch wenig untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand des schubförmig verlaufenden EAE-Modells herauszufinden, ob es generell und speziell in den unterschiedlichen Krankheitsstadien der EAE Korrelationen zwischen den mechanischen und den strukturellen Veränderungen des Gewebes gibt. Ferner ist ein weiterer Hauptschwerpunkt, den Zusammenhang der histologischen Parameter untereinander aufzuzeigen und die histologischen Veränderungen mit der Schwere der EAE zu vergleichen.

2 Material und Methoden

Die Vorarbeiten zu dieser Arbeit, welche in den folgenden Kapiteln 2.1–2.3 beschrieben werden, wurden im Rahmen der Dissertation von Dr. med. David E. Koser zum Thema „Biomechanical Control of the Developing and Diseased Central Nervous System“¹⁵⁶ vorgenommen. Die Bildaufnahme mittels des Konfokalmikroskops wurden von Dr. med. David Koser und Giovanna Pommerschein durchgeführt.

2.1 Mäuse und Induktion der EAE

2.1.1 Mäuse

Die Tierexperimente wurden gemäß den Vorschriften des Innenministeriums des Vereinigten Königreichs und der Tierforschungsverordnung von 1986 mit der Versuchsnummer: PPL No.: 80/2228 durchgeführt. Dazu wurden 24, 4–7 Wochen alte, weibliche SJL/J-Mäuse unter konventionellem Keimstatus in einem Tierlabor der Universität Cambridge gehalten. In einem Käfig befanden sich jeweils 2–3 Mäuse. Während der gesamten Versuchsreihe hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Leitungswasser und wurden in einem künstlich erzeugten 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Die Mäuse wurden über Janvier Labs (Saint Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen. Anfangs wurden die Mäuse in sechs Gruppen für die Induktion der EAE eingeteilt: akute EAE (8 Mäuse), EAE in Remission (5 Mäuse) und erneute Schubphase (3 Mäuse). Zu jeder Gruppe gab es gleichaltrige und gleichgeschlechtliche Kontrollen (zwei, drei und drei Mäuse). Die an EAE erkrankten Mäuse wurden von den Kontrollmäusen getrennt gehalten.

2.1.2 EAE-Induktion

Die Immunisierung erfolgte im Alter von 9–11 Wochen, nachdem die Mäuse mindestens 3 Wochen in der neuen Umgebung gehalten worden waren (siehe Tabelle 1). Dazu wurde den Mäusen 150 µg PLP Peptid_{139–151} (PLP_{139–151}; GenScript, Piscataway, NJ, USA), das in CFA gelöst wurde, subkutan in die Flanken (gesamtes Injektionsvolumen: 200 µL) appliziert. Das inkomplette

Freunds Adjuvans (engl. *incomplete Freund's adjuvans*, IFA) wurde in einem 9:1 Verhältnis von Paraffinöl (EMScience, Gibbstown, NJ, USA) zu Mannid-Monooleat (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) vorbereitet. Die Herstellung des CFA erfolgte durch die Zugabe von 5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) in IFA. Den gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Kontrollmäusen wurden 200 µL Phosphatpuffer-Lösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS)/CFA subkutan beidseitig in die Flanken appliziert. Die Evaluation des klinischen EAE-Scores wurde täglich durchgeführt^{61,157}: 0 – keine Symptome, 0,5 – Schwanzspitze ist erschlafft, 1 – erschlaffter Schwanz, 1,5 – erschlaffter Schwanz und abgeschwächter Aufrichtungsreflex, 2 – erschlaffter Schwanz und geschwächte Hinterläufe, 2,5 – erschlaffter Schwanz und Beginn einer Lähmung der Hinterläufe, 3 – erschlaffter Schwanz und komplette Lähmung der Hinterläufe, 3,5 – neben dem erschlafften Schwanz und der kompletten Lähmung der Hinterläufe ist die Maus nicht mehr in der Lage, sich vom Liegen aufzurichten, 4 – Quadriplegie, allerdings kann sich die Maus noch minimal bewegen und erscheint noch wach, 4,5 – Quadriplegie, die Maus bewegt sich nicht mehr und ist nicht mehr wach, 5 – Tod durch EAE oder eingeschläfert aufgrund der Folgen der schweren Lähmung.

Gruppen	Alter bei Ankunft (Wochen)	Alter der EAE Immunsierung (Wochen)	Zeitpunkt der Untersuchung (Wochen)
Akute Phase EAE	6	9	11
Akute Phase EAE	6	9	11
Akute Phase EAE	6	9	12
Akute Phase EAE	4	9	11
Akute Phase EAE	4	9	11
Akute Phase EAE	4	9	11
Akute Phase EAE	4	9	11
Akute Phase EAE	4	9	12
Kontrolle akute EAE	7	10	11
Kontrolle akute EAE	5	9	11
Remissionsphase EAE	6	11	14
Remissionsphase EAE	6	11	14
Remissionsphase EAE	6	11	15
Remissionsphase EAE	4	11	14
Remissionsphase EAE	4	11	15
Kontrolle Remissionsphase	5	11	14
Kontrolle Remissionsphase	5	11	15
Kontrolle Remissionsphase	5	11	15
Schubphase EAE	7	10	18
Schubphase EAE	7	10	18
Schubphase EAE	7	10	19
Kontrolle Schubphase	7	10	18

Kontrolle Schubphase	7	10	19
Kontrolle Schubphase	7	10	19

Tabelle 1 Einteilung der Versuchstiere. Es wurden insgesamt 24 Tiere für die Versuche verwendet. Davon gehörten 8 Tiere und 2 Kontrolltiere der akuten Gruppe an. In der Remissionsphase waren 8 Tiere, davon 5 kranke Tiere und 3 Kontrolltiere. 6 Mäuse, davon 3 gesunde und 3 erkrankte Tiere, bildeten die Schubgruppe. Die erste Spalte zeigt das Alter der Tiere bei Ankunft. Im Alter von 9–11 Wochen wurden die Tiere PLP₁₃₉₋₁₅₁ immunisiert und so das Krankheitsbild der EAE ausgelöst. Dieses wird in der mittleren Spalte dargestellt. In der rechten Spalte wird das Alter zum Todeszeitpunkt gelistet. Die Tiere wurden je nach Krankheitsphase zwischen 11 und 19 Wochen alt.

2.1.3 Tierversorgung während der EAE

Der Zugang zum Futter wurde den Tieren abhängig von ihrem aktuellen EAE-Status erleichtert. Dies geschah durch in Wasser getränktes Futtergranulat mit anschließender Platzierung auf den aus Holzspänen bestehenden Boden des Käfigs. Zweimal täglich wurde den Tieren zusätzlich eine mit Wasser gefüllte Spritze angeboten.

2.2 Akute Schnittpräparation

2.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders deklariert, von der Firma Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, Vereinigtes Königreich) bezogen. Die Lösung der künstlichen Cerebrospinalflüssigkeiten (CSF) wurde für jedes Experiment am selben Tag frisch hergestellt, gemäß des Protokolls von Mitra und Brownstone¹⁵⁸. Die zum Schneiden benutzte Liquorersatzlösung (s-aCSF) bestand aus: 191 mM Saccharose, 0,75 M K-Gluconat, 1,25 mM KH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 4 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM Glukose, 2 mM Kynurensäure, 1 mM (+) Natrium-L-Ascorbat, 5 mM Ethylpyruvat, 3 mM myo-Inosit und 2 mM NaOH. Für die Messung wurde ebenso eine Liquorersatzlösung (m-aCSF) aus 121 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 1,1 mM MgCl₂, 15 mM Glucose, 1 mM (+) Natrium-L-Ascorbat, 5 mM Ethylpyruvat und 5 mM myo-Inosit verwendet. Die Lösungen wurden mit 95 %

Sauerstoff (O₂)/ 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) begast. Der sich daraus ergebende pH-Wert betrug ca. 7,3.

2.2.2 Präparation

Der aktuelle EAE-Status, das Alter sowie die Gruppenzugehörigkeit zur Akut-, Remissions-, Schubphase und den jeweiligen Kontrollgruppen bestimmten den Todeszeitpunkt der 24 weiblichen SJL/J-Wildtypmäuse. Die Tiere wurden durch einen Genickbruch getötet. Zwischen Todeszeitpunkt und der Präparation lag eine Zeitspanne von ~5 Minuten.

Die anschließende Präparation erfolgte auf einem eisgekühlten, mit Aluminiumfolie umwickelten Styroporkissen, auf welchem die Mäuse fixiert wurden. Zur Darstellung der ventralen Wirbelsäule wurden die Mäuse zuerst ausgenommen, das Abdomen gewaschen und anschließend mit eiskalter s-aCSF befüllt. Die Flüssigkeit wurde alle zwei Minuten ersetzt. Zwischen dem Genickbruch und dem Erstkontakt mit dem s-aCSF-Liquor verging eine Zeitspanne von ~8 Minuten. Zur Darstellung des Rückenmarks wurden die ventrale und dorsale Nervenwurzel und Teile der Meningen kraniokaudal aufgeschnitten. Gleichzeitig wurde das Rückenmark kranial der exponierten Region vorsichtig angehoben und in eine mit s-aCSF gefüllte Petrischale gelegt. Auch hier wurde die Flüssigkeit alle zwei Minuten gewechselt. Im Anschluss wurden sowohl die *Dura mater* als auch die verbliebenen Reste der ventralen und dorsalen Rückenmarkswurzeln vorsichtig unter einem Stereomikroskop entfernt. Vierprozentige, niedrig schmelzende Agarose wurde bei einer Temperatur von 37 °C in 0,1 M PBS gelöst und in einen aus Aluminiumfolie bestehenden Würfel (2 x 2 x 2 cm) gefüllt. Dieser wurde zunächst nur bis zur Hälfte befüllt. Anschließend wurde die lumbale Ausdehnung des Rückenmarks innerhalb des halbgefüllten Würfels platziert und anschließend erneut mit 4 %iger niedrigschmelzender Agarose aufgefüllt. Zur Aushärtung der Agarose wurde der Würfel im Anschluss auf Eis platziert. Die hier beschriebene Methode wurde wie bei Koser et al. durchgeführt ¹⁵⁶.

2.2.3 Schnittpräparation

Zur Untersuchung der transversalen Rückenmarksschnitte wurde der das Rückenmark enthaltende Agaroseblock auf eine Vibratomplatte (VT1000 S, Leica Microsystems Ltd, Milton Keynes, Vereinigtes Königreich) geklebt. Die Platte wurde in eisgekühlten, durch 95 % O₂/ 5 % CO₂ aufgesprudelter s-aCSF getaucht. Die Einstellungen des Vibratoms waren wie folgt definiert: Amplitude 1 mm, Frequenz 100 Hz und Geschwindigkeit ~40 µm/s. Aus der lumbalen Region des Rückenmarks wurden 8 Schnitte (500 µm) entnommen. Die geraden Schnitte wurden in einem konstant begasten m-SCF-Container gelagert. Die vier ungeraden Schnitte wurden direkt für vier Stunden in 4 % Paraformalaldehyd (PFA) fixiert und später für die immunhistologischen Färbungen genutzt. Ein bis zwei Schnitte wurden für die Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM) genutzt und der korrespondierende fixierte Schnitt für die Immunhistochemie. Für die AFM-Messung wurden die Schnitte in eine mit Cell-Tak (BD Cell-Tak Zell und Gewebs Adhesive, BD Biosciences, Oxford, Vereinigtes Königreich) bedeckte Petrischale gelegt und mit m-aCSF bedeckt. Der Liquor wurde ständig durch ein speziell gebautes Strömungssystem mit einer Flussrate von ~30 ml/min ausgetauscht, um eine stabile pH- und Nährstoffversorgung zu garantieren. Vor der AFM-Messung wurde der Schnitt für mindestens 15 Minuten in m-aCSF belassen, um eine Regeneration zu ermöglichen. Der zweite Schnitt wurde nur dann genutzt und zur Messung herangezogen, wenn beide Messungen nicht innerhalb von acht Stunden nach dem Todeszeitpunkt durchgeführt werden konnten.

2.3 Rasterkraftmikroskop

2.3.1 Einstellungen und Messungen

Die AFM-Messungen wurden von Koser et al. ¹⁵⁶ wie im Folgenden beschrieben durchgeführt und mir für meine Dissertation freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Messungen wurden mit einem JPK Nanowizard Cellhesion 200 AFM (JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Einstellungen wurden an einem inversen optischen Mikroskop (Axio Observer.A1, Carl Zeiss Ltd.,

Vereinigtes Königreich) vorgenommen. Für die Messungen wurden dem Cantilever Polystyrol-Kugeln mit einem Durchmesser von $d = 37,38 \pm 0,34 \mu\text{m}$ (microParticles GmbH, Berlin, Deutschland) an die Spitze geklebt. Diese fungierten als Messsonden. Als Federkonstanten des spitzenlosen Silikon-Cantilevers (Arrow-TL1, NanoWorld, Neuchatel, Schweiz) wurden 0,01 und 0,02 N/m über die „Thermal Noise-Methode“ bestimmt¹⁵⁹. Die zu untersuchenden Proben wurden in das AFM-Setup eingebracht. Im Anschluss wurden Bilder mithilfe einer CCD-Kamera (The Imaging Source, Bremen, Deutschland) aufgenommen. Für die AFM-Messung wurde eine rechteckige Region, welche die komplette ventrale Hälfte des Rückenmarks im jeweiligen Schichtbild beinhaltet, ausgewählt. Um die gemessenen Regionen zu identifizieren, wurden zusätzlich weitere Bilder der rechten oberen und der linken unteren Ecke aufgezeichnet. Kraft-Distanz-Kurven wurden durch ein speziell geschriebenes Skript automatisch alle $50 \mu\text{m}$ mittels eines Rasterscans aufgenommen. Die Maximalkraft betrug 7 nN und die Annäherungsgeschwindigkeit $10 \mu\text{m/s}$. Die aufgezeichneten Kraft-Distanz-Kurven wurden für die gesamte Eindringtiefe bei einer Kraft von $F = 7 \text{ nN}$ analysiert. Hierzu wurden die Daten mit dem Hertz-Modell verglichen, um das Elastizitätsmodul K zu bestimmen. K stellt einen Parameter der Gewebesteifheit dar. Alle Steifheitswerte wurden für einen einzelnen Rückenmarksschnitt zusammengesetzt, wodurch eine Elastizitätskarte entstand.

2.4 Histologie

2.4.1 Vorbehandlung

Das in England fixierte Rückenmark wurde in Würzburg erneut in Paraffin eingebettet (Leica TP1020, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) und bis zur Analyse bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.4.2 Paraffin-Schnitte

Für die immunhistologische Färbung wurde das in Paraffin eingebettete Rückenmark mit einem Mikrotom (Leica SM 2010 R oder Leica SM 2003, Leica Biosystems, Deutschland) geschnitten. Die $5 \mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden

anschließend auf Objektträger (SuperFrost™ Plus microscope slides, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Es wurden mindestens 13 Objektträger mit jeweils 2–3 Schnitten pro Objektträger benutzt. Falls nach dem 13. Objektträger noch Schnitte übrig waren, wurden diese anschließend in Serie mit jeweils 3 Schnitten pro Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.3 Immunhistologische Färbung des Rückenmarks

Das in Paraffin eingebettete Rückenmark wurde immunhistologisch auf MBP, GFAP, das von Mikrogliazellen/Makrophagen exprimierte ionisierende Kalzium-bindende Adapter-Molekül 1 (engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*-Protein, Iba1) sowie auf den oberflächlichen T-Zellmarker (CD3⁺) untersucht.

Bei jeder immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte vom Paraffin durch zweimal 10 Minuten Xylol befreit und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100 %, 96 %, 80 %, 75 % und destilliertem Wasser, jeweils für 5 Minuten) entwässert. Im Anschluss wurden die Schnitte sauer demaskiert. Für die Demaskierung gab es zwei Möglichkeiten: die „Mikrowellen-Methode“ und die „Ofen-Methode“.

Bei der Mikrowellen-Methode wurden die in 0,1 M Citratpuffer (18 ml 0,1 M Citronensäure (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 82 ml 0,1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (AppliChem, Deutschland), 900 ml destilliertes Wasser, (pH 6,0)) eingelegten Schnitte siebenmal 10 Sekunden im Abstand von 50 Sekunden in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht. Vor der Weiterbehandlung wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt.

Genau wie bei der Mikrowellen-Methode wurden die entparaffinierten Schnitte bei der Ofen-Methode mit Citratpuffer bedeckt. Im Gegensatz zur Mikrowellenmethode wurden die Schnitte nur einmal zum Sieden gebracht und anschließend für 30 Minuten bei 95 °C in einen Ofen gestellt. Danach kühlten sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur ab.

Nach der Demaskierung wurde der die Schnitte enthaltende Citratpuffer 5 Minuten lang unter fließendem, destilliertem Wasser ausgewaschen und so

ausgetauscht. Anschließend wurden die Schnitte in 0,1 M PBS (PBS, 40,03 g NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 8,6 g $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Roth, Deutschland), 1,0 g KCL (AppliCem, Deutschland), 1,35 g KH_2PO_4 (AppliCem, Deutschland), pH 7,4) gewaschen.

2.4.4 Immunhistologie für MBP

Zur Darstellung der Myelinscheiden wurde das Rückenmark auf das Vorliegen von MBP getestet.

Die Entparaffinierung und die Entwässerung erfolgten nach dem oben beschriebenen Prinzip. Die saure Demaskierung wurde nach der Mikrowellen-Methode durchgeführt. Um den Hintergrund des Zweitantikörpers zu reduzieren, wurde der murine Primärantikörper (mSMI-99, Covance, NJ, USA) in Kombination mit dem Vector® M.O.M™ Immunodetection Kit (M.O.MKit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verwendet. Sowohl der murine MBP-Antikörper, M.O.M-Blocking Diluent als auch M.O.M Diluent wurden nach Herstellerangaben benutzt. Diese Schnitte wurden für eine Stunde mit jeweils 30 µl M.O.M-Blocking-Reagenz inkubiert und im Anschluss gewaschen. Die gewaschenen Schnitte wurden für 5 Minuten mit M.O.M-Diluent behandelt. Als Primärantikörper wurde SMI-99 (1:500 in M.O.M-Diluent), ein monoklonaler Antikörper gegen das MBP, verwendet. Die Schnitte wurden für 30 Minuten mit dem Primärantikörper inkubiert mit anschließendem Waschschrift. Im nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper (biotinylierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege 1:250 in M.O.M Diluent, Vector Laboratories, USA) inkubiert. Dann wurden die Schnitte gewaschen und für 30 Minuten mit NeutrAvidin-DyLight 550 (Thermo Scientific, Deutschland; 1:400 in PBS) bedeckt. Vor und nach der zehn-minütigen Behandlung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1:5000 in PBS) wurden die Schnitte gewaschen. Die Schnitte wurden mit n-Propylgallat (NPG, Fluka 48710, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) bedeckt. Bis zur Analyse wurden sie bei 4 °C gelagert. Alle Waschschriffe wurden für zweimal 2 Minuten in PBS (pH 7,4) durchgeführt, sofern nicht anders beschrieben.

2.4.5 Immunhistologie für GFAP und Iba1

Die immunhistologische Darstellung von Astrozyten durch Färbung von GFAP, welches von Astrozyten stark exprimiert wird, erfolgte durch einen monoklonalen anti-GFAP Antikörper (1:3000 in PBS, G3893, Sigma-Aldrich, Deutschland). Das Vorhandensein von Mikrogliazellen und Makrophagen wurde mithilfe eines polyklonalen anti-Iba1 Primärantikörpers (Wako #019-19741, Wako GmbH, Neuss, Deutschland) nachgewiesen. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:400 in 1 % normalem Ziegenserum (engl. *normal goat serum* (NGS), Sigma-Aldrich, Deutschland) und 0,2 % Bovin-Serum-Albumin (BSA) in PBS gelöst. Beide Färbungen erfolgten bis auf die Demaskierung nach dem gleichen Protokoll. Bei der Iba1-Färbung wurde nach dem Protokoll der Ofen-Methode vorgegangen. Die Demaskierung für die GFAP-Antikörper-Färbung erfolgte nach dem Prinzip der Mikrowellen-Methode. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Schnitte mit 5 % NGS (Sigma-Aldrich, Deutschland) in PBS geblockt. Auf jeden Schnitt wurden jeweils 30 µl des gelösten Primärantikörpers pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht (12–16 Stunden). Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte gewaschen und für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper behandelt. Als sekundärer Antikörper für GFAP wurde ein anti-Maus-Antikörper aus der Ziege Cy5 (Dianova, Hamburg, Deutschland; 1:400 in PBS) benutzt. Der Sekundärantikörper für Iba1 war ein anti-Hase-Antikörper aus der Ziege Cy5 (Dianova, Deutschland; 1:400 in PBS). Vor der anschließenden DAPI-Inkubation wurden die Schnitte gewaschen. Bevor die Schnitte mit n-Propylgallat oder Mowiol (Sigma-Aldrich, Deutschland) eingedeckt wurden, wurden sie ein letztes Mal gewaschen. Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Waschschriffe wurden für dreimal 5 Minuten in PBS (pH 7,4) durchgeführt.

2.4.6 Immunhistologie Färbung für CD3⁺

Die immunhistologische Untersuchung von T-Zellen erfolgte mithilfe des CD3⁺-Antikörpers (Kaninchen anti-Maus CD3 Antikörper; Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich). Sowohl die Entparaffinierung als auch die Entwässerung erfolgten nach dem oben beschriebenen Prinzip. Zur Demaskierung wurde die

Mikrowellen-Methode verwendet, alle Schnitte wurden mit 5 % NGS/PBS geblockt. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:500 in PBS (pH 7,4) gelöst und auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht (12–16 Stunden). Am Folgetag wurden die Schnitte gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper Anti-Hase aus der Ziege Cy5 (Dianova, Deutschland; 1:400 in PBS) behandelt. Vor und nach dem Waschschrift wurden die Schnitte mit DAPI (1:5000 in PBS) bedeckt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit NPG eingedeckt. Bis zur Analyse wurden sie bei 4 °C gelagert.

2.4.7 Bildaufnahme

Die Aufnahme der gefärbten Schnitte mittels eines Konfokalmikroskops (Nikon A1 Konfokallasermikroskop, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) wurde nicht eigenständig von mir durchgeführt. Sie wurden von Dr. med. David Koser und Giovanna Pommerschein durchgeführt.

Dazu wurden als erstes die Detektor-HV-Verstärkung und das Offset für jeden Kanal individuell festgelegt. Dies erfolgte gemäß dem Standardprotokoll. Die Schnitte wurden mittels eines Rasterscans mit 15–20 % Überschneidung aufgenommen. Zuzüglich wurde an jeder Position ein Z-Stack gemacht, bestehend aus 3–7 Bildern in einem Abstand von 1–2 µm. Aus den vielen Einzelbildern (Objektiv: Plan Apo, 20x, NA: 0.8) wurde durch die Nikon NIS-Elements AR Software das Gesamtbild des Rückenmarks zusammengesetzt.

2.5 Datenanalyse

Die Konvertierung und anschließende Datenanalyse erfolgte mithilfe von ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Die Konvertierung erfolgte zunächst durch das Öffnen der Datei in ImageJ mittels des Plugins „BioFormats“ und des Macros „BF Importer“. Die Import-Optionen: „Hyperstack, XYCZT“, „Open files individually“, „Color mode: grey scale“ und „Split channels“ wurden ausgewählt. So entstand ein Bildstapel von jeweils fünf bis sieben Bildern. Diese wurden über „Image“> „Stacks“> „Z Project“ zu einem Bild zusammengeführt. Als Projektionstyp wurde die maximale Intensität bestimmt. Dies geschah jeweils für die Anfärbung der Zellkerne (DAPI) und die

dazugehörige Antikörperfärbung (MBP, GFAP, Iba1 und CD3⁺). Im Anschluss wurden die beiden Bilder jeweils einzeln gespeichert. Ein drittes Bild wurde durch die Überlagerung dieser beiden Einzelbilder mittels der Funktion „Image“> „Color“> „Merge Channels“ erstellt. Die mit DAPI angefärbten Zellkerne wurden grundsätzlich blau dargestellt. MBP und GFAP wurden grün und Iba1 sowie CD3⁺ rot dargestellt.

2.5.1 Semiquantitatives Scoring-System

Der Grad der Demyelinisierung wurde anhand des semiquantitativen Scores nach Batouils ¹⁶⁰ beurteilt. Dieser unterteilt den Grad der Demyelinisierung in fünf Stufen: 0 – keine Myelinpathologie; 1 – verstreute demyelinisierte Axone; 2 – demyelinisierte Plaques; 3 – demyelinisierte Plaques und beginnende demyelinisierte Areale; 4 – umfangreiche demyelinisierte Bereiche. Das Ausmaß der Makrophagen-Infiltration wurde semiquantitativ nach dem Prinzip von Schregel et al. beurteilt ¹²⁶. Der Score unterteilt das Ausmaß der Infiltration in fünf Kategorien: 0 – kein Vorkommen; 1 – geringes Vorkommen; 2 – moderates Vorkommen; 3 – starkes Vorkommen; 4 – massives Vorkommen. Die Auswertung der Astrozyten basierte ebenso auf diesem Score. Die eingewanderten CD3⁺-Zellen wurden manuell anhand der deutlich CD3-positiven Zellen in der ventralen Hälfte des Rückenmarks bewertet. Das Ausmaß der T-Zell-Infiltration wurde semiquantitativ wie folgt beurteilt: 0 – keine Infiltration; 1 – <100 positive Zellen; 2 – <150 positive Zellen; 3 – <200 positive Zellen, 4 – >200 positive Zellen.

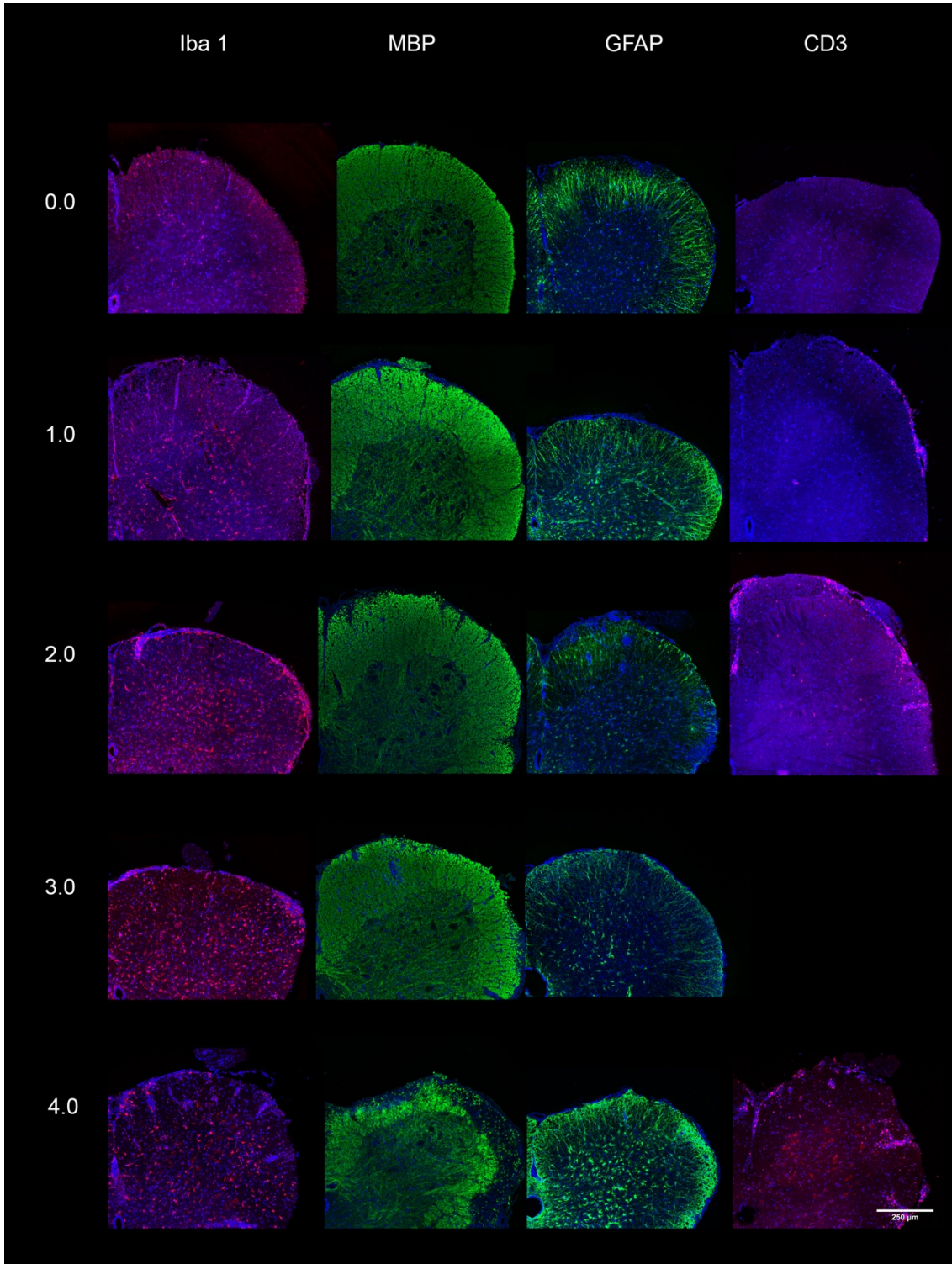


Abbildung 2 Repräsentative Beispielbilder für den semiquantitativen Score von Iba1 (rot), MBP, GFAP (grün) und CD3⁺ (rot), alle Bilder mit DAPI-positiven Zellkernen (blau) überlagert. Die Iba1 und GFAP-Bilder wurden gemäß der folgenden Kriterien beurteilt: 0 – kein Vorkommen; 1 – geringes Vorkommen; 2 – moderates Vorkommen; 3 – starkes Vorkommen; 4 – massives Vorkommen. Der semiquantitative Score von MBP basiert auf: 0 – keine Myelinpathologie; 1 – verstreute demyelinisierte Axone; 2 – demyelinisierte Plaques; 3 – demyelinisierte Plaques und beginnende demyelinisierte Areale; 4 – umfangreiche demyelinisierte

Bereiche. Das Vorhandensein von CD3-positiven T-Zellen wurde gemäß der folgenden Kriterien beurteilt: 0 – keine Infiltration; 1 – <100 positive Zellen; 2 – <150 positive Zellen; 3 – <200 positive Zellen, 4 – >200 positive Zellen. Maßstab 250 µm

2.5.2 Bestimmung der Zelldichte mittels ImageJ

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden die DAPI-Bilder der jeweiligen Färbung verwendet. Über ImageJ wurde halbautomatisch der Schwellenwert berechnet. Dies erfolgte separat für jedes Bild. Zunächst wurde das Bild in ein 8-Bit-Bild umgewandelt. Zuvor wurde das zusammengesetzte Bild aus DAPI zusammen mit der jeweiligen Färbung übereinandergelegt. Dies ließ die Unterscheidung zwischen grauer und weißer Substanz zu. Im Anschluss wurde bei 33,33-facher Vergrößerung die weiße Substanz manuell ausgewählt/umfahren, eine Maske erstellt und als Interessensregion (engl. *region of interest*, ROI) gespeichert. Das gleiche erfolgte dann mit der grauen Substanz. Anschließend wurden in der gesamten ventralen Hälfte des Rückenmarks zehn Bereiche ohne Zellkerne ausgewählt, davon fünf in der weißen Substanz sowie fünf in der grauen Substanz. Die Auswahl erfolgte ohne ein vorgegebenes Schema. ImageJ berechnete für jeden markierten Bereich den Mittelwert der Grauwerte und deren Standardabweichung. Die Ergebnisse wurden in Microsoft Excel (Microsoft Excel für Mac, Version 15.41) übertragen und für jeden Bereich individuell der Schwellenwert berechnet. Dies erfolgte durch die Gauß-Verteilung:

$$\text{Mittelwert} + \text{Standardabweichung} * 1,96$$

Alle Intensitäten kleiner als der Schwellenwert wurden vom Hintergrund subtrahiert. Dies entsprach einem 97,5 %igen Konfidenzintervall.

Anschließend wurde aus den individuell festgelegten Schwellenwerten der Mittelwert berechnet. Das gemittelte Ergebnis wurde als Schwellenwert für die jeweilige Substanz verwendet. Der oben beschriebene Vorgang erfolgte sowohl für die weiße als auch für die graue Substanz.

Nach Festlegung des Schwellenwerts wurde die Zelldichte mittels ImageJ und der zuvor ausgewählten Maske bestimmt. Keiner der manuell ausgewählten Kerne war kleiner als 4,8 µm. Dies entspricht 50 Pixeln. Daher wurden die

segmentierten Areale, die kleiner als $4,8 \mu\text{m}$ waren, in die nachfolgenden Analysen nicht mit einbezogen. Der Flächeninhalt wurde anhand der ausgewählten Masken für graue und weiße Substanz einzeln bestimmt. Der Anteil der Zellkerne wurde sowohl für die graue als auch die weiße Substanz durch die Formel:

$$\text{Summe Zellkernfläche/Gesamtfläche}$$

berechnet.

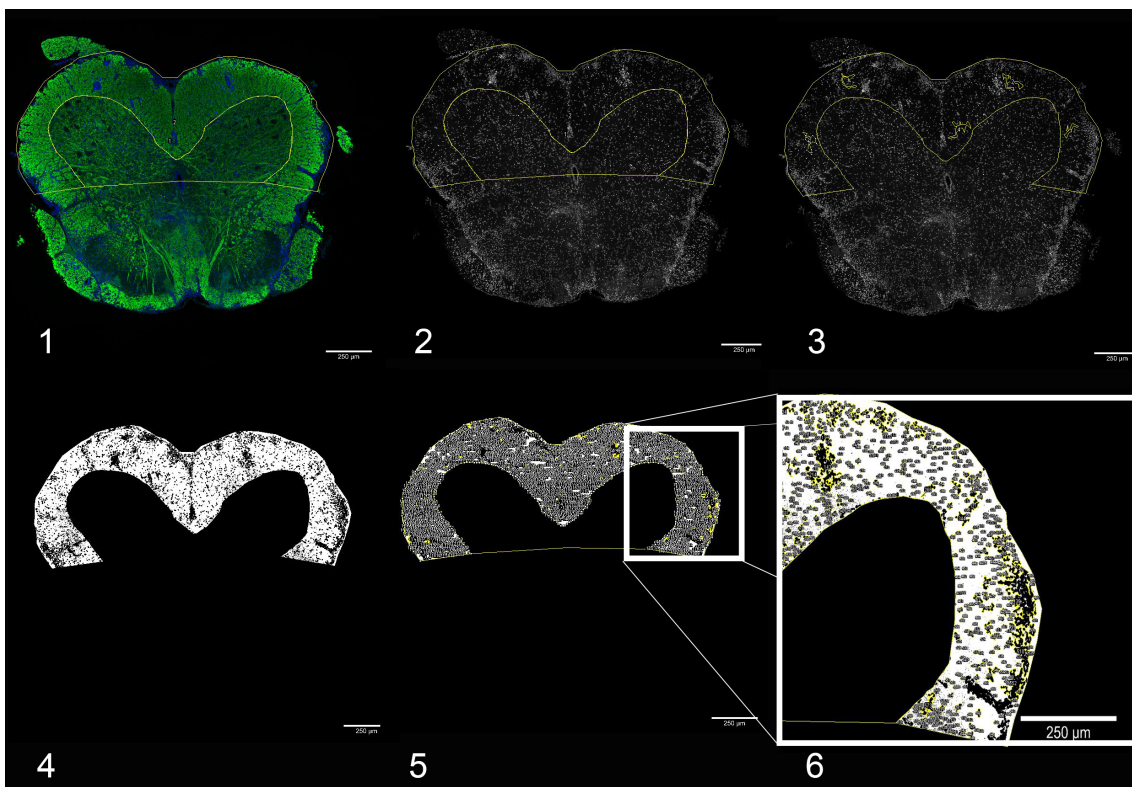


Abbildung 3 Bestimmung der Zelldichte am Beispiel der weißen Substanz. 1. Maske auswählen im farbigen Übersichtsbild; 2. Maske an Bild mit DAPI-Zellkernen anwenden und Fläche bestimmen; 3. In der weißen Substanz fünf zellkernfreie Bereiche auswählen und Schwellenwert berechnen; 4. Schwellenwert aus den Bereichen in Excel berechnen und für Rückenmark anwenden; 5. Berechnung der Fläche, die von Zellkernen eingenommen wurde; 6. Vergrößerung der Zellauswahl. Maßstab $250 \mu\text{m}$.

2.5.3 Intensitätsmessung mittels ImageJ

Die Intensitätsmessung erfolgte halbautomatisch mithilfe von ImageJ. Die Bilder wurden dazu in 8-Bit-Bilder umgewandelt. Mithilfe der bei der Zelldichtebestimmung ausgewählten Masken wurden die weiße und graue

Substanz ausgewählt. Die Intensitätsmessung erfolgte im Anschluss über eine Histogrammanalyse mittels ImageJ. Der Mittelwert und der Medianwert wurden mithilfe von ImageJ bestimmt.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von GraphPad Prism (Prism 7.0 für Mac OS X, Version 7.0d, GraphPad Software Inc.). Bei 15 Mäusen konnte die Datenerhebung an zwei unterschiedlichen Positionen im Rückenmark durchgeführt werden, sodass pro Maus jeweils zwei Ergebnisse pro Auswertung vorlagen. Da die Ergebnisse von der gleichen Maus generiert wurden, konnten diese nicht als unabhängig voneinander betrachtet werden und wurden infolgedessen gemittelt. Der gemittelte Wert wurde für die statistische Analyse verwendet. Bei sechs Mäusen lag jeweils nur ein Schnitt vor, der für die statistische Analyse verwendet wurde. Die Daten wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet. Wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, so wurde die Signifikanz entweder mithilfe des ungepaarten Student's t-Test (normalverteilter Datensatz) oder mittels des Mann-Whitney-U-Test (nicht-normalverteilter Datensatz) getestet. Um lineare Zusammenhänge zwischen zwei Parametern festzustellen, wurde entweder der Pearsons Korrelationskoeffizient (normalverteilter Datensatz) oder die Spearman Rangkorrelation (nicht normalverteilter) verwendet. Für die gesamte statistische Analyse wurden zweiseitige Tests verwendet. Die Ergebnisse beschreiben entweder den Mittelwert oder Medianwert. Das Signifikanzniveau betrug $p \leq 0,05$ (5 %).

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Veränderungen im Krankheitsverlauf der EAE

Um die histologischen Veränderungen innerhalb des Rückenmarks im Krankheitsverlauf der EAE zu untersuchen, wurde das Modell der schubförmig verlaufenden EAE verwendet. Die EAE wurde in weibliche SJL/J-Mäuse mittels PLP₁₃₁₋₁₅₁ induziert. Die klinischen Symptome wurden täglich von Dr. med. David E. Koser nach dem standardisierten erweiterten EAE-Score bewertet¹⁵⁶. Nach ca. 11,5 Tagen (median) zeigten die Mäuse die ersten Symptome¹⁵⁶. Der im Durchschnitt höchste EAE-Score betrug 3,5 und konnte 13–15 Tage nach der EAE-Induktion beobachtet werden¹⁵⁶. Im weiteren Verlauf sank der EAE-Score und erreichte sein Minimum von 1,5 etwa 21–23 Tage nach der Behandlung¹⁵⁶. Nach 35–36 Tagen konnte ein erneuter Anstieg auf 3,0 verzeichnet werden. Nach diesem erneuten Anstieg sank der EAE-Score um den 45. Tag noch einmal auf 2,5 und erreichte um den 52. Tag ein Plateau mit einem EAE-Score von 3,0¹⁵⁶. Basierend auf den Erkenntnissen des EAE-Scores wurden drei verschiedene Krankheitsstadien identifiziert: akute Phase (n = 7 Tiere), Remissionsphase (n = 4 Tiere), Schubphase (n = 3 Tiere) und die gleichaltrigen Kontrollgruppen (insgesamt 7 Tiere).

Die Mikroglia/Makrophageninfiltration, der Demyelinisierungsgrad sowie die Astrogliose wurden von drei erfahrenen Gutachtern (Prof. Dr. Stefanie Kürten, Dr. med. David E. Koser, Sofie Claire Groth) unabhängig mithilfe eines semiquantitativen Scores nach den oben genannten Kriterien begutachtet (siehe Kapitel 2.5.1). Die hier beschriebenen Ergebnisse beschreiben den Mittelwert der unabhängig bestimmten semiquantitativen Scores. Die T-Zellinfiltration wurde aufgrund der geringen Fallzahl nur von der Verfasserin mittels des oben beschriebenen semiquantitativen Scores bewertet. Lag aus einer Maus sowohl ein kranialer als auch ein kaudaler Schnitt vor, so wurden die beiden Ergebnisse gemittelt, sodass es pro Färbung nur ein Ergebnis gab. Im Folgenden werden die Ergebnisse anhand des Mittelwerts beschrieben.

3.1.1 Inflammation

MS ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS. In den entzündlichen Läsionen sind vor allem Makrophagen und Mikrogliazellen auffindbar¹². Da die beiden Zelltypen in den aktiven Läsionen nur schwer voneinander zu unterscheiden sind, werden sie oft unter dem Begriff Mikrogliazellen/Makrophagen zusammengefasst⁷⁵. Zur Darstellung der Mikrogliazellen/Makrophagen wurde das Rückenmark mithilfe des Iba1-Antikörpers immunhistochemisch angefärbt. Es wurden 35 Schnitte aus 21 Tieren gefärbt und begutachtet. Die Mikroglia/Makrophageninfiltration wurde analog zum Schema von Schregel et al. bestimmt¹²⁶.

Für jedes Krankheitsstadium gab es gleichaltrige Kontrolltiere (n = 10 Schnitte von n = 7 Tieren), die zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst wurden. Die Ränder des Rückenmarks der Kontrolltiere waren scharf begrenzt und wurden von DAPI-positiven Zellkernen gebildet. Diese waren nicht nur im Randbereich lokalisiert, sondern innerhalb des gesamten Rückenmarks auffindbar. Eine genaue Zuordnung des Zelltyps war nicht möglich. Die DAPI-positiven Zellkerne lagen nicht akkumuliert oder in Zellnestern angeordnet vor. Innerhalb des Rückenmarks der Kontrolltiere waren keine Infiltrationen von Iba1-positiven Mikrogliazellen/Makrophagen zu erkennen. Die weiße Substanz konnte nur schwer von der grauen Substanz unterschieden werden, und in beiden waren keine pathologischen Veränderungen feststellbar. Die Kontrolltiere hatten einen semiquantitativen Score von 0 (siehe Abbildung 4).

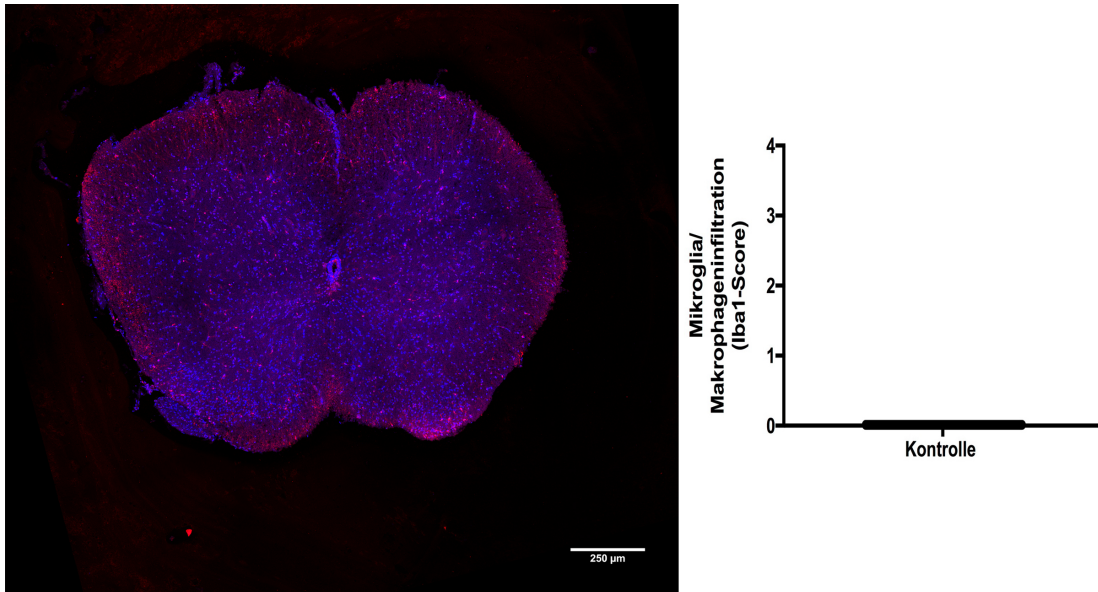


Abbildung 4 Mikrogliamakrophageninfiltration im gesunden Rückenmark. Links: Abbildung des Kontrollrückenmarks. Innerhalb des Rückenmarks waren keine pathologischen Veränderungen festzustellen. Rechts: Der semiquantitative Score der Kontrollen betrug 0.

In der akuten Phase ($n = 11$ Schnitte von $n = 7$ Tieren) waren deutliche Akkumulationen von DAPI-positiven Zellkernen erkennbar. Die Zellnester waren hauptsächlich in der weißen Substanz lokalisiert, jedoch auch in der grauen Substanz auffindbar. Neben den DAPI-positiven Zellkernen war auch eine deutliche Mikrogliamakrophageninfiltration verglichen mit den Kontrolltieren sichtbar ($p < 0,001$; Student's t-Test). Die Iba1-positiven Zellen waren hauptsächlich in der weißen Substanz lokalisiert und dort diffus über die gesamte weiße Substanz verteilt. Es zeigte sich eine gehäufte Ansammlung innerhalb der Zellnester bzw. in der Nähe der akkumulierten Zellkerne. Auch in der grauen Substanz waren Mikrogliamakrophageninfiltrate auffindbar und ebenfalls diffus verteilt. Der semiquantitative Score innerhalb der akuten Phase betrug durchschnittlich 2,57; mit Ausnahme einer Maus betrug er zudem immer mehr als 2,17 (siehe Abbildung 5). Der am höchsten verzeichnete semiquantitative Score von Iba1 betrug 3,5 ($n = 2$ Schnitte von $n = 1$ Tier).

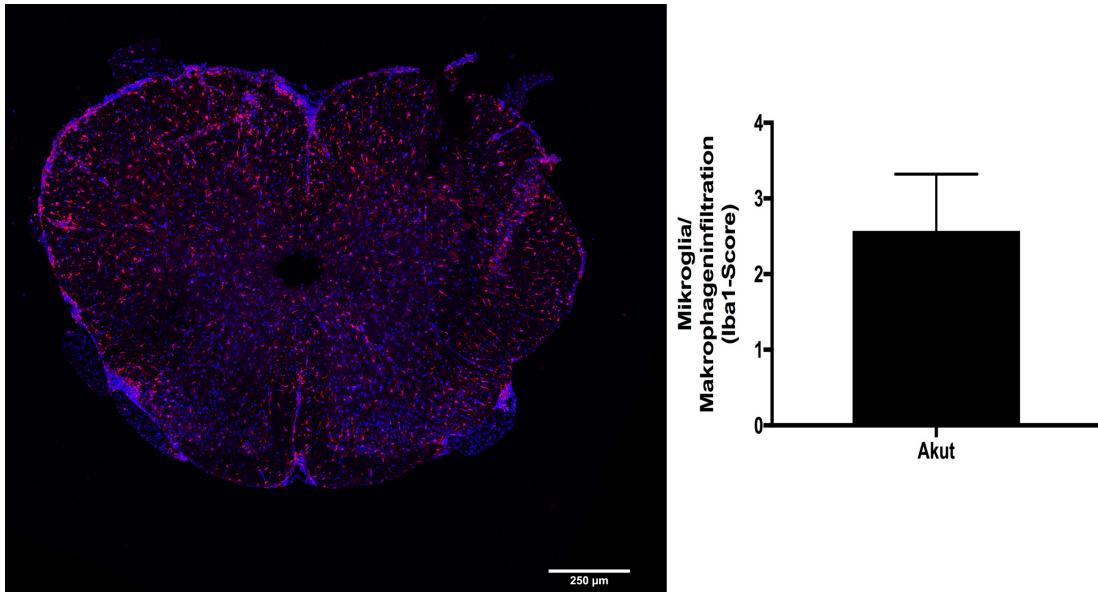


Abbildung 5 Mikroglia/Makrophageninfiltration in der akuten Phase der EAE. Links: Abbildung eines Rückenmarks aus der akuten Phase. Es war eine deutlich verstärkte Mikroglia/Makrophageninfiltration sichtbar. Die eingewanderten Gliazellen waren hauptsächlich in oder um die Zellkernakkumulationen verteilt. Rechts: Semiquantitativer Score der akuten Phase. Der durchschnittliche semiquantitative Score der akuten Phase betrug 2,57.

In der Remissionsphase war in 2 Tieren (n = 3 Schnitte von n = 2 Tieren) eine deutliche Mikroglia/Makrophageninfiltration zu sehen. Dies bestätigte auch der hohe semiquantitative Score dieser Tiere von 2,0 bzw. 2,17. Die Iba1-positiven Zellen waren hauptsächlich im Randbereich lokalisiert und traten gehäuft innerhalb der akkumulierten Zellnester auf. In den anderen Tieren der Remissionsphase (n = 4 Schnitte von n = 2 Tieren) war ein leichter Rückgang der eingewanderten Mikrogliazellen/Makrophagen zu verzeichnen. Dies war auch am geringeren semiquantitativen Score dieser Tiere von 1,5 bzw. 1,67 erkennbar. Verglichen mit der akuten Phase war die Mikroglia/Makrophageninfiltration jedoch nicht signifikant reduziert ($p > 0,05$; Student's t-Test). Die eingewanderten Mikrogliazellen/Makrophagen waren vor allem in den randständigen Zellnestern aufzufinden. Analog zur akuten Phase waren auch diffus verteilte Mikrogliazellen/Makrophagen in der grauen Substanz zu erkennen (siehe Abbildung 6).

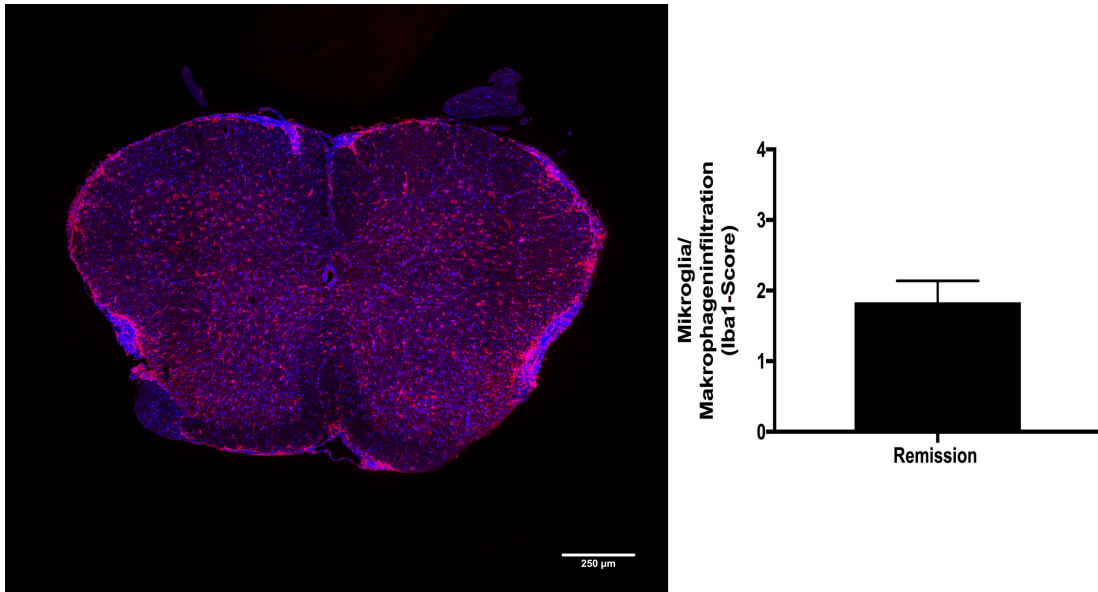


Abbildung 6 Mikrogli/Makrophageninfiltration in der Remissionsphase der EAE. Links: Abbildung eines Rückenmarks aus der Remissionsphase. Zwei Tiere zeigten eine deutlich erhöhte Mikrogli/Makrophageninfiltration. In den anderen Tieren der Remissionsphase war ein leichter Rückgang der eingewanderten Mikrogliazellen/Makrophagen zu verzeichnen. Rechts: Semiquantitativer Score der Remissionsphase. Der durchschnittliche semiquantitative Score der Remissionsphase betrug 1,84.

In der Schubphase konnte in 3 Tieren ($n = 4$ Schnitte von $n = 3$ Tieren) eine geringere Mikrogli/Makrophageninfiltration verzeichnet werden. Wie auch in den beiden anderen Stadien waren die Iba1-positiven Zellen hauptsächlich im Randbereich lokalisiert und vor allem in den akkumulierten Zellnestern auffindbar. Der semiquantitative Score lag zwischen 0,83 und 1,0 ($n = 3$ Schnitte von $n = 2$ Tieren). In einer anderen Maus der Schubphase war ein geringer Anstieg der Mikrogli/Makrophageninfiltration und dementsprechend des semiquantitativen Scores feststellbar ($n = 1$ Schnitt von $n = 1$ Tier). Der semiquantitative Score betrug 2,0. Die eingewanderten Mikrogliazellen/Makrophagen zeigten das gleiche Verteilungsmuster wie in dem Rückenmark der anderen Tiere in der Schubphase. Des Weiteren war ein Anstieg der Iba1-positiven Zellen innerhalb der grauen Substanz feststellbar (siehe Abbildung 7).

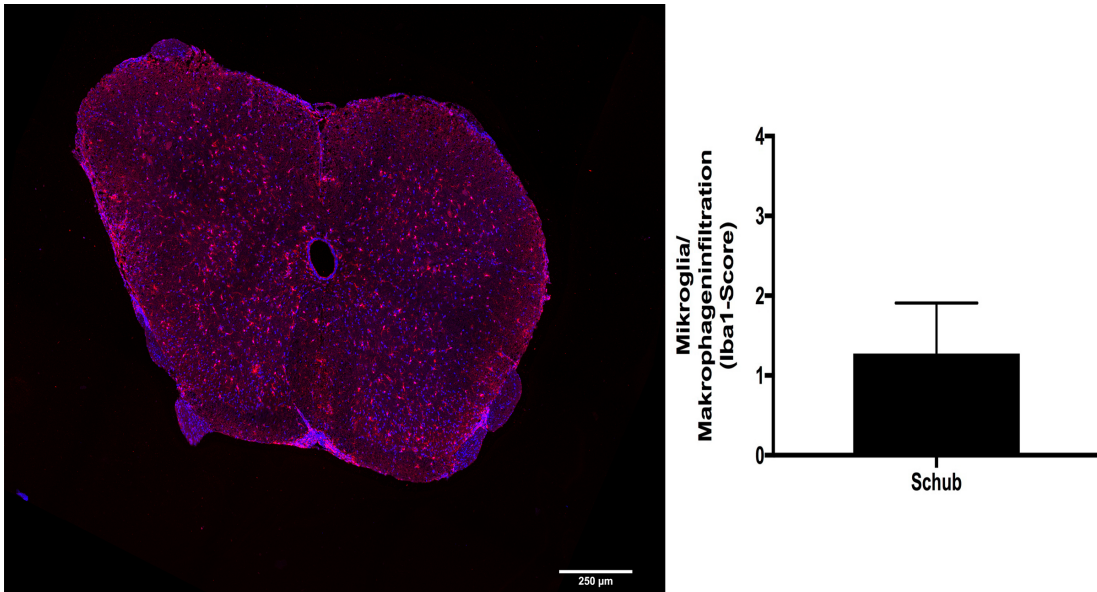


Abbildung 7 Mikroglia/Makrophageninfiltration in der Schubphase der EAE. Links: Abbildung eines Rückenmarks aus der Schubphase. Die eingewanderten Gliazellen waren hauptsächlich im Randbereich und innerhalb der akkumulierten Zellkernester auffindbar. Rechts: Der durchschnittliche semiquantitative Score betrug 1,27.

Im Vergleich zur akuten Phase waren deutlich weniger eingewanderte Mikrogliazellen/Makrophagen zu verzeichnen ($p < 0,05$; Student's t-Test). Zwischen der Remissionsphase und der Schubphase war kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p > 0,1$; Student's t-Test). In allen Stadien war ein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Mäusen und den Kontrollen sichtbar ($p > 0,0001$; Student's t-Test, siehe Abbildung 8).

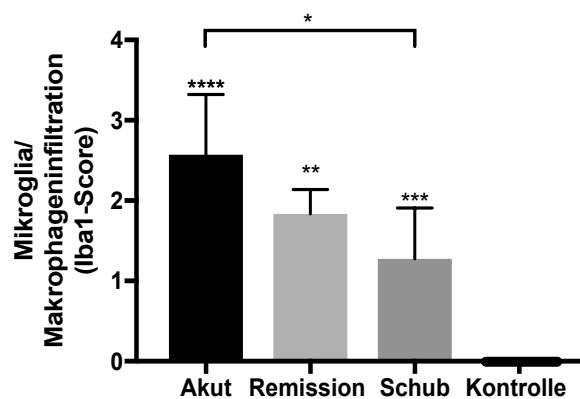


Abbildung 8 Veränderung der Mikroglia/Makrophageninfiltration im Krankheitsverlauf der EAE. Das Ausmaß der Mikroglia/Makrophageninfiltration nahm im Krankheitsverlauf deutlich ab. Der anfängliche semiquantitative Score in der akuten Phase betrug 2,57 (Mittelwert) verglichen mit 1,27 (Mittelwert) in der Schubphase. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der akuten Phase und der Schubphase.

($p < 0,05$). In allen Stadien war ein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Mäusen und den Kontrollen sichtbar.

3.1.2 Demyelinisierung

Um den Demyelinisierungsgrad zu begutachten, wurden die Myelinscheiden mithilfe des MBP-Antikörpers immunhistochemisch angefärbt. Hierzu wurden 34 Schnitte aus 21 Tieren gefärbt und begutachtet. Die unabhängigen Gutachter bewerteten das Rückenmark nach dem oben beschriebenen Schema von Batoulis et al.¹⁶⁰.

Bei allen gleichaltrigen Kontrollen ($n = 11$ Schnitte von $n = 7$ Tieren) war ein homogenes Erscheinungsbild erkennbar. Die Ränder zeigten keine Unterbrechungen und waren scharf begrenzt. Die weiße und graue Substanz waren klar voneinander zu unterscheiden. In der weißen Substanz war ein homogenes Erscheinungsbild der myelinisierten Axone zu erkennen. Es waren keine demyelinisierten Areale beziehungsweise Plaques feststellbar. Verglichen mit der weißen Substanz erschien die graue Substanz dunkler und zeigte ein heterogeneres Erscheinungsbild. Dies war durch den deutlich geringeren Anteil von myelinisierten Axonen und dem zusätzlichen Vorhandensein von weiteren Zelltypen wie beispielsweise Gliazellen erklärbar. Sowohl in der weißen Substanz als auch der grauen Substanz waren keine pathologischen Veränderungen feststellbar. Alle Kontrollen hatten einen semiquantitativen Score von 0 (siehe Abbildung 9).

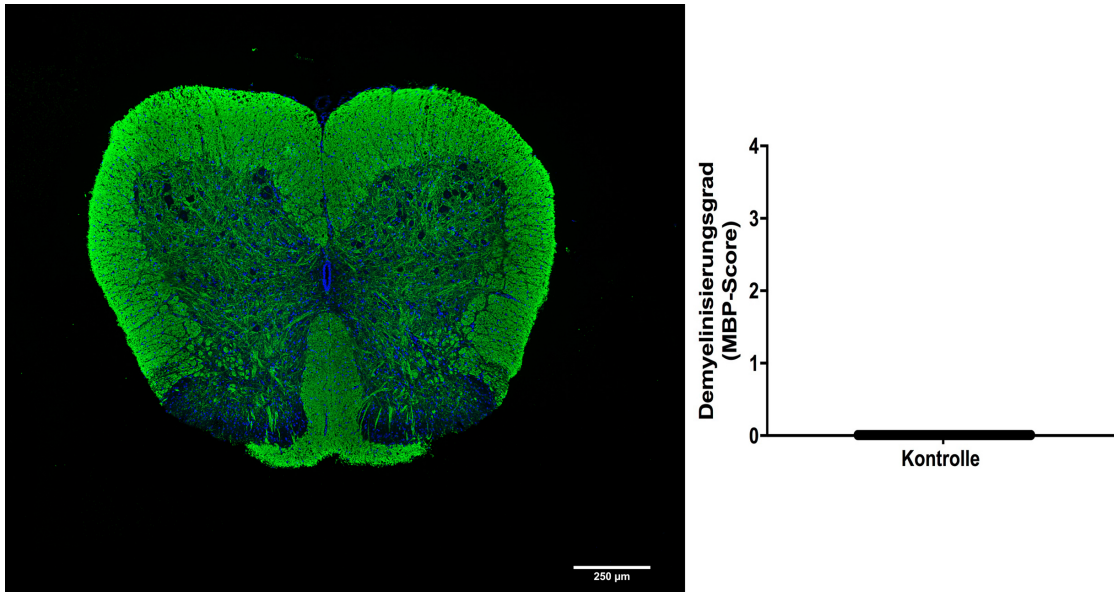


Abbildung 9 Myelinisierungsgrad im gesunden Rückenmark. Links: Abbildung des Kontrollrückenmarks. Innerhalb des Rückenmarks waren keine pathologischen Veränderungen festzustellen. Rechts: Semiquantitativer Score der Kontrollen. Der semiquantitative Score der Kontrolltiere betrug 0.

In der akuten Krankheitsphase (n = 12 Schnitte von n = 7 Tieren) war die fortschreitende Demyelinisierung klar erkennbar. Die weiße Substanz zeigte ein diffuses und heterogenes Erscheinungsbild. Durch die fortschreitenden Entmarkungsvorgänge waren die Randbereiche nicht mehr scharf begrenzt. Des Weiteren waren vermehrte demyelinisierte Plaques bzw. Areale sichtbar, die hauptsächlich im Randbereich lokalisiert waren. Plaques waren jedoch auch innerhalb der weißen Substanz auffindbar. Die demyelinisierten Plaques bzw. Areale zeichneten sich durch ein fehlendes MPB-Signal aus. In diesem Bereich waren nur noch Ansammlungen von DAPI-positiven Zellkernen sichtbar. Die im Randbereich lokalisierten DAPI-positiven Zellkerne bildeten in diesem Bereich die äußere Begrenzung der weißen Substanz, in die die Plaques bzw. demyelinisierten Bereiche zum Teil deltaförmig hineinragten. Innerhalb der weißen Substanz waren ebenfalls große lakunen- bis punktförmige Plaques erkennbar. In der grauen Substanz hingegen waren keine offensichtlichen Veränderungen feststellbar. In der akuten Phase lag der semiquantitative Score zwischen 1,67 und 3,33 mit einem Mittelwert von 2,45 (siehe Abbildung 10).

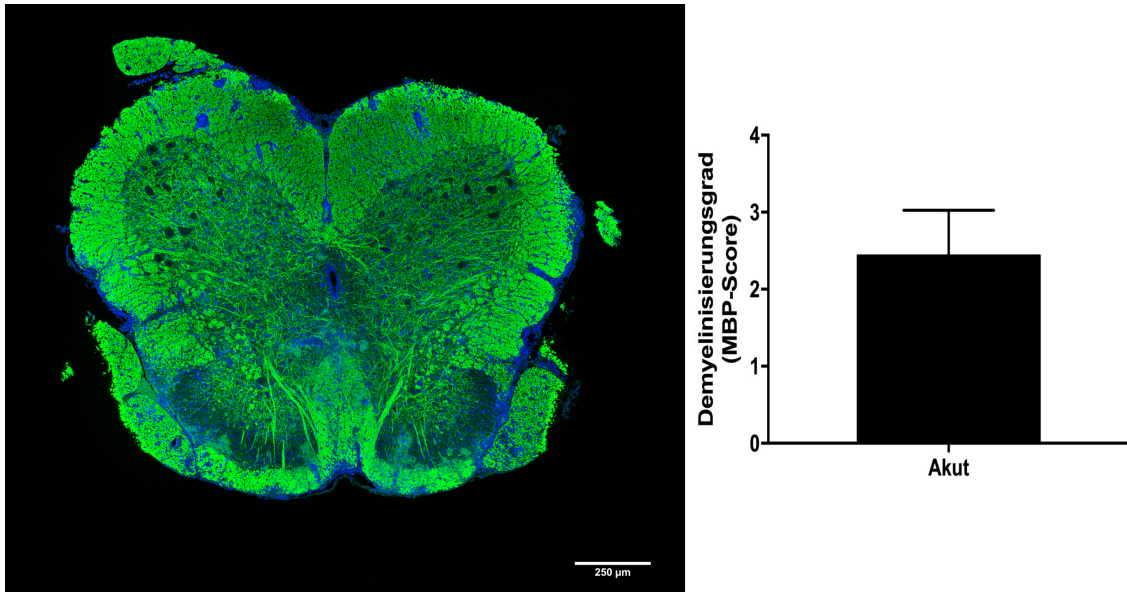


Abbildung 10 Ausmaß der Demyelinisierung in der akuten Phase der EAE. Links: Abbildung eines Rückenmarks aus der akuten Phase. Im Randbereich und innerhalb der weißen Substanz waren bereits Destruktionen der Myelinscheiden feststellbar. Innerhalb der weißen Substanz waren Plaques zu erkennen. Die Plaques zeichneten sich durch ein fehlendes MBP-Signal aus. Rechts: Semiquantitativer Score der akuten Phase. Der durchschnittliche semiquantitative Score der akuten Phase betrug 2,45.

Der Demyelinisierungsprozess schien in der Remissionsphase (n = 7 Schnitte von n = 4 Tieren) zu stagnieren. Wie auch in der akuten Phase waren die demyelinisierten Plaques bzw. Areale vorzugsweise im Randbereich lokalisiert. Des Weiteren waren, wie auch in der akuten Phase, Plaques innerhalb der weißen Substanz auffindbar, wohingegen die graue Substanz keine pathologischen Veränderungen aufwies. In der Remissionsphase zeigten zwei Tiere (n = 3 Schnitte von n = 2 Tieren) eine deutliche Destruktion der weißen Substanz, was auch am vergleichsweise hohen semiquantitativen Score von 2,33 beziehungsweise 3,0 abgelesen werden konnte. Verglichen dazu waren in den anderen Tieren der Remissionsphase (n = 4 Schnitte von 2 Tieren) keine weiteren demyelinisierten Bereiche feststellbar und eine Progression der vorhandenen demyelinisierten Bereiche war nicht zu erkennen. Die auffindbaren Plaques und Areale erschienen im Vergleich zur akuten Phase verkleinert. Innerhalb der Remissionsphase variierte der semiquantitative Score zwischen 1,33 und 3,0. Auch statistisch war ein Unterschied zwischen der akuten Phase und der Remissionsphase zu erkennen. In der akuten Phase betrug der Mittelwert 2,45, während in der Remissionsphase die durchschnittliche

Demyelinisierung mit 2,04 bewertet wurde (siehe Abbildung 11). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0,3$; Student's t-Test).

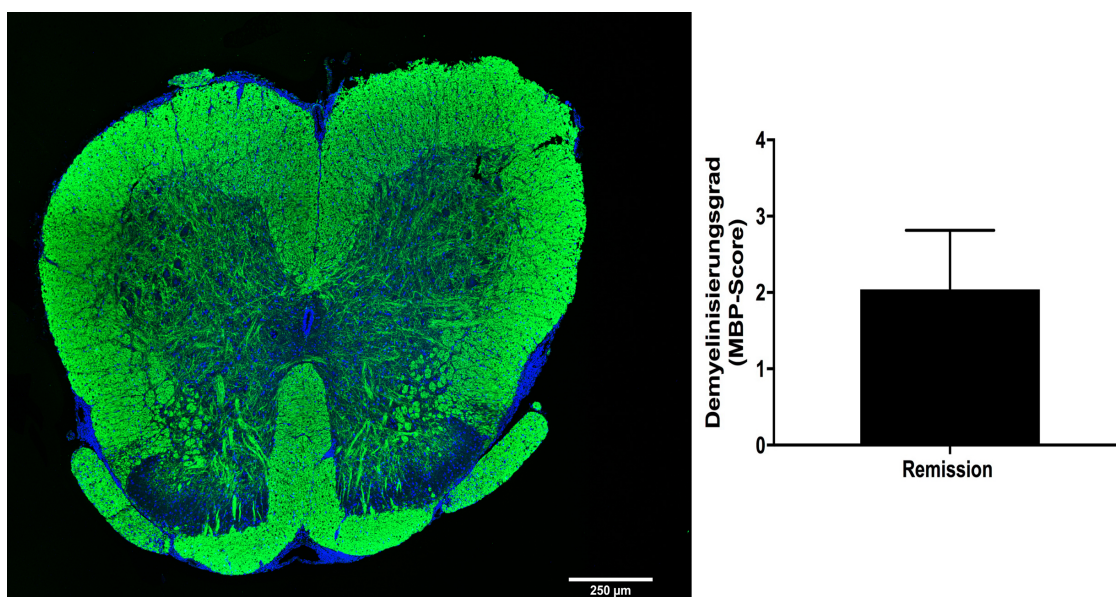


Abbildung 11 Ausmaß der Demyelinisierung in der Remissionsphase der EAE. Links: Abbildung eines Rückenmarks aus der Remissionsphase. Die Destruktion der Myelinscheiden schien zu stagnieren. Die vorhandenen demyelinisierten Areale schienen einen Remyelinisierungsprozess zu durchlaufen. Rechts: Semiquantitativer Score der Remissionstiere. Der durchschnittliche semiquantitative Score der Remissionsphase betrug 2,04.

In allen Rückenmarksschnitten der Mäuse der darauffolgenden Schubphase ($n = 4$ Schnitte von $n = 3$ Tieren) war wiederum eine fortschreitende Destruktion der Myelinscheiden sichtbar. Dies bestätigt auch der hohe semiquantitative Score innerhalb der Schubphase, der zwischen 3,0 und 4,0 variierte. Die Ränder waren nur noch unscharf begrenzt. In zwei Tieren ($n = 3$ Schnitte von $n = 2$ Tieren) waren die deutlich generalisierten demyelinisierten Areale auf die Randbereiche der weißen Substanz begrenzt. Demyelinisierte Plaques innerhalb der weißen Substanz waren nur noch vereinzelt feststellbar. In einer Maus ($n = 1$ Schnitt von $n = 1$ Tier) war die Destruktion so weit fortgeschritten, dass etwa die Hälfte der weißen Substanz von der fortschreitenden Demyelinisierung betroffen war. Dies zeigt auch der hohe semiquantitative Score, der mit 4,0 bewertet wurde.

In der grauen Substanz war in der Schubphase keine pathologische Veränderung feststellbar (siehe Abbildung 12).

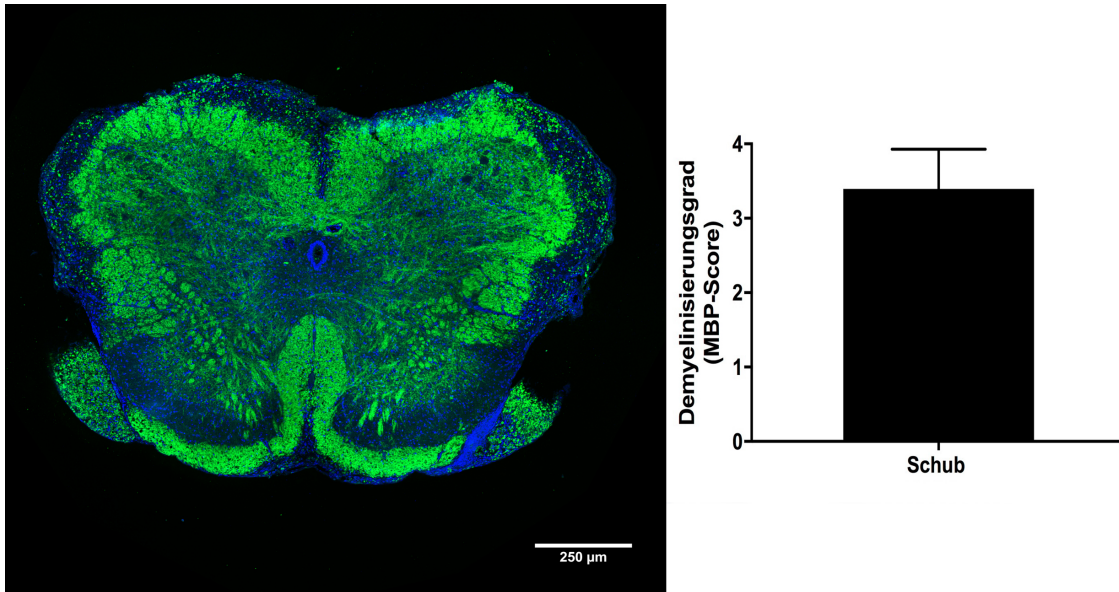


Abbildung 12 Ausmaß der Demyelinisierung in der Schubphase der EAE. Links: Abbildung eines erkrankten Rückenmarks aus der Schubphase. Das Ausmaß des Demyelinisierungsprozesses war deutlich zu erkennen. Die Destruktion der Myelinscheide betraf fast die Hälfte der weißen Substanz. Im Randbereich der weißen Substanz waren nur noch vereinzelt myelinisierte Axone feststellbar. In der grauen Substanz waren keine pathologischen Veränderungen erkennbar. Rechts: Der durchschnittliche semiquantitative Score der Schubphase betrug 3,39.

Der Demyelinisierungsgrad in der Schubphase war verglichen mit der akuten Phase signifikant erhöht ($p < 0,05$; Student's t-Test). Auch im Vergleich zur Remissionsphase war eine Entmarkung zu erkennen (3,39 vs. 2,04). Diese war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$; Student's t-Test). In allen Stadien war ein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Mäusen und den Kontrollen sichtbar ($p < 0,0001$; Student's t-Test, siehe Abbildung 13).

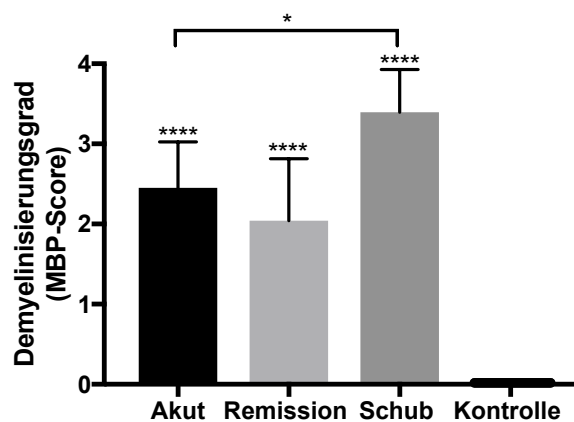


Abbildung 13 Veränderung der Demyelinisierung im Krankheitsverlauf der EAE. In der anfänglichen akuten Phase betrug das Ausmaß der Destruktion 2,45. In der Remissionsphase war eine Stagnation der

progressiven Destruktion zu beobachten, der Demyelinisierungsgrad betrug nur noch 2,04. In der Schubphase kam es zur Progression und immer stärkeren Zerstörung der Myelinscheiden. Das Ausmaß der Destruktion wurde mit 3,39 bewertet. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der akuten Phase und der Schubphase ($p < 0,05$).

3.1.3 Astrogliose

Infolge der Entzündungsreaktion kam es zur Aktivierung von Astrozyten. Infolgedessen kam es zu Astrozyten-Proliferation, Hypertrophie der zellulären Prozesse¹⁰¹, Veränderung in der Morphologie¹⁰⁵ und der verstärkten Expression von GFAP^{101,104,105}. Die verstärkte GFAP-Expression konnte durch das immunhistochemische Anfärben mit dem gleichnamigen Antikörper dargestellt werden. Insgesamt wurden 29 Schnitte von 21 Tieren auf den GFAP-Antikörper getestet.

Es wurden insgesamt sieben Kontrollmäuse verwendet. Bei allen gleichaltrigen Kontrolltieren ($n = 8$ Schnitte von $n = 7$ Tieren) war ein homogenes Erscheinungsbild erkennbar und die weiße Substanz konnte eindeutig von der grauen Substanz unterschieden werden. Innerhalb der weißen Substanz zeigte sich ein gleichmäßiges GFAP-Signal. Die GFAP-positiven fibrösen Astrozyten zeigten lange, dünne und vom Zellkörper abgehende unregelmäßig verzweigte Äste auf, die die weiße Substanz durchzogen. Infolgedessen zeigte die weiße Substanz ein diffuses Erscheinungsbild. Die in der grauen Substanz vorkommenden protoplasmatischen Astrozyten unterschieden sich deutlich von den fibrösen Astrozyten: Sie besaßen keine radiären ausstrahlenden Äste und hatten ein sternförmiges Erscheinungsbild. In den gesunden Kontrolltieren waren diese nur vereinzelt wiederzufinden. Innerhalb der Kontrolltiere waren keine DAPI-positiven Zellnester zu erkennen, die Ränder waren scharf begrenzt und es waren keine pathologischen Veränderungen feststellbar. Die Kontrollen hatten einen semiquantitativen Score von 0 (siehe Abbildung 14). In allen Stadien war ein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Mäusen und den Kontrollen sichtbar ($p < 0,0001$; Mann-Whitney U-Test, siehe Abbildung 18).

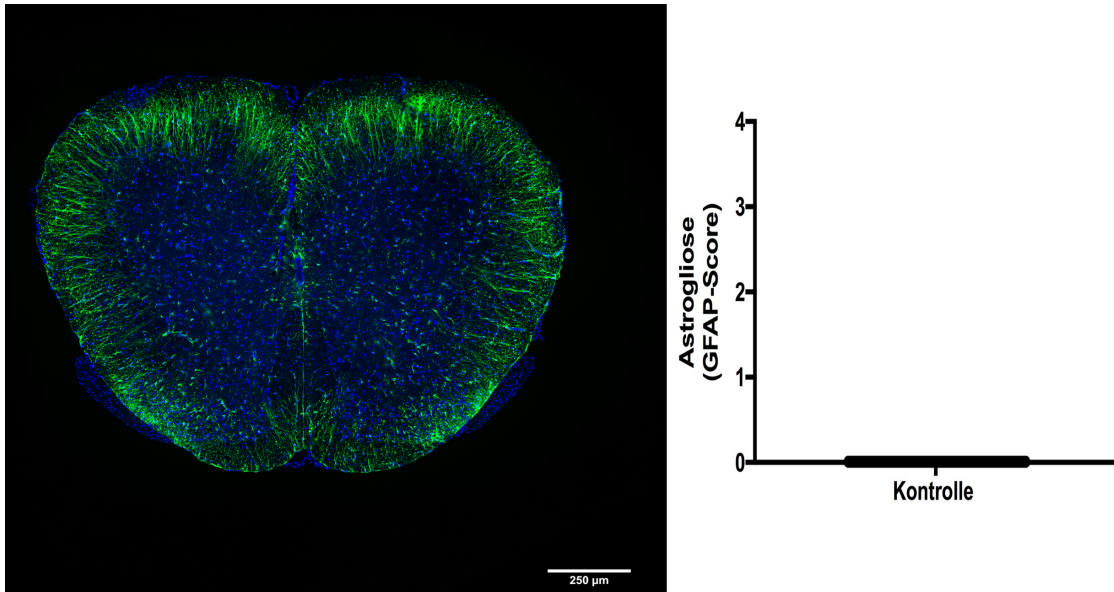


Abbildung 14 GFAP-Expression im gesunden Rückenmark. Links: Abbildung eines Kontrollrückenmarks. In den Kontrolltieren waren keine pathologischen Auffälligkeiten sichtbar. Das GFAP-Signal war homogen. In der grauen Substanz waren einige Astrozyten zu erkennen. Rechts: Alle Kontrolltiere hatten einen semiquantitativen Score von 0.

In der akuten Phase ($n = 10$ Schnitte von $n = 7$ Tieren) zeigten die beobachteten Tiere eine unterschiedlich starke Astroglie. In zwei Mäusen ($n = 2$ Schnitte von $n = 2$ Tieren) konnte eine deutlich verstärkte GFAP-Expression beobachtet werden. Dies bestätigt der hohe semiquantitative Score dieser Tiere, der mit 2,0 beziehungsweise 2,33 beurteilt wurde. Verglichen dazu zeigten zwei Tiere ($n = 2$ Schnitte von $n = 2$ Tieren) eine geringfügige Reduktion der Astroglie, mit einem semiquantitativen Score von 1,67. In den anderen Tieren der akuten Phase ($n = 6$ Schnitte von $n = 3$ Tiere) war ein deutlich schwächeres GFAP-Signal erkennbar. Der semiquantitative Score dieser Tiere betrug zwischen 0,17 und 0,33. Verglichen mit den Kontrolltieren wirkte das fibrilläre GFAP-Signal schwächer und unregelmäßiger. Des Weiteren war keine gleichmäßige Ausstrahlung der radiären Ausläufer innerhalb der weißen Substanz festzustellen. Die vom Zellkern abzweigenden radiären Zellfortsätze wurden teilweise durch Ansammlungen von DAPI-positiven Zellkernen unterbrochen. Die Tiere mit hohen semiquantitativen Scores zeigten ein teilweise verdichtetes und diffuses GFAP-Signal im Randbereich. Dieses diffuse Erscheinungsbild fehlte in den Tieren mit niedrigen semiquantitativen Scores. Innerhalb der grauen Substanz waren deutlich GFAP-positive Zellen zu erkennen. Die sich in der

grauen Substanz befindenden Astrozyten zeigten ein dreieck- bzw. sternförmiges Erscheinungsbild auf (siehe Abbildung 15).

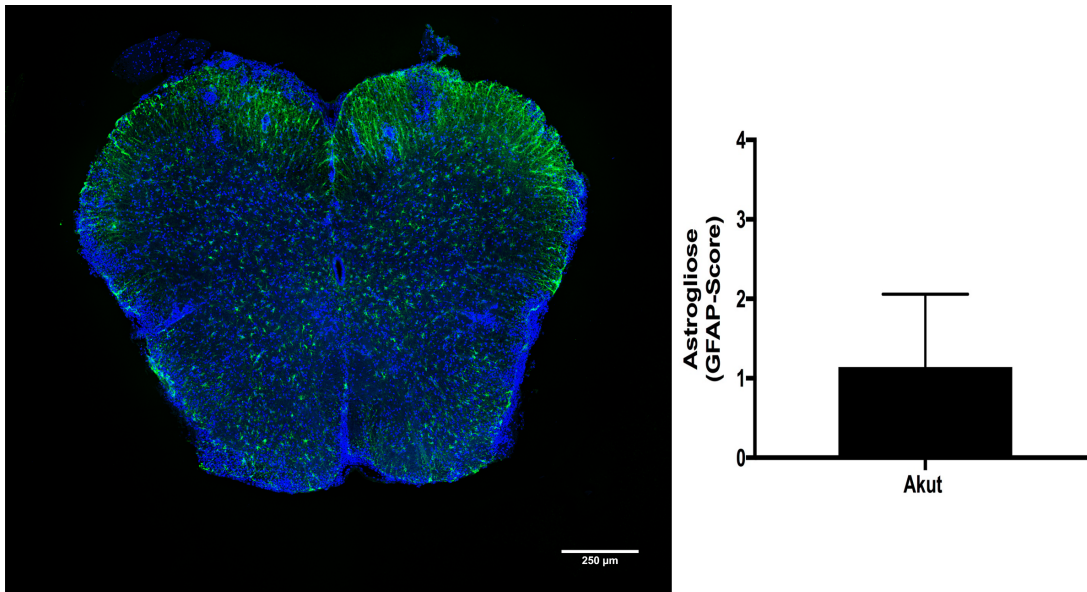


Abbildung 15 Astroglie in der akuten Phase der EAE. Links: Abbildung eines Rückenmarks aus der akuten Phase. In der akuten Phase variierte das Ausmaß der Astroglie. Während in einigen Tieren nur eine geringe GFAP-Expression zu verzeichnen war, zeigten zwei Tiere eine deutlich erhöhte GFAP-Expression. Rechts: Die durchschnittliche Astroglie in der akuten Phase wurde mit 1,14 bemessen.

In der Remissionsphase ($n = 7$ Schnitte von $n = 4$ Tieren) konnte ein Rückgang der GFAP-Expression festgestellt werden. Die Gutachter bewerteten das geringere Ausmaß der Astroglie mit einem semiquantitativen Score zwischen 0,33 und 0,67. Die radiären Astrozytenausläufer durchzogen die weiße Substanz nur noch unvollständig, wodurch ein unregelmäßig und diffus wirkendes Erscheinungsbild entstand. In den Randbereichen der Tiere mit höheren semiquantitativen Scores war ein teilweise verdichtetes, stärkeres und diffuseres GFAP-Signal festzustellen. Wie auch in den Tieren der akuten Phase waren DAPI-positive Zellkernakkumulationen innerhalb der weißen Substanz und vor allem im Randbereich feststellbar. In der grauen Substanz waren deutlich GFAP-positive Zellen zu erkennen. Diese zeigten ein unregelmäßiges Verteilungsmuster auf. Die Ränder waren durchgehend und scharf begrenzt. Im Vergleich zur akuten Phase war kein signifikanter Unterschied bzgl. des Ausmaßes der Astroglie festzustellen ($p > 0,2$; Student's t-Test, siehe Abbildung 16).

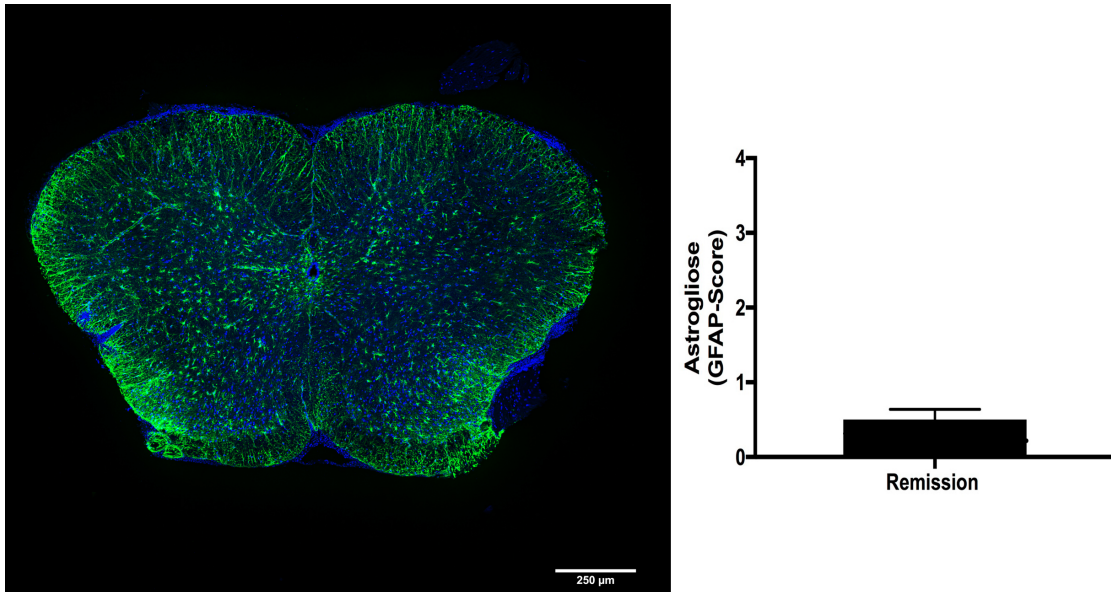


Abbildung 16 Astroglie in der Remissionsphase der EAE. Links: Abbildung eines erkrankten Rückenmarks aus der Remissionsphase. In der Remissionsphase sank das Ausmaß der Astroglie deutlich ab. Das GFAP-Signal erschien homogener. In der Remissionsphase konnten keine Glianarben festgestellt werden. Rechts: Der semiquantitative Score der Remissionsphase betrug durchschnittlich 0,5.

In der Schubphase ($n = 4$ Schnitte von $n = 3$ Tieren) war eine deutliche Zunahme der Astroglie verglichen mit der Remissionsphase erkennbar. Der semiquantitative Score variierte zwischen 2,0 und 4,0. In den Tieren mit geringerem semiquantitativem Score konnten die radiär ausstrahlenden Zellfortsätze der GFAP-produzierenden Astrozyten noch deutlich voneinander unterschieden werden. Das höchste Ausmaß der Astroglie wurde mit einem semiquantitativen Score von 4,0 bewertet ($n = 1$ Schnitt von $n = 1$ Tier). In diesem Tier konnten die radiären Zellausläufer nicht mehr voneinander unterschieden werden. Sie wirkten verdickt und ließen eine netzartige Struktur innerhalb der weißen Substanz entstehen. Die weiße Substanz zeigte ein unregelmäßiges, dichtes und diffus wirkendes Erscheinungsbild. Innerhalb dieser Struktur waren Glianarben erkennbar (siehe Abbildung 17).

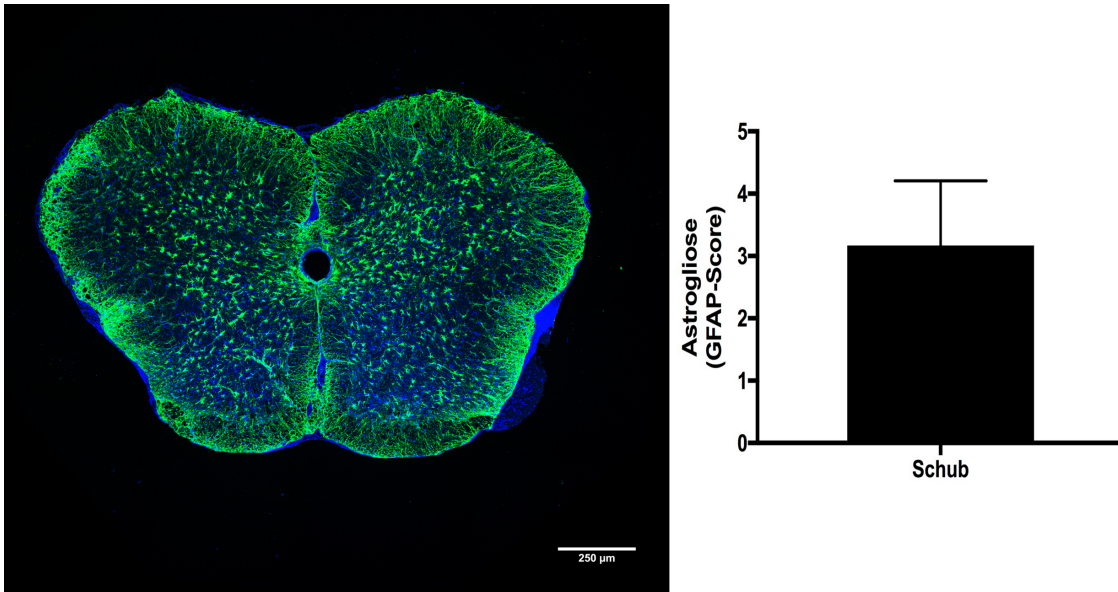


Abbildung 17 Ausmaß der Astroglie in der Schubphase der EAE. Links: Abbildung eines erkrankten Rückenmarks in der Schubphase der EAE. Es war eine deutlich erhöhte Astroglie zu verzeichnen. Das GFAP-Signal wirkte unregelmäßiger. Die radiären Zellfortsätze waren nicht mehr voneinander zu unterscheiden, sie wirkten verdickt und ließen eine netzartige Struktur innerhalb der weißen Substanz entstehen. Ferner waren in der weißen Substanz Glianarben erkennbar. Rechts: Der durchschnittliche semiquantitative Score betrug in dieser Phase 3,17.

Verglichen zu den beiden anderen Phasen war das Ausmaß der Astroglie deutlich erhöht ($p < 0,02$, $p < 0,01$; Student's t-Test, siehe Abbildung 18).

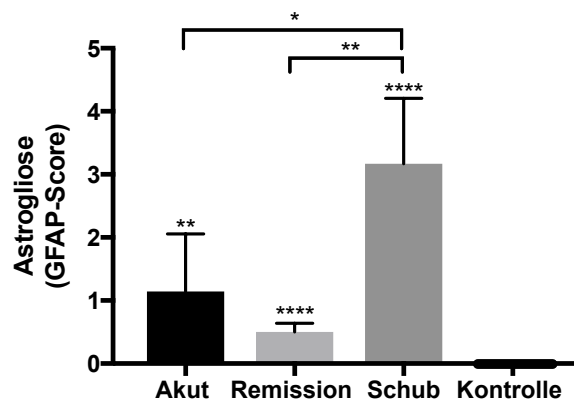


Abbildung 18 Veränderung der GFAP-Expression im Krankheitsverlauf der EAE. In der akuten Phase wurde das Ausmaß der Astroglie in den aktiven Läsionen mit durchschnittlich 1,14 bewertet. In der Remissionsphase war eine deutliche Reduktion der GFAP-Expression sichtbar (durchschnittlicher semiquantitativer Score: 0,5). In den Läsionen der darauffolgenden Schubphase war die stärkste Astroglie zu erkennen (durchschnittlicher semiquantitativer Score: 3,17). In dieser Phase waren außerdem Glianarben zu erkennen. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der akuten Phase, der Remissionsphase und der Schubphase ($p < 0,02$, $p < 0,01$). In allen Stadien war ein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Mäusen und den Kontrollen sichtbar.

3.1.4 T-Zellinfiltration

Um das Ausmaß der T-Zellinfiltration zu bestimmen, wurde das Rückenmark auf das Vorhandensein von T-Zellen mittels des anti-CD3-Antikörpers getestet. Die T-Zellen wurden manuell anhand der deutlich sichtbaren CD3-positiven Zellen in der ventralen Hälfte des Rückenmarks gezählt. Dies erfolgte bei einer 25-fachen Vergrößerung. Der semiquantitative Score wurde eigens von der Verfasserin bestimmt (siehe Material und Methoden). Insgesamt wurden 19 Rückenmarksschnitte von 16 Tieren immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Die Begutachtung wurde nur von der Verfasserin durchgeführt.

Zur Kontrolle wurden 7 Schnitte aus 6 verschiedenen Mäusen angefärbt. Bei allen Kontrolltieren war keine eindeutige Unterscheidung zwischen weißer und grauer Substanz möglich. Die Ränder waren scharf begrenzt und wurden von DAPI-positiven Zellkernen gebildet. Diese waren nicht nur im Randbereich lokalisiert, sondern innerhalb des gesamten Rückenmarks auffindbar. Eine genaue Zuordnung des Zelltyps war nicht möglich. Die DAPI-positiven Zellkerne lagen nicht akkumuliert oder in Zellnestern angeordnet vor. Innerhalb des Rückenmarks der Kontrolltiere waren keine Infiltrationen von CD3-positiven T-Zellen zu erkennen und in der weißen und grauen Substanz waren keine pathologischen Veränderungen feststellbar. Die Kontrollen hatten einen semiquantitativen Score von 0 (siehe Abbildung 19). In allen Stadien war ein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Mäusen und den Kontrollen sichtbar ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-U-Test).

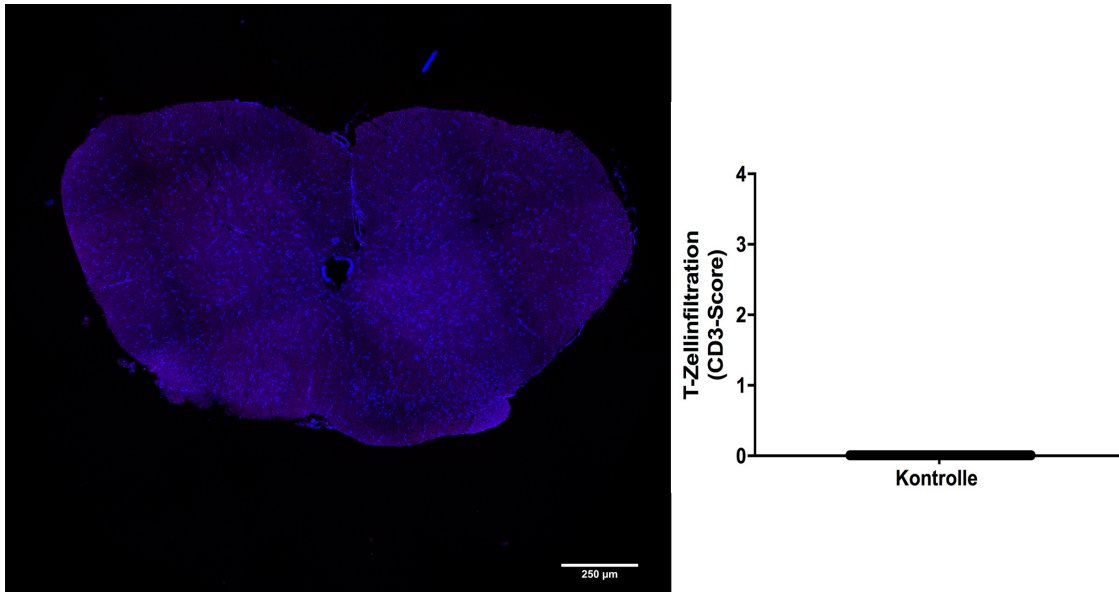


Abbildung 19 T-Zellinfiltration im gesunden Rückenmark. Links: Abbildung eines Kontrollrückenmarks. Im Kontrollrückenmark waren keine eingewanderten T-Zellen oder pathologischen Veränderungen zu erkennen. Rechts: Alle Kontrolltiere hatten einen semiquantitativen Score von 0.

In der akuten Phase wurden insgesamt 4 Schnitte von 4 Mäusen begutachtet. Die Ränder waren klar begrenzt. Wie auch bei den Kontrolltieren konnte die weiße Substanz nicht eindeutig von der grauen Substanz unterschieden werden. Verglichen mit den Kontrolltieren waren deutliche Akkumulationen von DAPI-positiven Zellkernen sichtbar. Diese waren hauptsächlich im Randbereich lokalisiert. Des Weiteren war eine deutliche T-Zellinfiltration zu erkennen. Die CD3⁺-positiven Zellen waren innerhalb des gesamten Rückenmarks auffindbar. Sie traten gehäuft innerhalb bzw. in der Nähe von DAPI-positiven Zellnestern auf. Das Ausmaß der T-Zellinfiltration variierte in der akuten Phase der EAE. In einer Maus (n = 1 Schnitt von n = 1 Tier) konnte eine massive T-Zellinfiltration festgestellt werden. Die T-Zellinfiltration wurde mit einem semiquantitativen Score von 4,0 bewertet. Verglichen dazu zeigten die anderen Tiere der akuten Phase eine geringere T-Zellinfiltration. Der semiquantitative Score dieser Tiere betrug nur noch zwischen 1,0 und 2,0 (n = 3 Schnitte von n = 3 Tieren). In der grauen Substanz waren nur vereinzelt anti-CD3⁺-T-Zellen auffindbar (siehe Abbildung 20).

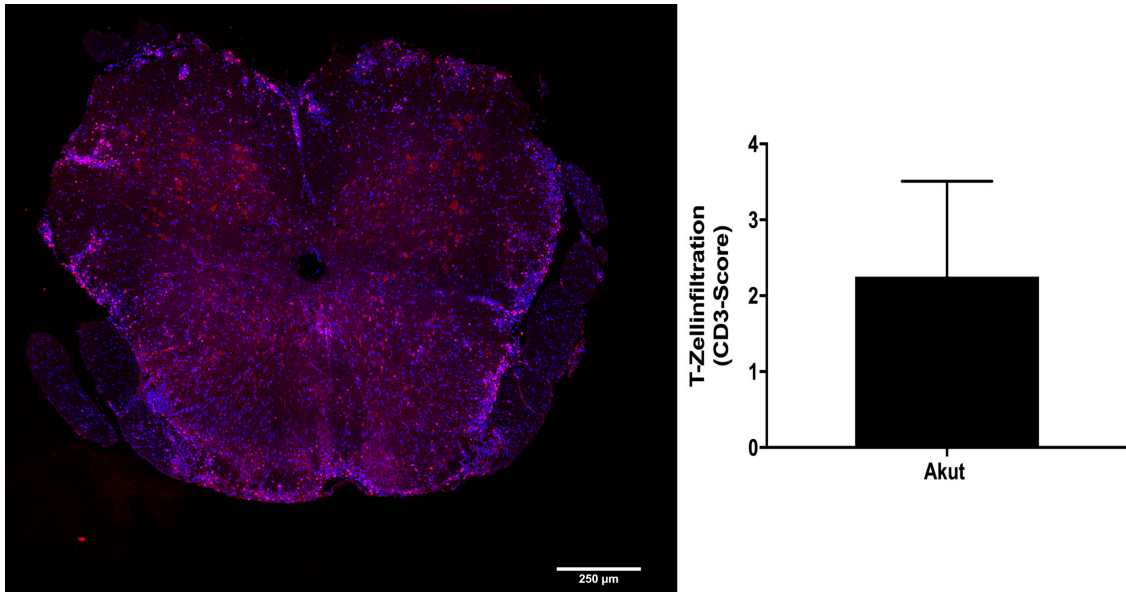


Abbildung 20 T-Zellinfiltration in der akuten Phase der EAE. Links: Abbildung eines erkrankten Rückenmarks in der akuten Phase der EAE. Eine Maus zeigte eine sehr starke T-Zellinfiltration. Die CD3⁺-positiven Zellen waren innerhalb des gesamten Rückenmarks auffindbar. Sie traten gehäuft innerhalb bzw. in der Nähe von DAPI-positiven Zellnestern auf. In den restlichen Tieren der akuten Phase war eine deutlich geringere T-Zellinfiltration feststellbar. Rechts: Die T-Zellinfiltration wurde mit einem durchschnittlichen semiquantitativen Score von 2,25 bewertet.

In der Remissionsphase wurden insgesamt 5 Schnitte von 4 verschiedenen Mäusen auf das Vorhandensein von T-Zellen getestet. Die Rückenmarksränder waren eindeutig begrenzt. Eine Unterscheidung zwischen weißer und grauer Substanz war nicht möglich. Wie auch in der akuten Phase waren T-Zellinfiltrationen sichtbar. Verglichen zur akuten Phase waren jedoch deutlich weniger CD3⁺-positive Zellen zu erkennen. Die deutlich erkennbaren CD3⁺-positiven Zellen zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster wie in der akuten Phase: Sie waren vor allem in der weißen Substanz und innerhalb von Zellnestern auffindbar. In der grauen Substanz waren nur vereinzelt CD3⁺-positive Zellen zu erkennen. Der semiquantitative Score innerhalb dieser Phase wurde bei allen Mäusen (n = 4 Schnitte von n = 4 Tieren) mit einem Score von 1 bewertet (siehe Abbildung 21).

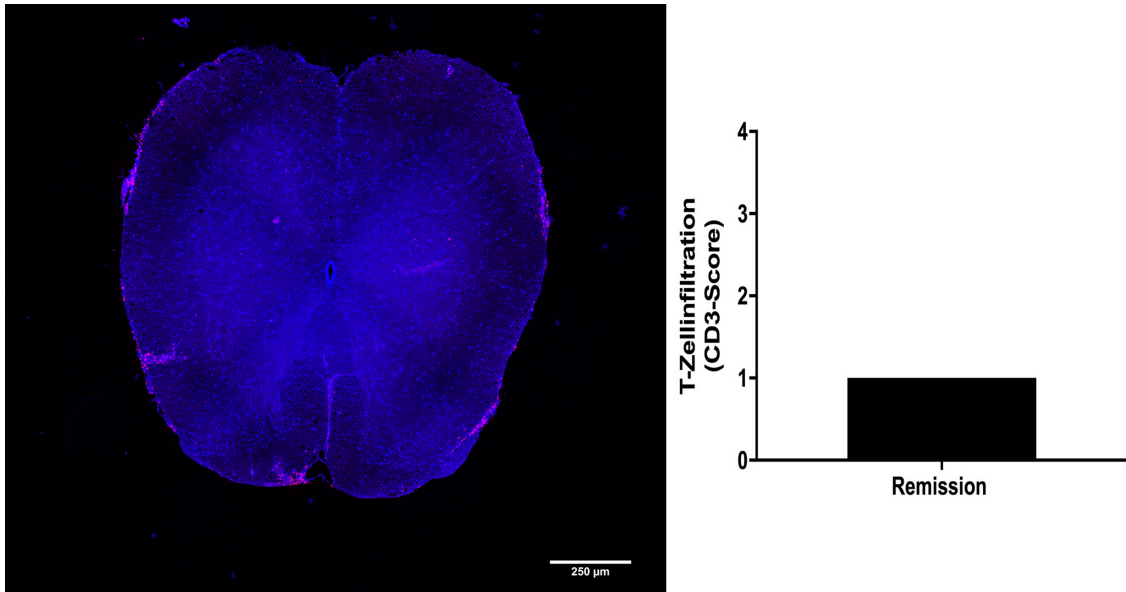


Abbildung 21 T-Zellinfiltration in der Remissionsphase der EAE. Links: Abbildung eines Rückenmarks aus der Remissionsphase. In der Remissionsphase war ein deutlicher Rückgang der CD3⁺-positiven Zellen zu verzeichnen. Die auffindbaren T-Zellen waren hauptsächlich im Randbereich lokalisiert. Rechts: Der durchschnittliche semiquantitative Score betrug 1,0.

In der Schubphase zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der Remissionsphase. Die Ränder waren scharf begrenzt und wurden von DAPI-positiven Zellkernen gebildet. Diese lagen alleine oder in Gruppen angeordnet vor. Im Randbereich waren große Zellnester von DAPI-positiven Zellen erkennbar. Innerhalb des Rückenmarks waren nur noch wenig T-Zellen erkennbar. Diese befanden sich wie auch in den beiden anderen Phasen innerhalb der Zellnester bzw. in näherer Umgebung. In der grauen Substanz waren nur wenige T-Zellen feststellbar. Der semiquantitative Score betrug bei allen erkrankten Tieren 1 (siehe Abbildung 22).

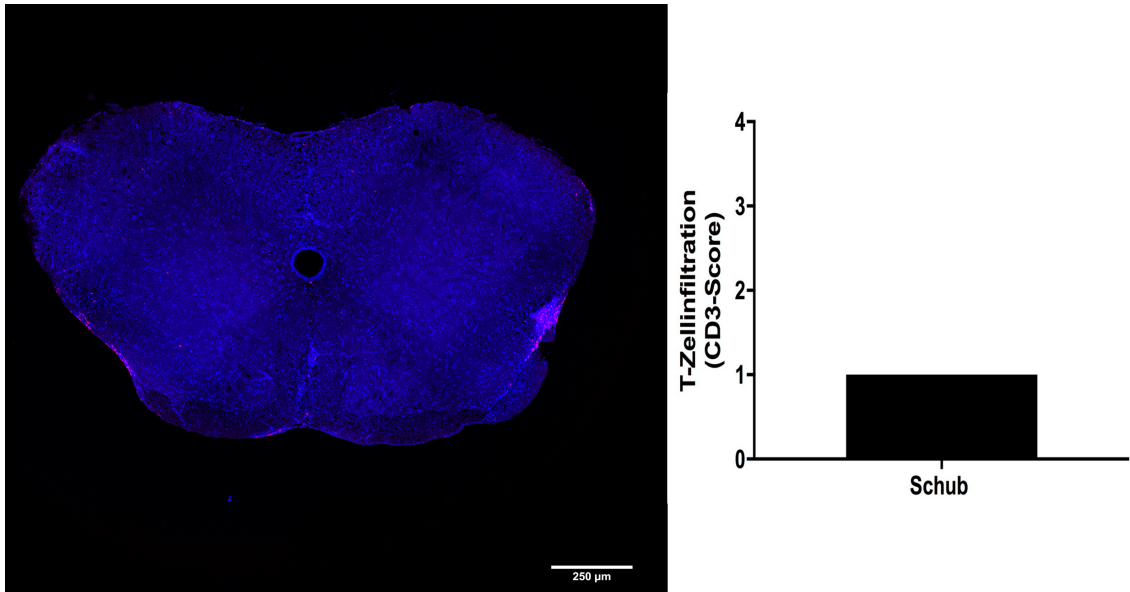


Abbildung 22 T-Zellinfiltration in der Schubphase der EAE. Links: Abbildung eines erkrankten Rückenmarks aus der Schubphase. In der Schubphase waren wie auch in der Remissionsphase nur wenige T-Zellen auffindbar. Das Verteilungsmuster war ähnlich dem der Remissionsphase. Rechts: Innerhalb der Schubphase betrug der durchschnittliche semiquantitative Score 1,0.

3.2 Veränderung der Signalstärke im Krankheitsverlauf der EAE

Im nächsten Schritt wurde die Antikörpersignalstärke für jede Färbung bestimmt, um mit deren Hilfe die subjektiven Eindrücke mittels eines objektiv reproduzierbaren Parameters zu bestätigen. Die Intensitätsmessung erfolgte für jede Färbung über eine Histogrammanalyse mittels ImageJ (siehe Material und Methoden). Des Weiteren wurde bei jeder Färbung zwischen weißer und grauer Substanz unterschieden. Lag aus einer Maus sowohl ein kranialer als auch ein kaudaler Schnitt vor, so wurden die beiden Ergebnisse gemittelt, sodass es pro Färbung und pro Substanz nur ein Ergebnis gab. Im Folgenden werden die Ergebnisse anhand des Medianwertes beschrieben.

3.2.1 Inflammation

Zur Darstellung der Mikroglia/Makrophageninfiltration wurde das Rückenmark immunhistochemisch mittels des Iba1-Antikörpers angefärbt. Die anschließende Intensitätsmessung mittels Histogrammanalyse wurde bei 35 Schnitten aus 21 Mäusen durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde die weiße und graue Substanz miteinander verglichen. Sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz waren Mikrogliazellen/Makrophagen feststellbar. Im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere war kein signifikanter Unterschied zwischen weißer und grauer Substanz feststellbar ($p > 0,5$; Student's T-Test). Wurden die unterschiedlichen Krankheitsstadien der weißen Substanz mit dem zugehörigen Pendant der grauen Substanz verglichen, so war auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen weißer und grauer Substanz zu erkennen (alle p-Werte $> 0,4$; Student's t-Test).

Anschließend wurden die weiße und graue Substanz getrennt voneinander betrachtet. In der weißen Substanz war kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Mäusen und den Kontrolltieren sichtbar ($p > 0,6$; Student's t-Test). Ferner war auch in den unterschiedlichen Krankheitsstadien kein signifikanter Unterschied verglichen mit den Kontrolltieren feststellbar (alle p-Werte $> 0,05$; Student's t-Test). Im nächsten Schritt wurden die Krankheitsstadien untereinander verglichen. In der Remissionsphase war die Iba1-Signalstärke verglichen mit der akuten Phase signifikant erhöht ($p < 0,05$; Student's t-Test). Es war kein signifikanter Unterschied zwischen der akuten Phase und der Schubphase ($p = 0,0507$; Student's t-Test) sowie zwischen der Remissionsphase und der Schubphase ($p > 0,84$; Student's t-Test) ersichtlich (siehe Abbildung 23).

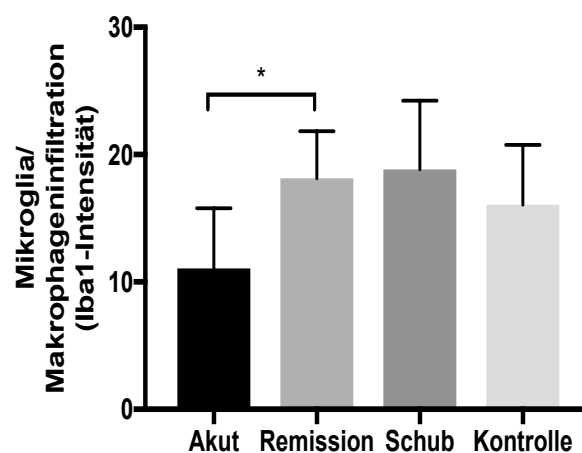


Abbildung 23 Vergleich der Iba1-Fluoreszenzintensitäten in allen Stadien der weißen Substanz. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der akuten Phase und der Remissionsphase. Zwischen der akuten

Phase und der Schubphase war der Unterschied knapp nicht signifikant. In allen Stadien war kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Tieren und den Kontrolltieren erkennbar.

In der grauen Substanz war der Mikroglia/Makrophagengehalt in der akuten Phase signifikant verkleinert im Vergleich zur Kontrolle (12 vs. 19; Mittelwerte, $p < 0,04$; Student's t-Test). Es waren keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den erkrankten Tieren und den Kontrolltieren zu erkennen ($p > 0,4$; Student's t-Test). Der Mikroglia/Makrophagengehalt war in der akuten Phase verglichen mit der Remissionsphase deutlich erhöht ($p < 0,05$; Student's t-Test). Ferner war kein signifikanter Unterschied zwischen akuter Phase und Schubphase sowie zwischen Remissionsphase und Schubphase zu erkennen (alle p -Werte $> 0,1$; Student's t-Test, siehe Abbildung 24).

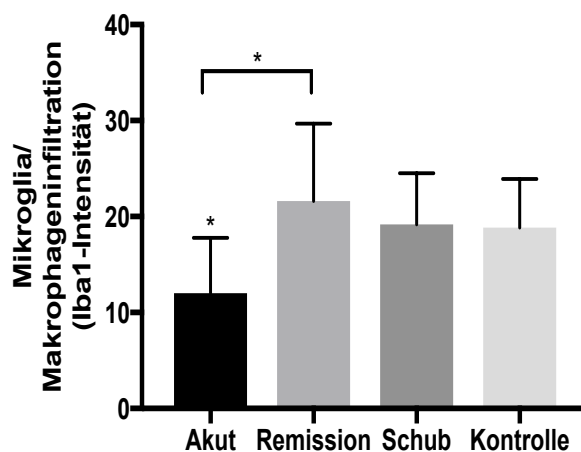


Abbildung 24 Vergleich der Iba1-Fluoreszenzintensitäten in allen drei Stadien der grauen Substanz. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der akuten Phase und der Remissionsphase ($p < 0,01$), sowie zwischen der akuten Phase und der Schubphase. Zwischen der Remissionsphase und der Schubphase bestand kein signifikanter Unterschied. Ferner waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den erkrankten Tieren und den Kontrolltieren zu erkennen.

3.2.2 Demyelinisierung

Im Krankheitsverlauf der EAE war eine immer stärkere Zerstörung der Markscheiden zu erkennen. Diese Zerstörung der Markscheiden hat hauptsächlich die weiße Substanz betroffen.

Als objektivierbares Maß wurde neben dem semiquantitativen Score die Signalstärke des MBP-Antikörpers mittels Histogrammanalyse gemessen. Hierzu wurden insgesamt 34 Schnitte von 21 Mäusen beurteilt, davon

11 Schnitte aus 7 Tieren in der akuten Phase, 7 Schnitte aus 4 Tieren in der Remissionsphase, 4 Schnitte aus 3 Tieren in der Schubphase und 11 Schnitte aus 8 Tieren aus der Kontrollgruppe. Es wurde sowohl für die weiße als auch die graue Substanz die Intensität des Antikörpers gemessen.

Anfangs wurde der Myelingeht der weißen Substanz mit dem der grauen Substanz verglichen. Sowohl in den Kontrolltieren als auch im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere war der Myelingeht in der fast ausschließlich aus myelinisierten Nervenfasern bestehenden weißen Substanz, verglichen mit der aus nur vereinzelt myelinisierten Nervenfasern bestehenden grauen Substanz, signifikant erhöht ($p < 0,0001$; Student's t-Test). In der akuten Phase und Remissionsphase war trotz fortschreitender Entmarkung der Myelingeht verglichen mit dem der grauen Substanz signifikant erhöht ($p < 0,01$; Student's t-Test). In der Schubphase war die Destruktion der Myelinscheiden so weit fortgeschritten, dass kein signifikanter Unterschied zwischen weißer und grauer Substanz mehr nachweisbar war ($p > 0,1$; Student's t-Test, siehe Abbildung 25).

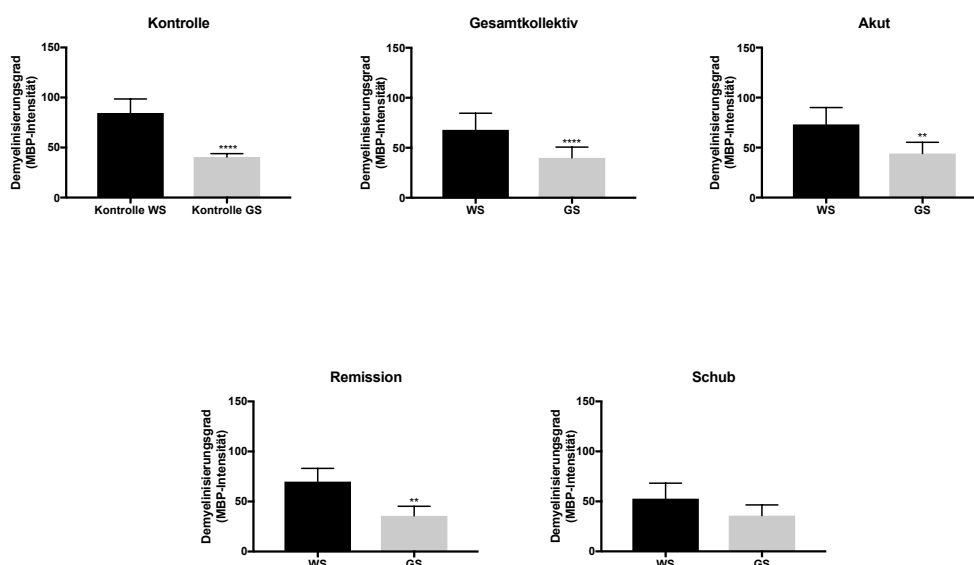


Abbildung 25 Vergleich der MBP-Signalstärken in der weißen Substanz mit der der grauen Substanz. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen weißer und grauer Substanz in den Kontrolltieren, dem Gesamtkollektiv, der akuten und der Remissionsphase. In der Schubphase war die Demyelinisierung so weit fortgeschritten, dass kein signifikanter Unterschied zwischen weißer und grauer Substanz feststellbar war.

In der weißen Substanz der Kontrolltiere waren keine pathologischen Veränderungen auffällig. Die Signalstärke war dementsprechend verglichen mit

den erkrankten Tieren erhöht ($p < 0,05$; Student's t-Test). In der akuten Phase waren erste demyelinisierte Areale sichtbar. Verglichen mit den Kontrolltieren war der Demyelinisierungsgrad zwar durch eine niedrige Signalstärke erkennbar, diese war jedoch noch nicht signifikant ($p > 0,1$; Student's t-Test). Auch in der Remissionsphase war eine nicht signifikante Destruktion der Markscheiden im Vergleich zu den Kontrolltieren auffindbar ($p > 0,1$; Student's t-Test). In der Schubphase war die Destruktion der Markscheiden am stärksten ausgeprägt: In der weißen Substanz waren nur noch vereinzelte myelinisierte Areale auffindbar, die MBP-Signalstärke war verglichen mit den Kontrolltieren signifikant reduziert ($p < 0,5$; Student's t-Test, siehe Abbildung 26). Zwischen den einzelnen Krankheitsstadien waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar ($p > 0,05$; Student's t-Test).

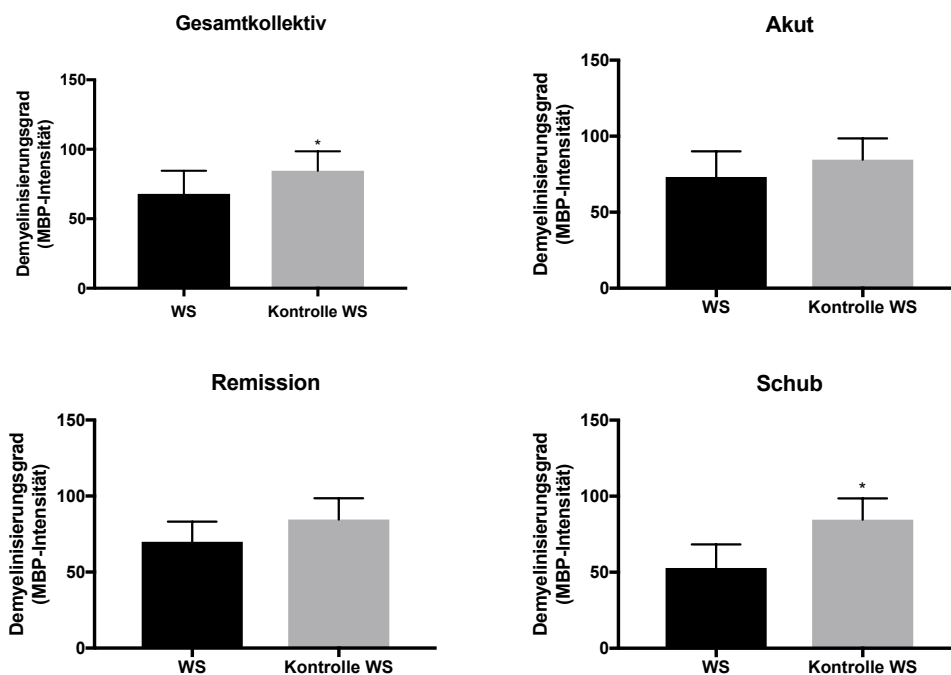


Abbildung 26 Veränderung der MBP-Signalstärke im Krankheitsverlauf der EAE. Das MBP-Signal nahm im Vergleich zu den Kontrollen immer stärker ab. Während im Gesamtkollektiv, der akuten Phase und der Remissionsphase noch keine signifikante Demyelinisierung zu erkennen war, war in der Schubphase ein signifikanter Unterschied verglichen mit den Kontrollen feststellbar.

In der grauen Substanz waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den erkrankten Tieren und den Kontrolltieren ersichtlich. Dies galt sowohl für die Gesamtheit der erkrankten Tiere als auch für die einzelnen Krankheitsstadien.

Des Weiteren waren keine Differenzen zwischen den einzelnen Krankheitsstadien untereinander nachweisbar.

3.2.3 Astrogliose

Ein weiteres typisches histopathologisches Kennzeichen der MS ist die Astrogliose und Bildung der Glianarbe. Astrozyten werden durch die ins ZNS eindringenden pathogenen T-Zellen aktiviert. Infolgedessen kommt es zur verstärkten Expression von GFAP. Die Stärke der GFAP-Expression konnte mittels der Histogrammanalyse gemessen und analysiert werden. Dazu wurden 29 Schnitte aus 21 Tieren verwendet.

In der akuten Phase wurden insgesamt 9 Schnitte aus 7 Tieren, in der Remissionsphase 8 Schnitte aus 4 Tieren und in der Schubphase 3 Schnitte aus 2 Tieren analysiert. Die Kontrollgruppe bestand aus 9 Schnitten von 7 Tieren.

Im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere bestand ein sichtbarer Unterschied zwischen weißer Substanz und grauer Substanz ($p = 0,0527$; Student's t-Test). Die GFAP-Signalstärke war in der weißen Substanz mit 11,35 (Mittelwert) verglichen mit 8,5 (Mittelwert) in der grauen Substanz deutlich erhöht (siehe Abbildung 27).

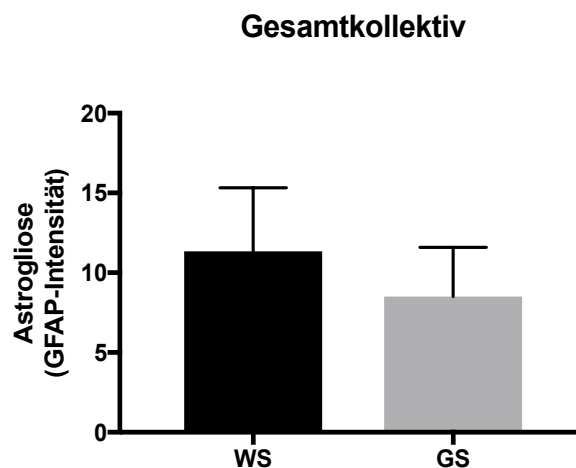


Abbildung 27 Vergleich der GFAP-Fluoreszenzintensitäten zwischen weißer und grauer Substanz.

Das Ausmaß der Astrogliose im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere war in der weißen Substanz deutlich erhöht. Dieser Unterschied ist jedoch knapp nicht signifikant ($p = 0,0527$).

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Krankheitsstadien der weißen Substanz mit dem jeweiligen Pendant der grauen Substanz verglichen: Zwischen

weißer und grauer Substanz waren keine signifikanten Unterschiede innerhalb der unterschiedlichen Krankheitsstadien zu erkennen (alle p -Werte $> 0,2$; Student's t-Test, Mann-Whitney-U-Test).

Anschließend wurden die weiße und graue Substanz getrennt voneinander betrachtet. In der weißen Substanz war im Stadium der akuten Phase ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren feststellbar ($p < 0,02$; Mann-Whitney-U-Test): Die Kontrolltiere zeigten ein stärkeres GFAP-Signal verglichen mit den erkrankten Tieren (15 vs. 9, median). In den beiden anderen Stadien war kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Tieren und den Kontrolltieren feststellbar ($p > 0,9$; Mann-Whitney-U-Test, siehe Abbildung 28). Des Weiteren war kein relevanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Stadien ersichtlich (alle p -Werte $> 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

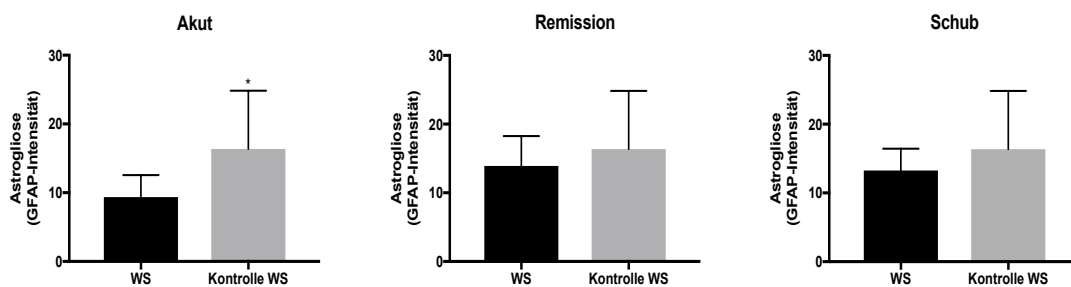


Abbildung 28 Vergleich der GFAP-Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Stadien mit den Kontrollen in der weißen Substanz. In der akuten Phase bestand ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0,02$). In den anderen Krankheitsstadien war kein signifikanter Unterschied verglichen mit den Kontrollen feststellbar.

In der grauen Substanz wurden analog zur weißen Substanz die gleichen Kriterien miteinander verglichen. Es war kein nennenswerter Unterschied zwischen den erkrankten Tieren und den Kontrolltieren zu erkennen ($p > 0,5$, $p > 0,4$, $p > 0,2$; Mann-Whitney U-Test). Des Weiteren unterschied sich das GFAP-Signal nicht signifikant zwischen den einzelnen Krankheitsstadien (alle p -Werte $> 0,1$; Student's t-Test, Mann-Whitney-U-Test).

3.3 Veränderung der Zelldichte im Krankheitsverlauf der EAE

Die Zelldichte ist ein weiterer wichtiger histologischer Parameter, der mit den mechanischen Veränderungen des ZNS bei MS zusammenhängen könnte. Aus

diesem Grund wurde die Veränderung der Zelldichte im Krankheitsverlauf der EAE untersucht.

Die Zelldichte wurde für jedes Bild und jede Substanz individuell bestimmt. Dies erfolgte halbautomatisch durch Festlegung eines für jede Substanz individuellen Schwellenwertes mittels ImageJ (siehe Material und Methoden). In einem Mausschnitt konnten so für jede immunhistologische Färbung sowohl eine Zelldichte für die weiße als auch eine für die graue Substanz bestimmt werden. Die einzelnen Ergebnisse wurden anschließend gemittelt, sodass pro Schnitt jeweils ein Wert für die weiße und die graue Substanz vorlag. Lag aus einer Maus sowohl ein kranialer als auch ein kaudaler Schnitt vor, so wurden die beiden Ergebnisse gemittelt, um pro Maus und Substanz nur ein Ergebnis zu haben. Im ersten Schritt wurde untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied bzgl. der Zelldichte in der weißen Substanz im Vergleich zur grauen Substanz gibt: Im Ergebnis unterschied sich die Zelldichte nicht signifikant zwischen den beiden Substanzen ($p > 0,5$; Student's t-Test). Ferner war kein signifikanter Unterschied der Zelldichte zwischen den jeweiligen korrespondierenden Krankheitsstadien der weißen und grauen Substanz feststellbar (alle p-Werte $> 0,6$; Student's t-Test, Mann-Whitney-U-Test, siehe Abbildung 29).

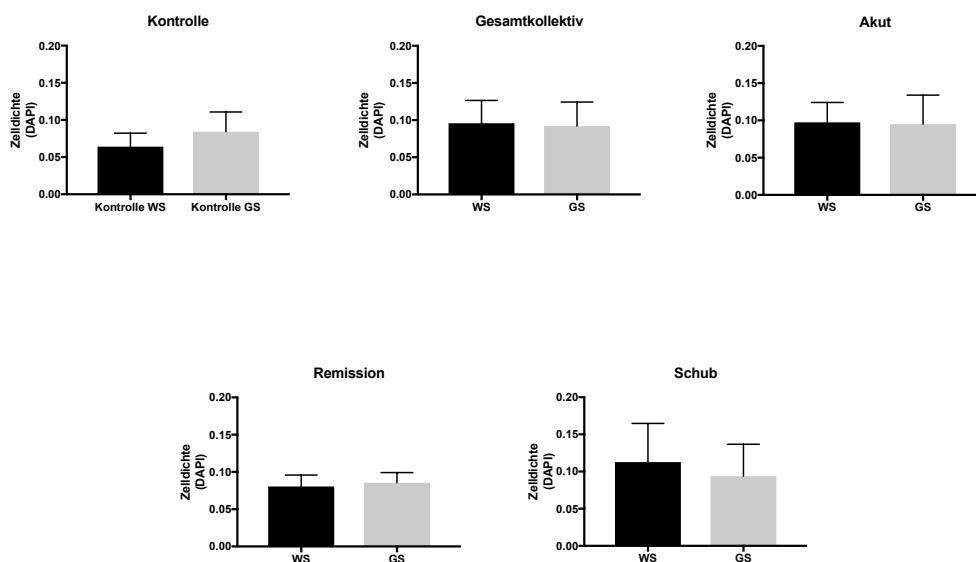


Abbildung 29 Vergleich der Zelldichte zwischen weißer Substanz und grauer Substanz. Sowohl in den Kontrolltieren, dem Gesamtkollektiv als auch in den unterschiedlichen Krankheitsphasen war kein signifikanter Unterschied zwischen weißer Substanz und grauer Substanz zu erkennen (alle p-Werte $> 0,6$).

Anschließend wurden die weiße und graue Substanz getrennt voneinander beurteilt. In der weißen Substanz zeigten die erkrankten Mäuse (n = 14 Schnitte von n = 14 Tieren) eine signifikant höhere Zelldichte verglichen mit den Kontrolltieren (n = 7 Schnitte von n = 7 Tiere; $p < 0,05$; Student's t-Test). Die Zelldichte der erkrankten Mäuse war bis zu 30 % vergrößert verglichen mit den Kontrolltieren (Mittelwert 9,6 % vs. 6,4 %). Sowohl in der akuten Phase als auch in der Schubphase war ein signifikanter Anstieg der Zelldichte verglichen mit den Kontrolltieren zu verzeichnen ($p < 0,02$ und $p < 0,05$; Student's t-Test). In der Remissionsphase unterschied sich die Zelldichte der erkrankten Tiere nicht von der der Kontrolltiere ($p > 0,1$; Student's t-Test, siehe Abbildung 30).

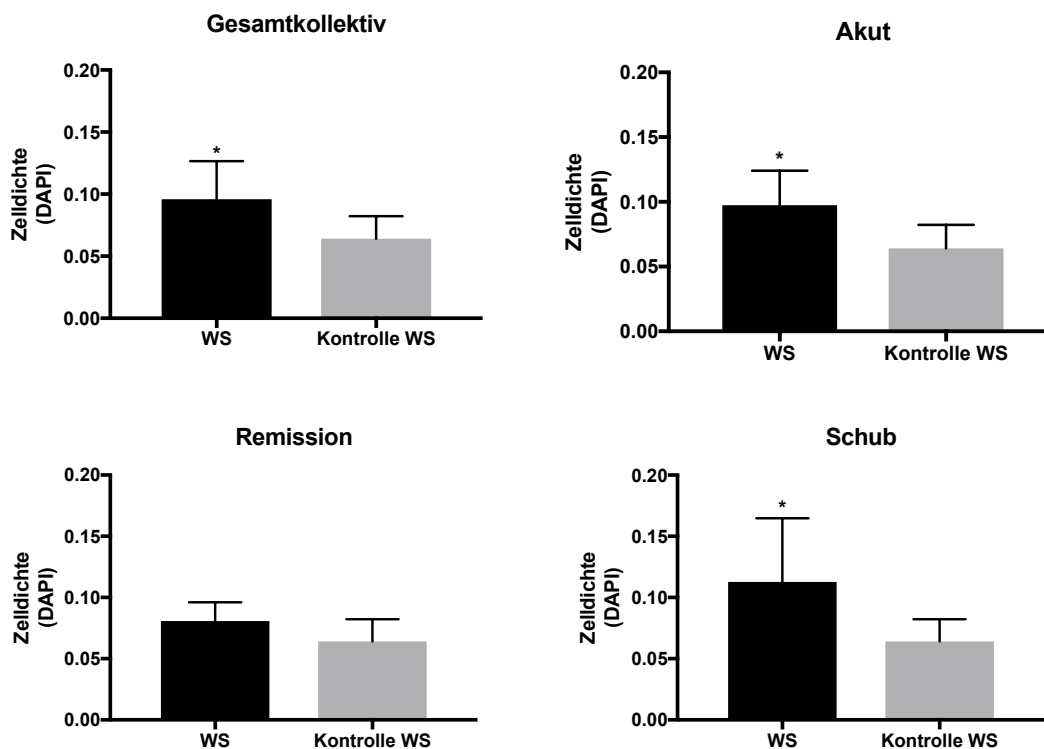


Abbildung 30 Vergleich der Zelldichte im Krankheitsverlauf der EAE mit der der Kontrolltiere. Im Gesamtkollektiv, in der akuten Phase und in der Schubphase war ein signifikanter Unterschied verglichen mit den Kontrolltieren erkennbar (alle p-Werte $< 0,05$). In der Remissionsphase war der Unterschied zwischen der Zelldichte der erkrankten Tiere und der der gesunden Tiere nicht signifikant.

Zwischen den einzelnen Krankheitsstadien war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zelldichte erkennbar (alle p-Werte $> 0,2$; Student's t-Test).

In der grauen Substanz konnte kein signifikanter Unterschied zwischen erkrankten Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden ($p > 0,6$; Mann-Whitney-

U-Test). Auch in den unterschiedlichen Krankheitsphasen war kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Tieren und den Kontrolltieren zu erkennen. Zwischen den einzelnen Krankheitsstadien war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zelldichte ersichtlich (alle p-Werte > 0,5; Student's t-Test).

3.4 Mechanische Eigenschaften und histologische Strukturen bei gesunden Tieren

Den erkrankten Tieren stand eine Kontrollgruppe bestehend aus 7 Tieren gegenüber. Die Experimente wurden analog zum Protokoll der erkrankten Tiere durchgeführt. Der EAE-Score der Kontrolltiere betrug 0, genauso wie der semiquantitative Score. Anfänglich wurde untersucht, ob es Zusammenhänge zwischen den histologischen Parametern und der Zelldichte innerhalb der Kontrollgruppe gab. Da der semiquantitative Score der Kontrolltiere mit 0 bewertet wurde, wurde die Intensitätsmessung mit der Zelldichte und der Steifheit korreliert. Zwischen der Mikroglia/Makrophageninfiltration (Iba1-Signal), der lokalen Myelinisierung (MBP-Signal) und der Zelldichte bestand in der weißen Substanz ein negativer nicht signifikanter Zusammenhang (alle p-Werte > 0,05; Pearson-Korrelation, Spearman-Korrelation). Mit zunehmender Zelldichte sank die Anzahl der eingewanderten Mikrogliazellen/Makrophagen ($r = -0,84$; Pearson-Korrelation) und das Ausmaß der Myelinisierung ($r = -0,46$; Pearson-Korrelation). Zwischen der Zelldichte und der GFAP-Fluoreszenzsignalstärke (GFAP-Signal) war ein schwacher positiver Zusammenhang zu erkennen ($r = 0,13$; Spearman-Korrelation). Im zweiten Schritt wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den histologischen Strukturen und den mechanischen Eigenschaften des gesunden Rückenmarks gab. Die Steifheit korrelierte positiv mit dem lokalen Maß der Myelinisierung ($r = 0,38$; Pearson-Korrelation) und der GFAP-Fluoreszenzintensität ($r = 0,25$; Spearman-Korrelation). Diese Zusammenhänge waren jedoch nicht signifikant (alle p-Werte > 0,05). Zwischen der Steifheit und der Mikroglia/Makrophageninfiltration war eine schwache negative Korrelation zu erkennen ($r = -0,18$; Pearson-Korrelation), wie auch bei den anderen Parametern war diese jedoch nicht signifikant. Die Steifheit und die Zelldichte standen in

einem schwachen, nicht signifikanten Zusammenhang ($r = 0,14$; $p > 0,05$; Pearson-Korrelation).

In der grauen Substanz waren wie in der weißen Substanz keine signifikanten Zusammenhänge zu erkennen (alle p -Werte $> 0,05$). Zwischen der Iba1-Signalstärke und der Zelldichte bestand ein negativer nicht signifikanter Zusammenhang ($r = -0,45$; $p > 0,05$; Spearman-Korrelation). Das lokale Maß der myelinisierten Areale ($r = 0,2$; Spearman-Korrelation) und die GFAP-Fluoreszenzintensität ($r = 0,25$; Spearman-Korrelation) wiesen ebenfalls einen nicht signifikanten Zusammenhang mit der Zelldichte auf. Je höher das MBP-Signal, d. h. je höher der Myelinisierungsgrad, desto steifer war das Gewebe ($r = 0,88$, $p > 0,05$; Pearson-Korrelation). Die Steifheit korrelierte auch positiv mit der GFAP-Fluoreszenzintensität ($r = 0,56$, $p > 0,05$; Spearman-Korrelation) und der Mikroglia/Makrophageninfiltration ($r = 0,52$; $p > 0,05$; Pearson-Korrelation). Des Weiteren korrelierte die Zelldichte mit der Steifheit ($r = 0,54$; $p > 0,05$; Spearman-Korrelation).

3.5 Zusammenhänge zwischen den histologischen Parametern

Im Krankheitsverlauf der EAE konnten unterschiedliche Grade der Mikroglia/Makrophageninfiltration (Iba1), Demyelinisierung (MBP), Astrogliose (GFAP) und Veränderungen der Zelldichte (DAPI) festgestellt werden (siehe Abbildung 31).

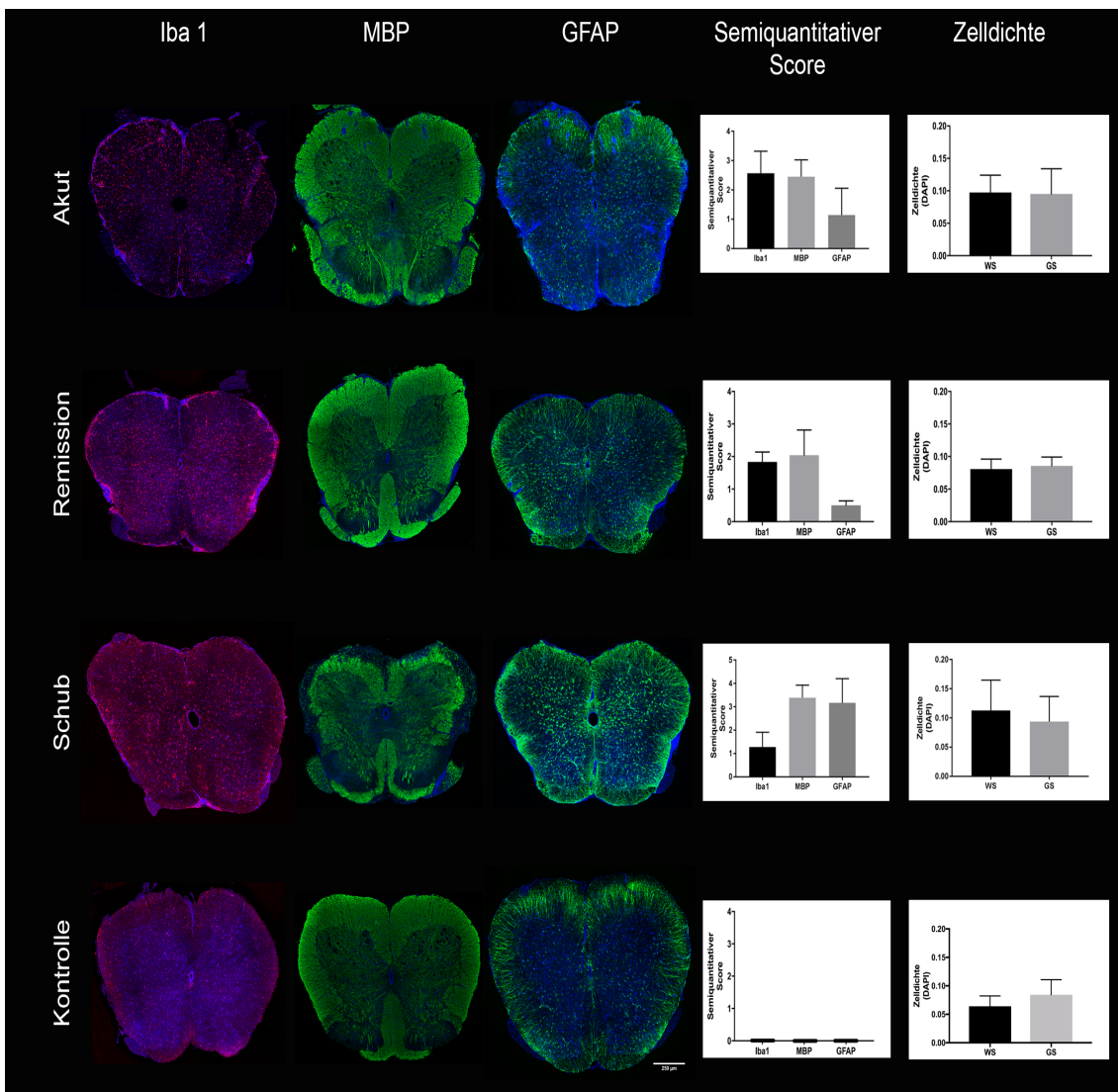


Abbildung 31 Veränderungen der histologischen Parameter (Mikroglia/Makrophageninfiltration (Iba1, rot), Demyelinisierungsgrad (MBP, grün), Astroglie (GFAP, grün) und Zelldichte (DAPI, blau)) in den unterschiedlichen Stadien der EAE (Akut, Remission, Schub, Kontrolle). Im Krankheitsverlauf der EAE kommt es zu einer Reduktion der Mikroglia/Makrophageninfiltration. Das Ausmaß der Demyelinisierung sowie die Astroglie nehmen im Krankheitsverlauf der EAE deutlich zu. In der Schubphase war sowohl das Ausmaß der Demyelinisierung als auch der Astroglie am stärksten ausgeprägt. Die Zelldichte nimmt im Vergleich zu der der Kontrolltiere um bis zu 30 % zu. Maßstab 250 µm.

Infolgedessen wurde im nächsten Schritt untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den histologischen Parametern untereinander gab. Der semiquantitative Score bezog sich auf die ventrale Hälfte des Rückenmarks, zwischen weißer Substanz und grauer Substanz wurde nicht unterschieden. Ebenso wie bei den beiden anderen Messungen wurde der gleiche

semiquantitative Score sowohl für die weiße als auch für die graue Substanz verwendet.

Anfangs wurde analysiert, ob im Allgemeinen ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Parametern (Zelldichte, Mikroglia/Makrophageninfiltration, Demyelinisierung, Astrogliose) bestand. Dazu wurden alle Daten, d. h. Kontrolltiere und erkrankte Tiere, zu einer Gruppe zusammengefasst, die in den folgenden Kapiteln als Gesamtkollektiv aller Tiere bezeichnet wird. Im Gesamtkollektiv aller Tiere bestand in der weißen Substanz ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der Mikroglia/Makrophageninfiltration ($r = 0,61$, $p < 0,004$; Spearman-Korrelation), der Zelldichte und dem Ausmaß der Demyelinisierung ($r = 0,59$, $p < 0,01$; Spearman-Korrelation) sowie zwischen der Zelldichte und der Astrogliose ($r = 0,75$, $p < 0,0001$; Spearman-Korrelation, siehe Abbildung 32).

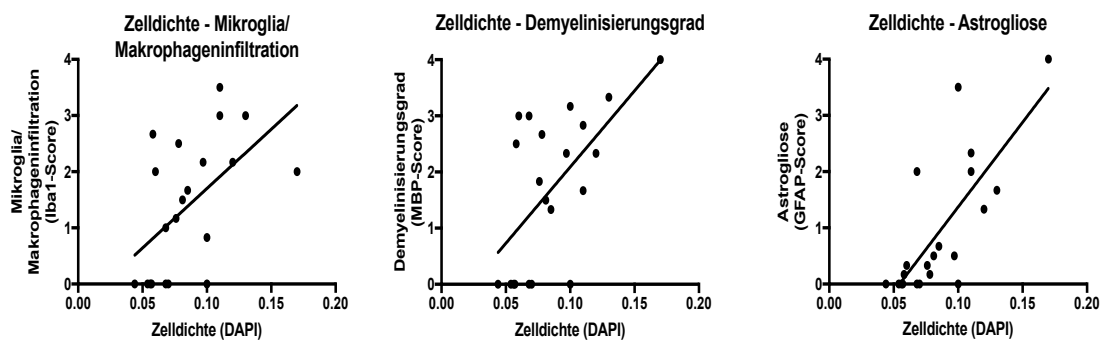


Abbildung 32 Linearer Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der Mikroglia/Makrophageninfiltration (links), dem Ausmaß der Demyelinisierung (Mitte) sowie der Astrogliose (rechts). Im Gesamtkollektiv stiegen sowohl die Mikroglia/Makrophageninfiltration, das Ausmaß der Demyelinisierung als auch die Astrogliose signifikant mit zunehmender Zelldichte.

Ferner bestand ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen der Zelldichte und dem Ausmaß der Astrogliose im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere ($r = 0,72$, $p < 0,01$; Spearman-Korrelation, siehe Abbildung 33). Zwischen den beiden anderen erhobenen histologischen Parametern (MBP ($r = 0,45$), Iba1 ($r = 0,33$)) und der Zelldichte bestand ein linearer nicht signifikanter Zusammenhang im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (alle p -Werte $> 0,1$; Pearson-Korrelation).

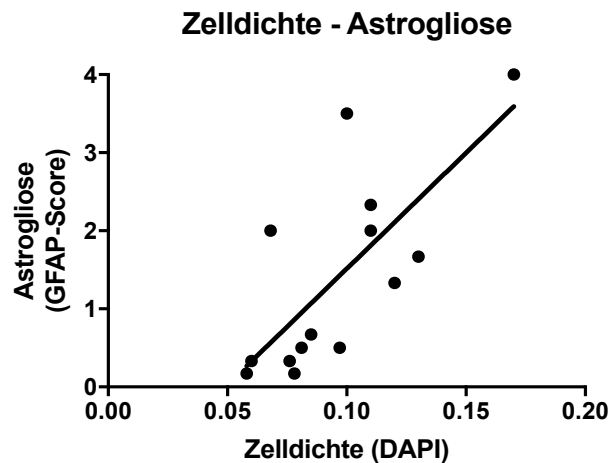


Abbildung 33 Linearer Zusammenhang zwischen der Zelldichte und dem Ausmaß der Astrogliose im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere. Je höher die Zelldichte, desto stärker war die GFAP-Expression in den aktiven Läsionen zu verzeichnen ($p < 0,01$).

In der grauen Substanz stieg der Mikroglia/Makrophagengehalt mit zunehmender Zelldichte im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere ($r = 0,55$, $p < 0,05$; Pearson-Korrelation). Zwischen dem Demyelinisierungsgrad, der Astrogliose und der Zelldichte war sowohl im Gesamtkollektiv aller Tiere als auch im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere kein signifikanter Zusammenhang feststellbar.

In der akuten Phase bestand in der weißen ($r = 0,82$) und grauen Substanz ($r = 0,79$) ein nennenswerter linearer Zusammenhang zwischen der Zelldichte und dem Ausmaß der Astrogliose ($p < 0,05$; Pearson-Korrelation, siehe Abbildung 34).

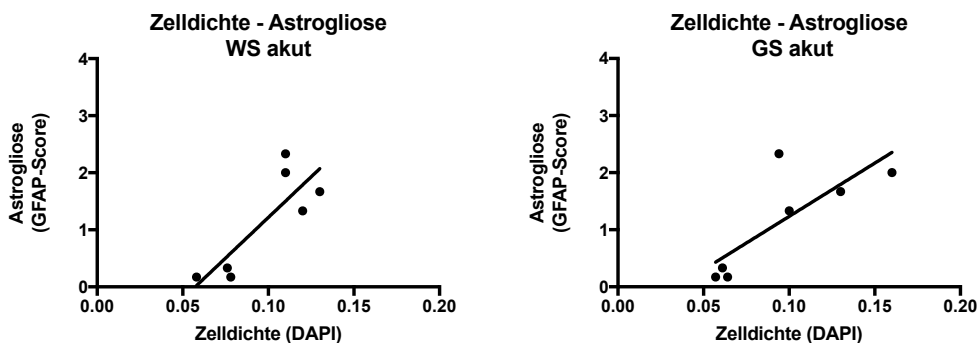


Abbildung 34 Korrelation zwischen der Zelldichte und der Astrogliose in der akuten Phase in der weißen Substanz und grauen Substanz. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Zelldichte und der GFAP-Expression in der akuten Phase (alle p -Werte $< 0,05$).

In den beiden anderen Phasen war ebenfalls ein linearer Zusammenhang erkennbar. Dieser war jedoch nicht signifikant (alle p-Werte > 0,05; Pearson-Korrelation, Spearman-Korrelation). Auch zwischen der Zelldichte und der Mikroglia/Makrophageninfiltration war in der akuten Phase der weißen (r = 0,41) und grauen Substanz (r = 0,69) ein nicht signifikanter Zusammenhang nachweisbar (alle p-Werte > 0,05; Pearson-Korrelation). Dieser Zusammenhang bestand auch in der Schubphase der weißen (r = 0,90) und der grauen Substanz (r = 0,87; alle p-Werte > 0,05; Pearson-Korrelation). In der Remissionsphase war kein Zusammenhang feststellbar.

Wie die Mikroglia/Makrophageninfiltration stand auch der Demyelinisierungsgrad in einem linearen, nicht signifikanten Zusammenhang mit der Zelldichte. Während in der akuten Phase sowohl in der weißen (r = 0,3; Pearson-Korrelation) als auch in der grauen Substanz (r = 0,5; Pearson-Korrelation) eine positive nicht signifikante Korrelation ersichtlich war, war in der Remissionsphase ein negativer Zusammenhang in der weißen (r = -0,51; Pearson-Korrelation) und grauen Substanz (r = -0,44; Pearson-Korrelation) erkennbar. In der Schubphase stieg das Ausmaß der Demyelinisierung mit zunehmender Zelldichte in der weißen Substanz (r = 0,98, p < 0,1; Pearson-Korrelation).

Anschließend wurden die Signalstärken der jeweiligen Färbungen mit der Zelldichte verglichen. In der weißen Substanz im Gesamtkollektiv aller Tiere korrelierte die Mikroglia/Makrophageninfiltration negativ mit der Zelldichte (r = -0,57; p < 0,01; Pearson-Korrelation). Ferner kam es mit zunehmender Zelldichte zur signifikanten Reduktion der MBP-Fluoreszenzintensität, was Ausdruck einer verstärkten Destruktion der Markscheiden war (r = -0,44, p < 0,05; Pearson-Korrelation). Zwischen der Astrogliose und der Zelldichte bestand kein nennenswerter Zusammenhang im Gesamtkollektiv aller Tiere.

Im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere bestand in der weißen Substanz ein linearer Zusammenhang zwischen der Iba1-Signalstärke (r = -0,533, p < 0,05; Pearson-Korrelation) und der Zelldichte. Diese war jedoch anders als beim semiquantitativen Score negativ (siehe Abbildung 35).

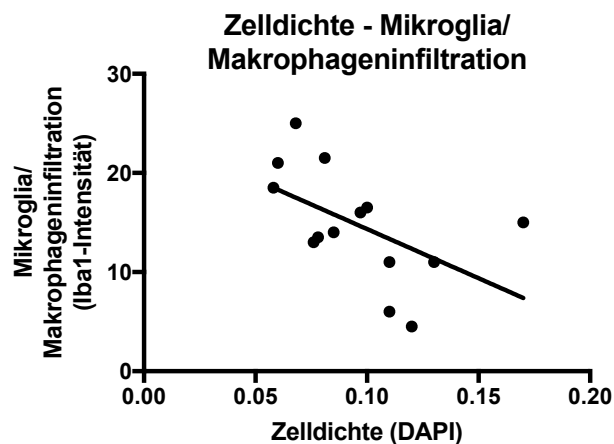


Abbildung 35 Korrelation zwischen der Zelldichte und der Mikroglia/Makrophageninfiltration im Gesamtkollektiv in der weißen Substanz. Mit zunehmender Zelldichte sank der Mikroglia/Makrophagengehalt ($p < 0,05$) im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere der weißen Substanz.

Zwischen der MBP-Signalstärke und der Zelldichte war eine schwache, nicht signifikante Korrelation zu erkennen ($r = -0,234$, $p > 0,4$; Pearson-Korrelation). Es bestand keine Korrelation zwischen der GFAP-Signalstärke und der Zelldichte ($r = 0,03$, $p > 0,9$; Pearson-Korrelation).

In der grauen Substanz korrelierte im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere die Iba1-Signalstärke negativ mit der Zelldichte ($r = -0,55$, $p < 0,1$; Pearson-Korrelation). Es waren keine weiteren signifikanten Zusammenhänge zwischen den histologischen Parametern und der Zelldichte zu erkennen (alle p -Werte $> 0,05$).

Des Weiteren korrelierte die Iba1-Signalstärke in der weißen Substanz der akuten Phase negativ mit der Zelldichte ($r = -0,789$, $p < 0,05$; Pearson-Korrelation). Es waren innerhalb der unterschiedlichen Phasen keine weiteren signifikanten Korrelationen mit der Zelldichte nachweisbar.

Im letzten Schritt wurde der semiquantitative Score mit der Antikörper-Intensität korreliert. Im Gesamtkollektiv aller Tiere waren keine linearen Zusammenhänge zwischen dem semiquantitativen Score und den Fluoreszenzintensitäten zu erkennen. Dies galt sowohl für die weiße als auch für die graue Substanz.

In der weißen Substanz bestand ein negativer signifikanter Zusammenhang zwischen dem semiquantitativen Score von Iba1 und der Signalstärke im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere ($r = -0,58$, $p > 0,05$; Pearson-Korrelation).

In der grauen Substanz war ebenfalls ein Zusammenhang erkennbar, jedoch war

dieser nicht signifikant und positiv ($r = 0,53$, $p = 0,05$; Pearson-Korrelation). Der semiquantitative Score von MBP korrelierte in der weißen Substanz nicht mit der MBP-Signalstärke. Zwischen dem semiquantitativen Score von GFAP und der GFAP-Fluoreszenzintensität konnte ebenfalls kein Zusammenhang festgestellt werden.

In der weißen Substanz bestand in keinem Krankheitsstadium ein nennenswerter Zusammenhang zwischen dem semiquantitativen Score von Iba1 und der Iba1-Signalstärke (alle p -Werte $> 0,05$; Pearson-Korrelation). Dies galt auch für die graue Substanz.

Der semiquantitative Score von MBP und die MBP-Signalstärke standen sowohl in der weißen als auch der grauen Substanz in allen Krankheitsstadien in einem linearen Zusammenhang. Der einzige signifikante Zusammenhang bestand jedoch nur in der akuten Phase der grauen Substanz ($r = 0,79$, $p < 0,05$; Pearson-Korrelation). Es waren keine weiteren signifikanten Zusammenhänge zu beobachten (alle p -Werte $> 0,05$; Pearson-Korrelation).

Zwischen dem semiquantitativen Score von GFAP und der GFAP-Signalstärke bestand in der akuten Phase der weißen Substanz und der Remissionsphase beider Substanzen ein positiver, nicht signifikanter Zusammenhang (alle p -Werte $> 0,05$; Pearson-Korrelation, Spearman-Korrelation).

3.6 Mechanische Veränderungen und histologische Veränderungen bei erkrankten Tieren

Um herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen den histologischen Veränderungen und den mechanischen Veränderungen des Rückenmarks bestand, wurden die immunhistochemischen Bilder mit den mittels AFM gemessenen und erstellten Steifheitskarten kombiniert. Analog der Vorgehensweise für die histologischen Parameter wurden die weiße und graue Substanz getrennt voneinander gemessen. Lagen aus einer Maus sowohl ein kranialer als auch ein kaudaler Schnitt vor, so wurden die einzelnen Steifheitswerte miteinander gemittelt, sodass pro Maus nur ein Steifheitswert pro Substanz vorlag. Die mechanischen Eigenschaften wurden im Rahmen der Dissertation von Dr. med. David E. Koser erhoben ¹⁵⁶.

Im gesunden Rückenmark (n = 10 Schnitte von n = 7 Tieren) war die graue Substanz signifikant steifer als die weiße Substanz (p < 0,0001; Student's t-Test). In der grauen Substanz betrug die durchschnittliche mediane Steifheit K = 153 ± 15 Pa verglichen mit K = 60 ± 5 Pa in der weißen Substanz (Student's t-Test).

In den erkrankten Tieren nahm die Steifheit sowohl in der weißen Substanz als auch in der grauen Substanz zu. Wie auch in den gesunden Tieren war die graue Substanz (n = 23 Schnitte aus n = 14 Tieren) signifikant steifer als die weiße Substanz (n = 23 Schnitte aus n = 14 Tieren, p < 0,0001; Student's t-Test). Der durchschnittliche mediane Steifheitswert betrug nun in der weißen Substanz K = 74 ± 8 Pa und in der grauen Substanz K = 166 ± 12 Pa. In allen Krankheitsstadien war die weiße Substanz signifikant weicher als die graue Substanz (alle p < 0,01; Student's t-Test, Mann-Whitney-U-Test, siehe Abbildung 36).

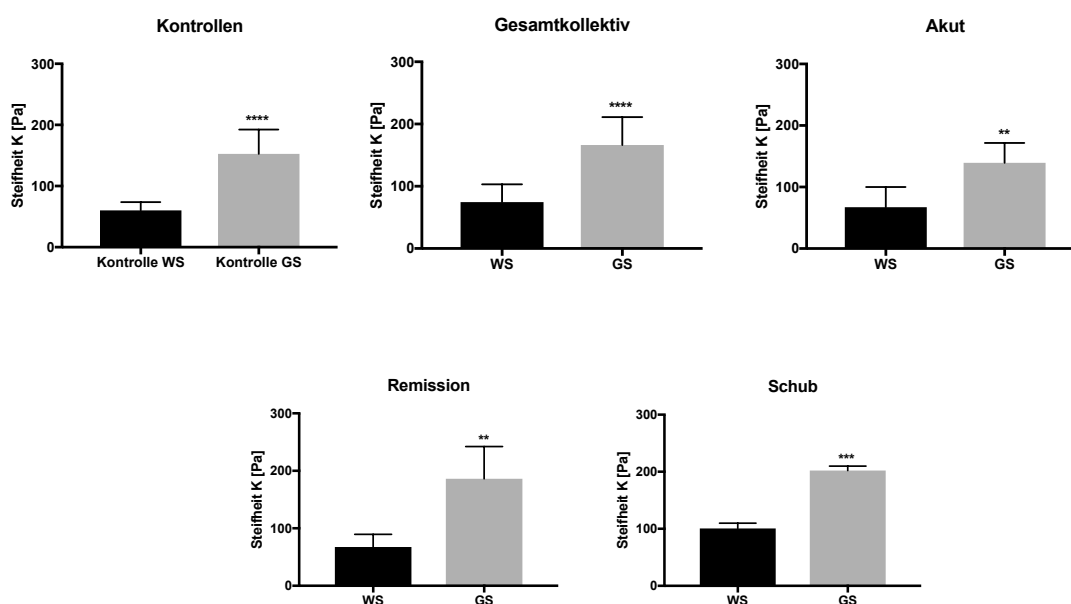


Abbildung 36 Vergleich der Steifheit zwischen weißer Substanz und grauer Substanz. Die graue Substanz war in allen Gruppen signifikant steifer als die weiße Substanz (alle p-Werte < 0,05). Die mediane Steifheit in den gesunden Tieren betrug in der grauen Substanz K = 153 ± 15 Pa verglichen mit K = 60 ± 5 Pa in der weißen Substanz. Das Rückenmark der erkrankten Tiere war signifikant steifer als das Rückenmark der gesunden Tiere. Die mediane Steifheit in der weißen Substanz betrug K = 74 ± 8 Pa und in der grauen Substanz K = 166 ± 12 Pa.

3.6.1 Zusammenhang zwischen Steifheit und semiquantitivem Score beziehungsweise Intensität

Zunächst wurde der semiquantitative Score mit der Steifheit verglichen. Wie bereits oben erwähnt, wurde der gleiche semiquantitative Score sowohl für die weiße Substanz als auch für die graue Substanz verwendet.

Im ersten Schritt wurde analysiert, ob im Allgemeinen ein Zusammenhang zwischen der Steifheit und den histologischen Parametern (Mikroglia/Makrophageninfiltration, Demyelinisierung, Astrogliose) bestand. Im Gesamtkollektiv aller Tiere beeinflusste die Steifheit die Astrogliose in der weißen Substanz positiv. Die GFAP-Expression stieg mit zunehmender Gewebesteifheit ($r = 0,55$, $p < 0,02$; Spearman-Korrelation, siehe Abbildung 37). Im Gegensatz dazu konnte kein linearer Zusammenhang zwischen der Mikroglia/Makrophageninfiltration und den mechanischen Gewebeeigenschaften sowie dem Ausmaß der Demyelinisierung und der Steifheit festgestellt werden.

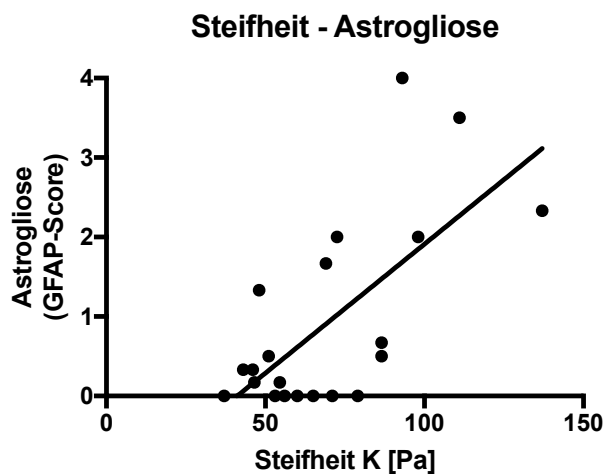


Abbildung 37 Linearer Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Astrogliose im Gesamtkollektiv aller Tiere. Mit zunehmender Steifheit erhöhte sich die GFAP-Expression signifikant.

Wie auch im Gesamtkollektiv aller Tiere bestand im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere in der weißen Substanz ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Steifheit und dem Ausmaß der GFAP-Expression ($r = 0,79$, $p < 0,005$; Spearman-Korrelation). Je steifer das Gewebe, desto größer war der semiquantitative Score für die Astrozyten innerhalb der weißen Substanz (siehe Abbildung 38).

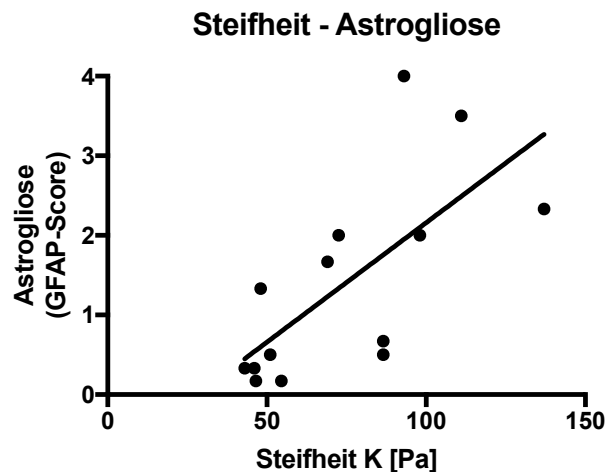


Abbildung 38 Korrelation zwischen der Steifheit und der Astrogliose in der weißen Substanz. Je steifer das Gewebe, desto stärker war die GFAP-Expression innerhalb der weißen Substanz ($r = 0,79$, $p < 0,005$; Spearmann-Korrelation).

Sowohl die Mikroglia/Makrophageninfiltration ($r = -0,10$) als auch der Demyelinisierungsgrad ($r = -0,03$) im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere in der weißen Substanz standen in keinem signifikanten Zusammenhang mit der Steifheit (alle p -Werte $> 0,7$; Pearson-Korrelation).

In der grauen Substanz gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den histologischen Veränderungen und der Steifheit (alle p -Werte $> 0,2$; Spearmann-Korrelation).

In der weißen Substanz der akuten Phase war ein Zusammenhang zwischen dem Mikroglia/Makrophagengehalt und der Steifheit erkennbar. Je höher der semiquantitative Score, d. h. je größer der Mikroglia/Makrophagengehalt, desto steifer war das Gewebe ($r = 0,9$, $p < 0,01$; Spearmann-Korrelation, siehe Abbildung 39).

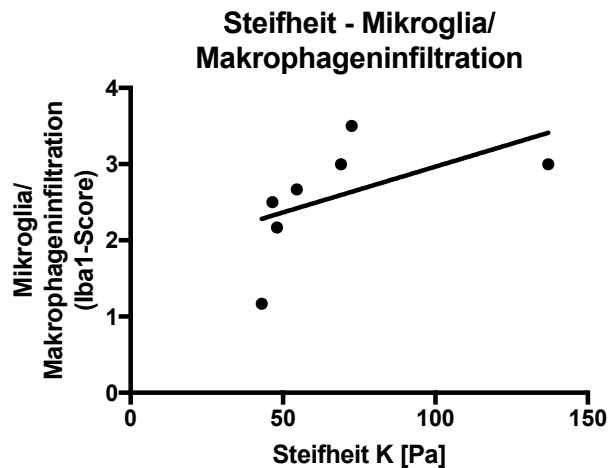


Abbildung 39 Linearer Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Mikroglia/Makrophageninfiltration. In der weißen Substanz der akuten Phase bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Mikroglia/Makrophageninfiltration (Iba1). Die Anzahl der infiltrierten Mikrogliazellen/Makrophagen stieg mit zunehmender Steifheit ($r = 0,9$ $p < 0,01$; Spearman-Korrelation).

In der Remissionsphase ($r = -0,92$) und der Schubphase ($r = -0,80$) bestand eine negative nicht signifikante Korrelation zwischen der Mikroglia/Makrophagenanzahl und der Steifheit ($p > 0,05$; Pearson-Korrelation). In der Remissionsphase war in der grauen Substanz ein negativer Zusammenhang zwischen der Mikroglia/Makrophagenanzahl und der Steifheit zu erkennen ($r = -0,96$, $p < 0,04$; Pearson-Korrelation). Der Mikroglia/Makrophagengehalt sank mit zunehmender Steifheit (siehe Abbildung 40).

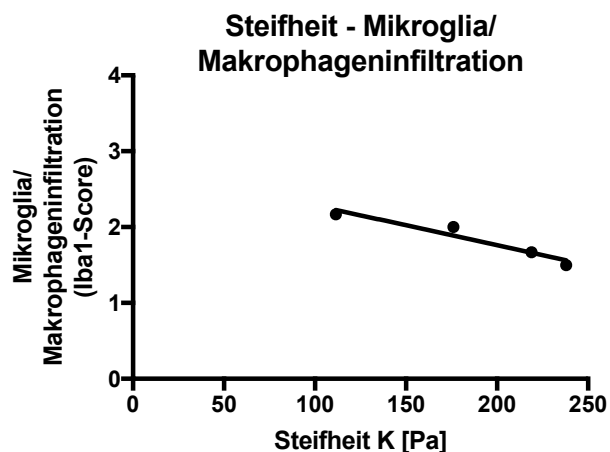


Abbildung 40 Korrelation zwischen der Steifheit und der Mikroglia/Makrophageninfiltration in der Remissionsphase in der grauen Substanz. Die Anzahl der Mikrogliazellen/Makrophagen nahm mit zunehmender Steifheit ab.

In der grauen Substanz waren keine weiteren signifikanten Zusammenhänge feststellbar.

Der Demyelinisierungsgrad sank mit zunehmender Steifheit. Während in der akuten Phase in der weißen Substanz nur eine Tendenz zu erkennen war ($r = 0,1$; Spearman-Korrelation), war in der Remissionsphase ein signifikanter Zusammenhang zwischen Demyelinisierungsgrad und Steifheit festzustellen. In der Remissionsphase korrelierte der Demyelinisierungsgrad negativ mit der Steifheit ($r = -0,96$, $p < 0,05$; Pearson-Korrelation). Je steifer das Gewebe, desto weniger demyelinisierte Areale waren zu erkennen. In der Schubphase war ebenfalls wieder eine negative Korrelation feststellbar ($r = -0,59$; Pearson-Korrelation), diese war jedoch nicht signifikant ($p > 0,5$; siehe Abbildung 41).

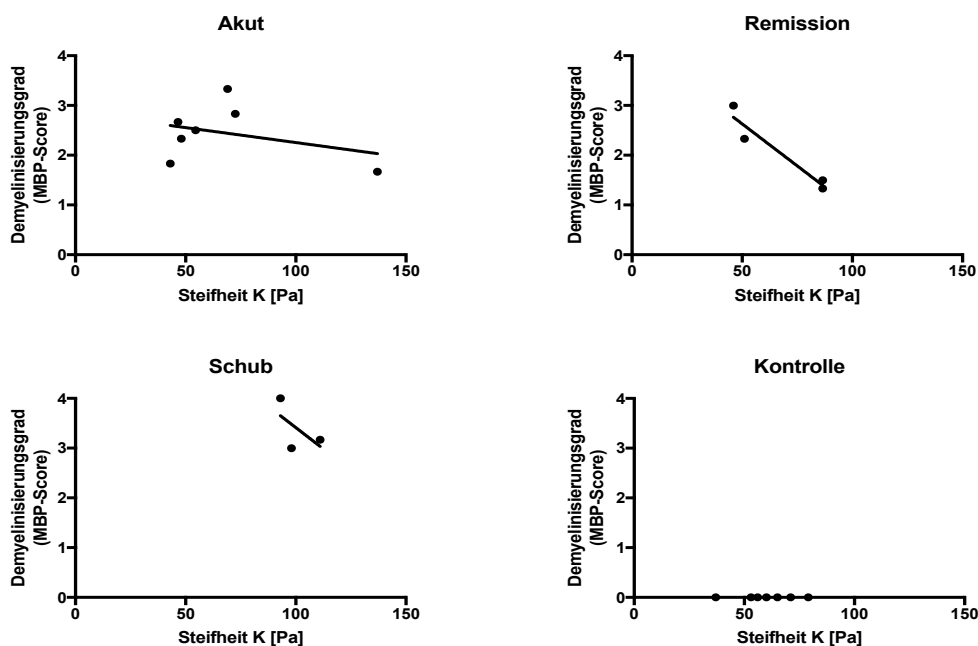


Abbildung 41 Zusammenhang zwischen der Steifheit und dem Demyelinisierungsgrad in allen Krankheitsstadien der EAE. In allen drei Krankheitsstadien bestand ein negativer linearer Zusammenhang zwischen der Steifheit und dem Demyelinisierungsgrad. Dieser war jedoch nur in der Remissionsphase signifikant ($p < 0,05$). In den Kontrolltieren betrug der semiquantitative Score 0.

In der grauen Substanz war kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Demyelinisierung und der Steifheit festzustellen.

In der akuten Phase bestand in der weißen Substanz ein Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Astroglie. Je steifer das Gewebe, desto stärker war die GFAP-Expression ($r = 0,79$, $p < 0,05$; Spearman-Korrelation). In der

Remissionsphase war dies ebenfalls zu erkennen ($r = 0,75$; Pearson-Korrelation). Die Korrelation war jedoch nicht signifikant ($p > 0,2$). In der Schubphase beeinflusste die Steifheit das Ausmaß der GFAP-Expression nicht ($r = 0,001$, $p > 0,99$; Pearson-Korrelation, siehe Abbildung 42).

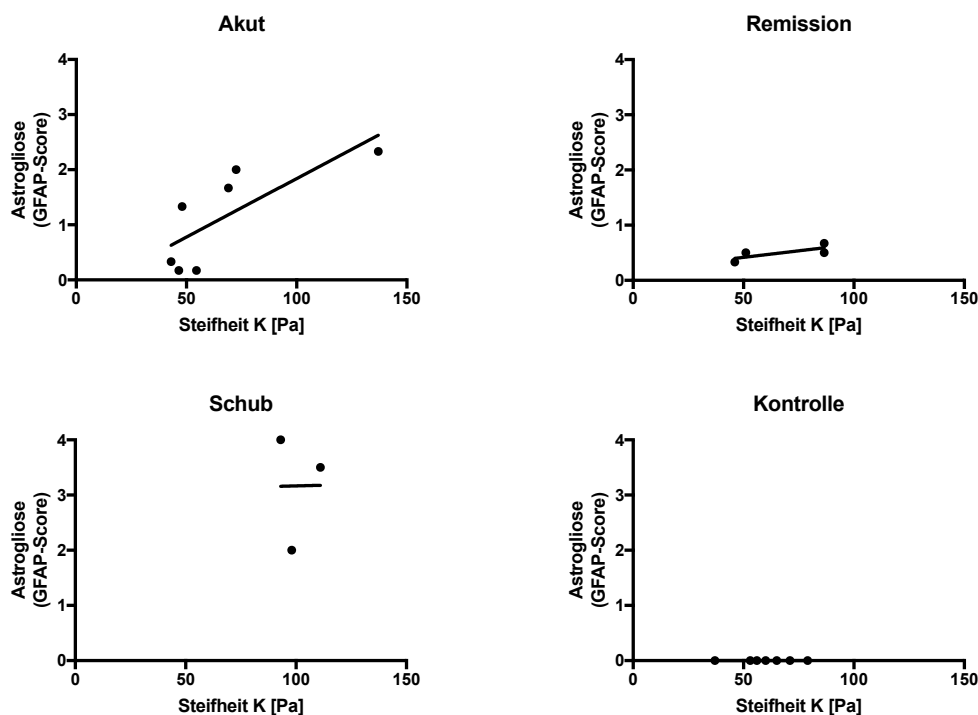


Abbildung 42 Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Astrogliose (GFAP-Score) in der weißen Substanz. In der akuten Phase bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Astrogliose ($r = 0,79$, $p < 0,05$). Auch in der Remissionsphase war ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern erkennbar, dieser war jedoch nicht signifikant. In der Schubphase bestand kein Zusammenhang zwischen der Steifheit und dem Ausmaß der GFAP-Expression. Der semiquantitative Score der Kontrolltiere betrug 0.

In der grauen Substanz war sowohl in der akuten Phase ($r = 0,07$) als auch in der Remissionsphase ($r = 0,31$) nur eine schwache Korrelation feststellbar (alle p -Werte $> 0,5$; Pearson-Korrelation). In der Schubphase nahm die GFAP-Expression mit zunehmender Steifheit zu ($r = 0,98$, $p > 0,1$; Pearson-Korrelation.)

Im nächsten Schritt wurden die oben beschriebenen Analysen für die Intensität und die Steifheit durchgeführt. Anders als beim semiquantitativen Score konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Intensitäten und der Steifheit festgestellt werden (alle p -Werte $> 0,05$). Dies galt sowohl für das

Gesamtkollektiv aller Tiere und das Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere in der weißen und der grauen Substanz als auch für die einzelnen Stadien der jeweiligen Substanzen.

3.6.2 Zusammenhang zwischen Steifheit und Zelldichte

Als nächstes wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der Steifheit gab.

Sowohl im Gesamtkollektiv aller Tiere als auch in der weißen Substanz im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere war ein schwacher linearer Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der Steifheit zu erkennen. Je steifer das Gewebe, desto größer war die Zelldichte. Diese erkennbare Korrelation war jedoch nicht signifikant ($r = 0,37$, $r = 0,3$, alle p -Werte $< 0,3$; Pearson-Korrelation, siehe Abbildung 43).

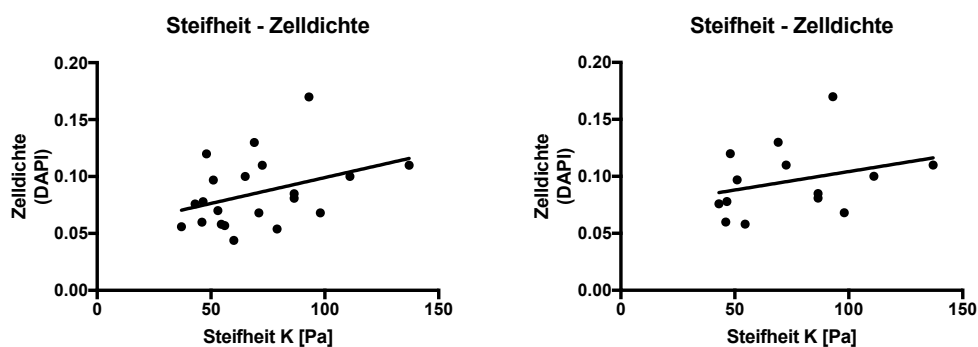


Abbildung 43 Korrelation der Steifheit mit der Zelldichte im Gesamtkollektiv aller Tiere (links) sowie im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (rechts) innerhalb der weißen Substanz. Zwischen der Steifheit und der Zelldichte bestand ein schwacher, nicht signifikanter Zusammenhang ($r = 0,37$, $r = 0,3$, alle p -Werte $< 0,3$).

Auch in der akuten Phase ($r = 0,41$; Spearman-Korrelation) und der Remissionsphase ($r = 0,26$; Pearson-Korrelation) war eine Zunahme der Zelldichte in steiferem Gewebe feststellbar. Wie im Gesamtkollektiv aller Tiere und im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere war dieser Zusammenhang in der weißen Substanz ebenfalls nicht signifikant (alle p -Werte $> 0,3$; Pearson-Korrelation). Anders als bei den beiden anderen Phasen kam es in der Schubphase zur Reduktion der Zelldichte in steiferen Geweben ($r = -0,47$;

Pearson-Korrelation). Wie auch in den beiden anderen Phasen war dieser Zusammenhang ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,5$, siehe Abbildung 44)

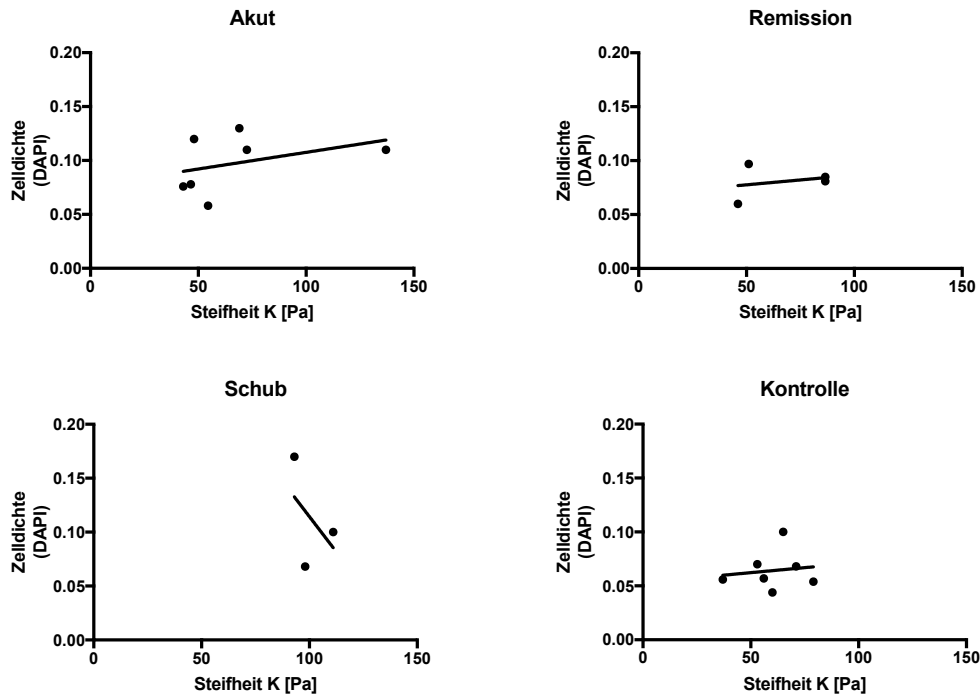


Abbildung 44 Zusammenhang zwischen Steifheit und Zelldichte in der weißen Substanz in allen Krankheitsstadien der EAE. In der akuten Phase war der am stärksten ausgeprägte Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Zelldichte zu erkennen ($r = 0,41$). Auch in der Remissionsphase war ein möglicher Zusammenhang zu erkennen, dieser war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie der in der akuten Phase. In der Schubphase nahm die Zelldichte mit zunehmender Steifheit ab.

In der grauen Substanz nahm die Zelldichte mit zunehmender Steifheit ab. Dies war im Gesamtkollektiv ($r = -0,14$), in der akuten Phase ($r = -0,18$) und in der Remissionsphase ($r = -0,41$) zu erkennen. Wie auch in der weißen Substanz waren diese Zusammenhänge nicht signifikant ($p > 0,5$; Pearson-Korrelation). In der Schubphase zeigte sich ein verändertes Bild. Je steifer das Gewebe, desto mehr Zellen waren innerhalb des Gewebes auffindbar. Diese positive Korrelation war wie auch die anderen Zusammenhänge nicht signifikant ($r = 0,82$, $p > 0,6$; Pearson-Korrelation).

3.7 Zusammenhang zwischen der Schwere der EAE und den histologischen Veränderungen

Die Schwere der Krankheit wurde mittels des standardisierten erweiterten EAE-Scores von Dr. med. David E. Koser beurteilt ¹⁵⁶. Aufgrund des schubförmig verlaufenden Krankheitsverlaufs wurden die Mäuse in drei Krankheitsstadien eingeteilt: akute Phase, Remissionsphase, Schubphase.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es einen linearen Zusammenhang zwischen der Schwere der EAE und den histologischen Veränderungen gab. Dazu wurde der EAE-Score mit der Zelldichte (weiße und graue Substanz), den semiquantitativen Scores der unterschiedlichen histologischen Färbungen und den Antikörperintensitäten der unterschiedlichen histologischen Färbungen verglichen.

Im Gesamtkollektiv aller Tiere konnte ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen dem EAE-Score und der Zelldichte in der weißen Substanz festgestellt werden ($r = 0,67$, $p = 0,001$; Spearman-Korrelation, siehe Abbildung 45). In der grauen Substanz war dieser lineare Zusammenhang nicht erkennbar ($r = 0,3$, $p < 0,2$; Spearman-Korrelation).

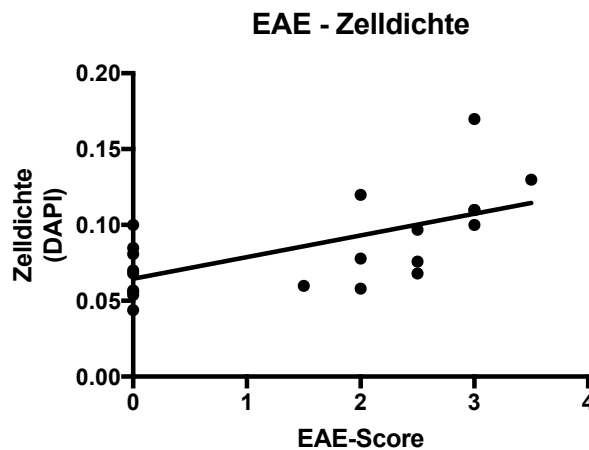


Abbildung 45 Linearer Zusammenhang zwischen dem EAE-Score und der Zelldichte im Gesamtkollektiv aller Tiere. Die Zelldichte stieg mit zunehmender Schwere der Krankheit signifikant.

Des Weiteren war in der weißen Substanz der erkrankten Tiere ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen dem EAE-Score und der Zelldichte ersichtlich ($r = 0,61$, $p < 0,03$; Spearman-Korrelation). Je höher der EAE-Score, desto

mehr Zellen besiedelten die weiße Substanz. In der Remissionsphase zeigten zwei Tiere keine EAE-Symptomatik; verglichen mit den Tieren mit EAE-Symptomatik zeigten sie auch eine geringere Zelldichte. In der grauen Substanz war ebenso ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Krankheit und der Zelldichte zu erkennen ($r = 0,5$; Spearman-Korrelation). Dieser war jedoch nicht signifikant ($p = 0,07$; Spearman-Korrelation, siehe Abbildung 46).

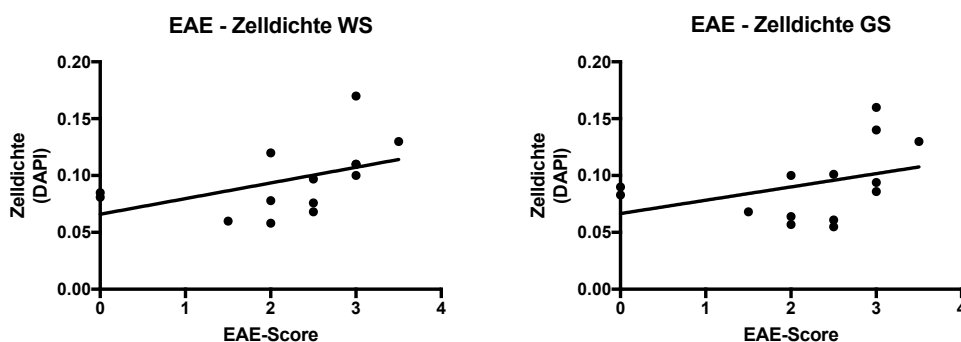


Abbildung 46 Zusammenhang zwischen der Schwere der Krankheit (EAE-Score) und der Zelldichte (DAPI). In der weißen Substanz bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Schwere der Krankheit und der Zelldichte. Je kränker ein Tier war, desto mehr Zellen waren in der weißen Substanz zu finden. Ähnliches galt auch für die graue Substanz. Dieser Zusammenhang war jedoch knapp nicht signifikant ($p = 0,07$).

Ferner war ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem EAE-Score der akuten Phase und der Schubphase in der weißen und grauen Substanz feststellbar. Diese waren jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$; Pearson-Korrelation, Spearman-Korrelation). In der Remissionsphase war kein Zusammenhang zwischen dem EAE-Score und der Zelldichte feststellbar ($p > 0,05$; Pearson-Korrelation, Spearman-Korrelation). Dies galt sowohl für die weiße Substanz als auch für die graue Substanz.

Sowohl der EAE-Score als auch die erhobenen semiquantitativen Scores unterschieden nicht zwischen weißer und grauer Substanz, sodass beim Vergleich dieser beiden Parameter keine Unterscheidung zwischen weißer und grauer Substanz möglich war.

Zwischen dem EAE-Score und dem Ausmaß der Demyelinisierung im Gesamtkollektiv aller Tiere war ein starker linearer Zusammenhang zu erkennen. Je kränker eine Maus war, d. h. je höher der EAE-Score, desto stärker war auch der Grad der Demyelinisierung ($r = 0,85$, $p < 0,0001$; Spearman-Korrelation).

Dieser lineare Zusammenhang war auch im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere zu erkennen ($r = 0,59$, $p < 0,04$; Spearmann-Korrelation). Das Ausmaß der Demyelinisierung war bei den Tieren mit keiner EAE-Symptomatik am wenigsten stark ausgeprägt (siehe Abbildung 47).

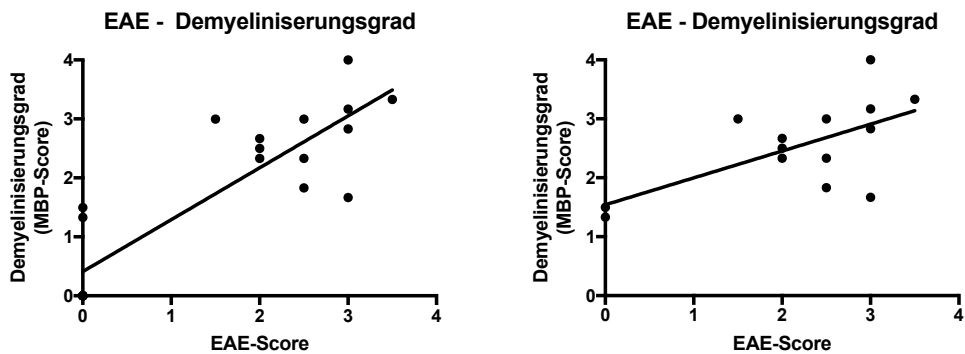


Abbildung 47 Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der EAE und dem Ausmaß der Demyelinisierung im Gesamtkollektiv aller Tiere (links), sowie im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (rechts). Je kränker eine Maus (hoher EAE-Score), desto stärker war das Ausmaß der Demyelinisierung.

Weiterhin korrelierte die Schwere der EAE signifikant mit der Astroglieose im Gesamtkollektiv aller Tiere ($r = 0,83$, $p < 0,0001$; Spearmann-Korrelation). Ebenso stieg die GFAP-Expression mit zunehmendem EAE-Score im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere ($r = 0,67$, $p < 0,02$; Spearmann-Korrelation). Die Mäuse, die in der Remissionsphase keine EAE-Symptomatik aufwiesen, zeigten auch eine geringere GFAP-Expression im Vergleich zu den Tieren mit EAE-Symptomatik (siehe Abbildung 48).

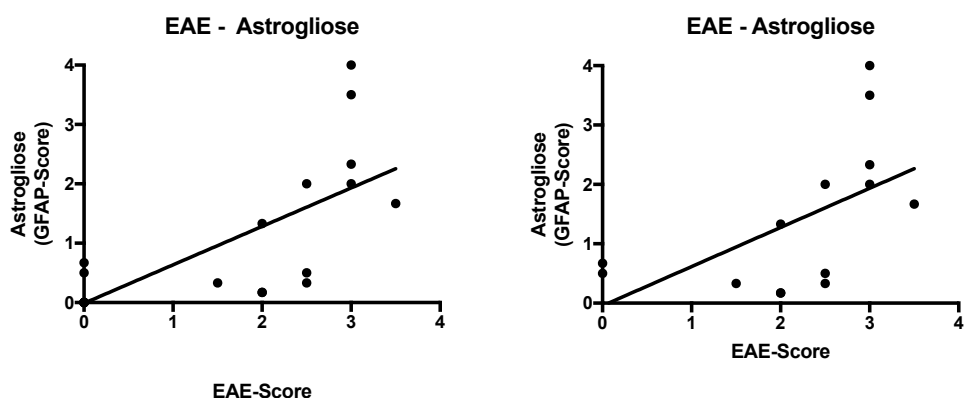


Abbildung 48 Zusammenhang zwischen der Schwere der EAE und der Astroglieose im Gesamtkollektiv aller Tiere (links) sowie im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (rechts). Die Schwere der Krankheit korrelierte

mit dem Ausmaß der GFAP-Expression. Je höher der EAE-Score, desto stärker war die GFAP-Expression im erkrankten Gewebe.

Im Gesamtkollektiv aller Tiere war ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen der Schwere der EAE und der Mikroglia/Makrophageninfiltration erkennbar ($r = 0,73$, $p = 0,0002$; Spearman-Korrelation). Verglichen dazu stand die Mikroglia/Makrophageninfiltration im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere in schwachem, jedoch nicht signifikantem Zusammenhang mit der Schwere der Krankheit ($r = 0,26$, $p > 0,3$; Spearman-Korrelation, siehe Abbildung 49).

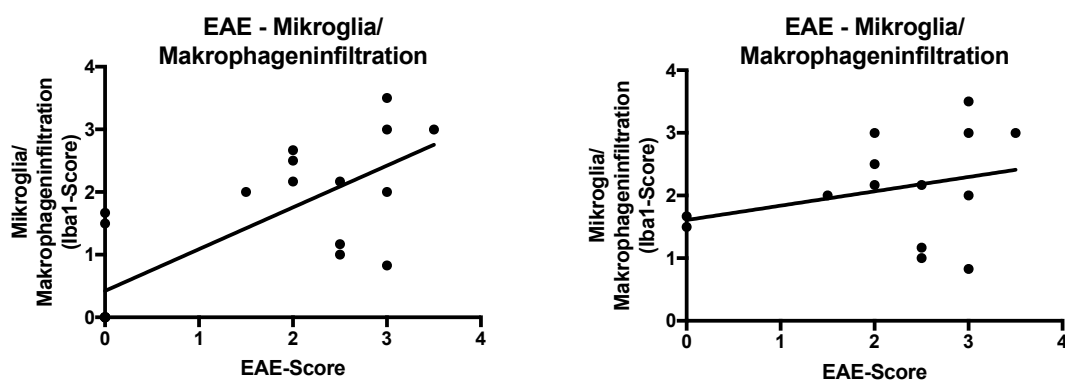


Abbildung 49 Korrelation zwischen dem EAE-Score und der Mikroglia/Makrophageninfiltration im Gesamtkollektiv aller Tiere (links) sowie im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (rechts). Im Gesamtkollektiv aller Tiere bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Schwere der EAE und der Mikroglia/Makrophageninfiltration. Im Vergleich dazu war der Zusammenhang zwischen der Schwere der EAE und der Mikroglia/Makrophageninfiltration im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere nicht signifikant.

In der akuten Phase bestand der stärkste Zusammenhang zwischen der GFAP-Expression und der EAE ($r = 0,73$; Pearson-Korrelation). Des Weiteren war ein Zusammenhang zwischen den semiquantitativen Scores von MBP ($r = 0,29$) und Iba1 ($r = 0,47$) und der Schwere der EAE zu erkennen. Alle Zusammenhänge waren jedoch nicht signifikant (alle p -Werte $> 0,05$; Pearson-Korrelation). In der Remissionsphase nahm der Mikroglia/Makrophagengehalt mit zunehmender Schwere zu ($r = 0,97$, $p < 0,05$; Pearson-Korrelation). Das Ausmaß der Demyelinisierung korrelierte ebenfalls positiv mit dem EAE-Score ($r = 0,76$, $p > 0,2$; Pearson-Korrelation). Je höher der semiquantitative Score, desto geringer war die GFAP-Expression in der Remissionsphase ($r = -0,5$, $p > 0,5$; Pearson-Korrelation). In der Schubphase stieg sowohl das Ausmaß der Demyelinisierung ($r = 0,87$) als auch die Astrogliose ($r = 0,88$), je kränker ein Tier

war (alle p-Werte > 0,5; Spearmann-Korrelation). Zwischen der Mikroglia/Makrophageninfiltration und der EAE-Schwere bestand kein linearer Zusammenhang.

Als letztes wurde die Schwere der EAE mit den unterschiedlichen Antikörperintensitäten korreliert. In dieser Versuchsreihe konnte wieder zwischen weißer Substanz und grauer Substanz unterschieden werden. In der weißen Substanz war sowohl im Gesamtkollektiv aller Tiere, im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere als auch innerhalb der einzelnen Stadien keine Korrelation zwischen dem EAE-Score und den Antikörperintensitäten feststellbar (alle p-Werte > 0,05). Dies galt auch für die graue Substanz (alle p-Werte > 0,05).

4 Diskussion

Vorherige Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der mechanischen Veränderung des Gewebes und den histopathologischen Parametern, wie der Entzündungsreaktion und der Demyelinisierung, in Tiermodellen der MS erkennen ^{126,127,135}. Es gab jedoch nur sehr wenige Studien, die die mechanischen Eigenschaften des Gewebes mit den zugrundeliegenden strukturellen Eigenschaften verglichen haben ^{126,127,135}. In den genannten MRE-Studien wurde eine Reduktion der Gewebesteifheit im Krankheitsverlauf festgestellt ^{126,127,135}. Im Gegensatz dazu konnten Koser et al. anhand von AFM-Messungen darstellen, dass die Steifheit im Krankheitsverlauf der EAE zunimmt ¹⁵⁶. In der besagten Studie konnten Koser et al. darstellen, dass die mechanischen Gewebeveränderungen während des Krankheitsverlaufs der EAE sehr komplex sind ¹⁵⁶. In der akuten Phase zeigten beispielsweise die Tiere mit niedrigem EAE-Score eine Reduktion der Steifheit in der weißen Substanz verglichen mit den Kontrolltieren ¹⁵⁶. Im Gegensatz dazu konnte in der weißen Substanz der Tiere mit einem schwereren Krankheitsverlauf eine erhöhte Steifheit nachgewiesen werden ¹⁵⁶. In der Remissionsphase waren die weiße und graue Substanz steifer, wenn keine klinischen Zeichen von EAE zu beobachten waren ¹⁵⁶. In Tieren mit EAE-Symptomatik konnten keine Veränderungen der Gewebesteifheit verglichen mit den Kontrolltieren festgestellt werden ¹⁵⁶. In der Schubphase war die weiße Substanz signifikant steifer als die der Kontrolltiere ¹⁵⁶.

Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchte die Verfasserin, ob und wie die mechanischen Veränderungen des Gewebes mit den darunterliegenden histologischen Veränderungen zusammenhängen. Anders als bei den vorherigen Studien wurden die mechanischen mit den zugrundeliegenden histologischen Veränderungen in den verschiedenen Krankheitsstadien der EAE untersucht. Dafür benutzte die Verfasserin das schubförmig verlaufende EAE-Modell, das durch eine akute Phase, eine Remissionsphase und eine Schubphase gekennzeichnet ist.

Die unterschiedliche Anzahl der Tiere im Material und Methodenteil und Ergebnisteil (8 zu 7 Mäusen in der akuten Phase, 5 zu 4 Mäuse in der Remissionsphase und 8 zu 7 in den gleichartigen Kontrolltieren) liegt zum einen an fehlenden Steifheitswerten und zum anderen an Fehlern, die beim Schneiden der Paraffinblöcke entstanden sind, wodurch das Rückenmark der anderen Tiere nicht mehr untersucht werden konnten.

Sowohl in den gesunden Tieren als auch in den erkrankten Tieren war die graue Substanz signifikant steifer als die weiße Substanz. In den erkrankten Tieren konnte eine Zunahme der Gewebesteifheit sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz festgestellt werden. In der akuten Phase und der Remissionsphase der weißen und grauen Substanz war kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Tieren und den Kontrolltieren feststellbar. In der Schubphase war die weiße Substanz der erkrankten Tiere signifikant steifer als die der gesunden Tiere.

In kürzlich veröffentlichten MRE-Studien konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden ^{125,128}. MS-Patienten zeigten in MRE-Studien eine Reduktion der Gewebesteifheit um 13–20,5 % ^{125,128}. Des Weiteren konnte in einer Studie von Fehner et al. gezeigt werden, dass selbst CIS-Patienten eine geringere Gehirnsteifigkeit aufweisen ¹²⁹. Andere Arbeitsgruppen untersuchten an Tiermodellen der MS die mechanischen Veränderungen des ZNS während des Krankheitsverlaufs. Wie auch bei den humanen MS-Studien konnte hier eine Reduktion der Steifheit des ZNS-Gewebes festgestellt werden ^{126,127,135}. Die kontroversen Ergebnisse könnten beispielsweise aufgrund der unterschiedlichen Messmethoden entstanden sein. Während bei MRE-Messungen die mechanischen Eigenschaften über eine virtuelle Palpation *in vivo* gemessen werden, d. h. durch die Messung der Ausbreitung von Scherwellen ¹²⁶ werden die mechanischen Eigenschaften bei AFM-Messungen punktuell durch den Widerstand des Gewebes bei einer definierten Kraft *post mortem* gemessen. Durch die punktuelle Bestimmung der mechanischen Eigenschaften bei AFM-Messungen können kleinste regionsspezifische Unterschiede innerhalb des Rückenmarks festgestellt werden. Des Weiteren kann das zu untersuchende Rückenmark genauestens abgemessen werden. Dies ermöglicht eine

detailliertere Analyse der mechanischen Eigenschaften des Gewebes. Die präzise Bestimmung der Gewebeeigenschaften ist wichtig, wenn man den mechanischen Eigenschaften zugrundeliegende strukturelle Veränderungen zuordnen möchte, wie dies in dieser Arbeit erfolgte. Ein Vergleich der mechanischen Gewebeeigenschaften mit den zugrundeliegenden histopathologischen Strukturen ist nur dann möglich, wenn bei beiden Analysen die gleiche Längenskalierung verwendet wurde. Da dies nur bei AFM-Messungen möglich ist, wurde diese Technik zur Durchführung der Experimente angewandt. Zwar konnten MRE-Messungen, wie sie von Schregel et al., Riek et al. und Millward et al. durchgeführt wurden, zum einem *in vivo* und zum anderen mehrmals im Krankheitsverlauf wiederholt werden, die genaue Korrelation zu den zugrundeliegenden histologischen Strukturen war jedoch nur eingeschränkt möglich^{126,127,135}. Aus diesem Grund wurde die Elastizitätsmessung durch AFM, auch wenn sie nicht mehrmals an der gleichen Maus wiederholt werden konnte und so die Elastizität im Krankheitsverlauf eines Tieres nicht genau untersucht werden konnte, der MRE-Messung vorgezogen.

Bei der Korrelation von mechanischen Gewebeeigenschaften und histologischen Parametern (Zelldichte, Immunezellinfiltration, Demyelinisierungsgrad, Astrogliose) mithilfe des semiquantitativen Scores wurde, falls aus einer Maus sowohl ein kranialer als auch kaudaler Schnitt vorhanden war, der Mittelwert beider Schnitte gebildet und für die statische Analyse verwendet. Die Mittelung erfolgte aufgrund der Annahme, dass die Ergebnisse nicht als unabhängig voneinander betrachtet werden konnten, da sie von der gleichen Maus generiert wurden. Auf der anderen Seite könnten durch die Mittelung des nicht linearen semiquantitativen Scores der semiquantitative Score über- bzw. unterschätzt werden. So würde beispielsweise der semiquantitative Score bei einer gemittelten Steifheit von 75 Pa und einem gemittelten semiquantitativen Score von 2 verglichen mit einer nicht gemittelten Steifheit von 75 Pa und einem semiquantitativen Score von 1 überschätzt werden. Dies könnte zu einer erhöhten Varianz und damit letztendlich zu einer verminderten Detektion von Zusammenhängen führen.

Im Gesamtkollektiv aller Tiere und im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere ist kein Zusammenhang zwischen der Steifheit und dem Demyelinisierungsgrad erkennbar. Werden die unterschiedlichen Krankheitsstadien einzeln betrachtet, ist interessanterweise ein Zusammenhang zwischen den mechanischen Eigenschaften und dem Demyelinisierungsgrad feststellbar. Während in der akuten Phase nur ein schwacher Zusammenhang zwischen dem Demyelinisierungsgrad und der Steifheit zu erkennen ist, sinkt in der Remissionsphase und der Schubphase der Anteil der demyelinisierten Areale, je steifer das Gewebe ist. Der geringe nicht signifikante lineare Zusammenhang zwischen Demyelinisierung und Gewebesteifheit in der akuten Phase könnte durch die anfänglich noch geringen mechanischen und strukturellen Veränderungen zu erklären sein.

Dass der Demyelinisierungsgrad einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des ZNS-Gewebes hat, konnten auch Schregel et al. in einer am Cuprizone-Modell durchgeführten MRE-Studie zeigen¹²⁶. Im Cuprizone-Modell, das durch eine reproduzierbare toxische Demyelinisierung gekennzeichnet ist, konnte ebenfalls eine Reduktion des Demyelinisierungsgrads bei zunehmender Steifheit und Krankheitsdauer festgestellt werden¹²⁶. Neben Schregel et al. konnte auch die Arbeitsgruppe um Weickenmeier et al. zeigen, dass der Myelinhalt im ZNS einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des ZNS hat¹⁶¹. Je steifer das ZNS-Gewebe, desto größer ist der Myelinisierungsgrad^{126,161}. Dieses und das Ergebnis von Schregel et al. bestätigen den beobachteten linearen Zusammenhang zwischen Steifheit und Demyelinisierungsgrad.

Die vorliegenden Daten belegen, dass die Steifheit durch zunehmende Demyelinisierung reduziert wird. Auch andere neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson und auch selbst der physiologische Alterungsprozess gehen mit einer Reduktion der Steifheit in neuronalen Strukturen des Gehirns einher¹³⁰⁻¹³². In der Fachliteratur wird als mögliche Ursache eine Reduktion der neuronalen Zellzahl diskutiert¹³³. Klein et al. konnten in einer *in vivo*-Studie darstellen, dass durch adulte Neurogenese die Gewebesteifheit erhöht werden kann¹³³. Aus diesem Grund könnte die

Reduktion der Gewebesteifheit des Gehirns bei den oben genannten Erkrankungen beziehungsweise beim Alterungsprozess durch eine Reduktion der neuronalen Zellzahl verursacht werden. Dies würde auch mit den oben aufgeführten Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zelldichte die mechanischen Eigenschaften beeinflusst. Die Steifheit nimmt mit zunehmender Zelldichte zu. Dies ist sowohl in Gesamtkollektiv aller Tiere, im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere sowie in der akuten Phase und der Remissionsphase zu erkennen. Im Gegensatz dazu kommt es zu einer nicht signifikanten Reduktion der Zelldichte mit zunehmender Steifheit in der Schubphase. Das veränderte Bild in der Schubphase könnte aufgrund der geringen und dementsprechend nicht aussagekräftigen Fallzahl von $n = 3$ Tieren entstanden sein. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, müssten weitere Analysen mit einer größeren Fallzahl durchgeführt werden. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit bei jeder Analyse immer nur zwei Parameter miteinander korreliert. Es könnte aber durchaus möglich sein, dass sich die einzelnen Parameter untereinander beeinflussen. Diese mögliche Beeinflussung der Parameter wird bei einer Korrelation von zwei Parametern nicht berücksichtigt. Das veränderte Ergebnis in der Schubphase könnte in Folge einer nicht berücksichtigten Abhängigkeit zu einem anderen histologischen Parameter entstanden sein. Um den genauen Zusammenhang zu klären, bedarf es linearer Regressionsanalysen, die die Abhängigkeit der einzelnen Parameter untereinander darstellen. Des Weiteren könnte die hier verwendete Quantifizierungsmethode zur Detektion der Zellkerne das Ergebnis beeinflusst haben. Der Schwellenwert für die weiße Substanz wurde anhand von fünf zufällig ausgewählten zellkernfreien Bereichen bestimmt. Es könnte also möglich sein, dass eine unterschiedliche Auswahl der zellkernfreien Bereiche zu einem veränderten Schwellenwert führt, was wiederum zu einer anderen Zelldichte führen könnte. Daher wäre es interessant zu untersuchen, inwiefern sich der Schwellenwert verändert, wenn der Algorithmus mehrfach hintereinander ausgeführt werden würde. Darüber hinaus konnten große Nuclei mit starken Heterchromatinanteilen schlechter detektiert werden.

Koser et al. konnten sowohl an Mäusen als auch an *Xenopus* einen Zusammenhang zwischen der Zelldichte und den mechanischen Eigenschaften des Gewebes feststellen^{136,148}. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Gewebesteifheit mit einer Zunahme der Zelldichte assoziiert ist^{136,148}. Die Ergebnisse von Koser et al. stimmen mit den hier gezeigten Ergebnissen überein und bekräftigen den möglichen Zusammenhang zwischen Zelldichte und mechanischen Gewebeeigenschaften.

Im Krankheitsverlauf der EAE kommt es zu einer signifikanten Reduktion der eingewanderten Mikrogliazellen/Makrophagen. Wie auch bei den beiden anderen Parametern konnte ein linearer Zusammenhang zwischen den mechanischen Gewebeeigenschaften und der Mikroglia/Makrophageninfiltration festgestellt werden. Während im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere in der weißen Substanz nur ein schwacher negativer Zusammenhang zu erkennen ist, steigt die Mikroglia/Makrophagenanzahl signifikant mit zunehmender Steifheit in der akuten Phase der weißen Substanz der EAE. Wie bereits oben erwähnt, beeinflusst die Zelldichte die mechanischen Gewebeeigenschaften. So ist in der akuten Phase sowohl eine signifikant erhöhte Zelldichte als auch eine signifikant erhöhte Steifheit feststellbar. Es scheint daher auch plausibel, dass es durch eine gesteigerte Mikroglia/Makrophageninfiltration zu einer Zunahme der Steifheit in der weißen Substanz kommt. Der erhöhte Mikroglia/Makrophagengehalt in der akuten Phase der EAE könnte auch Folge der vermehrten Genexpression von Mikrogliazellen auf steiferem Gewebe sein¹⁴⁶. Moshayedi et al. konnten zeigen, dass Mikrogliazellen auf steiferem Gewebe die Entzündungsreaktion fördern, indem sie Gene exprimieren, die Entzündungsmediatoren hochregulieren¹⁴⁶. Der proinflammatorische Charakter der Mikrogliazellen/Makrophagen fördert die Entzündungsreaktion, wodurch weitere Mikrogliazellen/Makrophagen in das Entzündungsgebiet migrieren. Diese können wiederum die Gewebedestruktion fördern und so die Gewebesteifheit reduzieren. In diesem Fall würde der proinflammatorische Charakter der Mikrogliazellen/Makrophagen überwiegen. Im Gegensatz zur akuten Phase kommt es in der Remissionsphase und der Schubphase der weißen Substanz wieder zu einer Reduktion der Steifheit mit zunehmender Mikroglia/Makrophageninfiltration. Es könnte daher möglich sein,

dass in diesen Stadien der EAE der antiinflammatorische Charakter der Mikrogliazellen/Makrophagen überwiegt. Da eine genaue Differenzierung zwischen den beiden Mikroglia/Makrophagentypen nicht möglich ist, ist es abhängig vom Krankheitsverlauf und der Schwere der EAE, ob der steifheitserhöhende oder der steifheitserniedrigende Einfluss der Mikrogliazellen/Makrophagen überwiegt.

In anderen Studien konnten die Ergebnisse dieser Arbeit für die akute Phase der EAE nicht bestätigt werden ^{126,127,135}. Sowohl Schregel et al., Riek et al., als auch Millward et al. konnten anfänglich eine Reduktion der Gewebesteifheit mit zunehmender Inflammation feststellen ^{126,127,135}. Riek et al. definierte die Entzündungsreaktion nicht über die Anwesenheit von Mikrogliazellen/Makrophagen, sondern über das Vorhandensein von CD3-positiven T-Zellen in den Läsionen ¹²⁷. Die konträren Ergebnisse könnten durch die unterschiedliche Definition der vorhandenen Entzündungszellen und die dementsprechend unterschiedliche Verwendung von Antikörpern erklärbar sein. Um beide Ergebnisse vergleichen zu können, müssten die Analysen mit denselben Antikörpern und der gleichen Messmethode durchgeführt werden. Zwar wurde in dieser Arbeit auch auf das Vorhandensein von CD3-positiven T-Zellen getestet, die Fallzahl war jedoch so klein und dementsprechend nicht repräsentativ, dass die Daten nicht in die statistische Analyse mit eingeflossen sind, weshalb keine vergleichbaren Daten vorliegen. Millward et al. konnten in einem chronischen Tiermodell der MS ebenfalls eine anfängliche Reduktion der Steifheit mit zunehmender Inflammation feststellen ¹³⁵. Im Gegensatz zur Studie von Riek et al. definierten Millward et al. analog zur vorliegenden Studie die Entzündungsreaktion über das Vorhandensein von Mikrogliazellen/Makrophagen ¹³⁵. Konträr zur dieser Studie wurde allerdings ein anderer Antikörper, der gegen das Oberflächenprotein F4/80 gerichtet ist, verwendet ¹³⁵. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörper und verschiedener EAE-Modelle könnte eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse darstellen.

Des Weiteren wurde im Vergleich zu den drei oben genannten Studien in dieser Arbeit zwischen weißer und grauer Substanz unterschieden. Die in dieser Arbeit erwähnten histologischen als auch mechanischen Ergebnisse beziehen sich auf

die weiße Substanz. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass es mechanische Unterschiede zwischen der weißen und grauen Substanz gibt ¹³⁶⁻¹³⁹. Ein genauer Vergleich der Ergebnisse ist daher nur eingeschränkt möglich und könnte möglicherweise die Diskrepanzen erklären.

Ferner konzentrieren sich diese Studien nur auf das Gehirn oder eine bestimmte Interessensregion des Gehirns, wie beispielsweise den *Corpus Callosum*, weshalb die Validität für mechanische sowie strukturelle Veränderungen in spezifisch lokalisierten Strukturen des ZNS, wie beispielsweise dem Rückenmark, reduziert sein könnte. Die Analyse unterschiedlicher ZNS-Regionen und die potenziell regionsabhängigen unterschiedlichen mechanischen als auch strukturellen Gewebeeigenschaften könnten eine mögliche Erklärung für die konträren Ergebnisse sein. Um die hiesigen Ergebnisse zu bestätigen, müssten in weiterführenden Experimenten sowohl die gleichen ZNS-Regionen analysiert als auch die gleichen Antikörper verwendet werden.

Sowohl im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere als auch in der Remissions- und Schubphase stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit den Ergebnissen der oben genannten Studien überein. Da in zwei der drei Studien eine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Krankheitsstadien nicht möglich ist und in der dritten Studie keine Remissions- bzw. Schubphase definiert worden ist, ist eine Einordnung dieser Ergebnisse in die aktuelle Fachliteratur nur eingeschränkt möglich.

Neben den Mikrogliazellen/Makrophagen tragen auch Astrozyten zum Krankheitsverlauf der EAE bei. Abweichend von den Mikrogliazellen/Makrophagen steigt das Ausmaß der Astroglie mit zunehmender Steifheit. Dies konnte sowohl im Gesamtkollektiv aller Tiere, im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere, in der akuten Phase sowie in der Remissionsphase beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ist in der Schubphase kein signifikanter linearer Zusammenhang feststellbar. Moshayedi et al. konnten ebenfalls eine verstärkte GFAP-Expression auf steiferem Gewebe feststellen ¹⁴⁶. Ferner konnte gezeigt werden, dass Astrozyten auf steiferem Gewebe ihr Verhalten ändern, indem sie beispielsweise ihre Morphologie verändern ^{145,151}.

Diese Ergebnisse und die hiesigen Ergebnisse bekräftigen den linearen Zusammenhang zwischen mechanischen Eigenschaften und der Astrogliose. Der fehlende lineare Zusammenhang in der Schubphase könnte wiederum auf der geringen und nicht aussagekräftigen Fallzahl von $n = 3$ Tieren basieren. Um die hiesigen Ergebnisse zu überprüfen, müsste in weiterführenden Studien die Fallzahl für die Schubphase erhöht werden.

Die Arbeitsgruppe um Schregel et al. konnte zwar ebenfalls einen linearen Zusammenhang zwischen den mechanischen Eigenschaften und der Astrogliose erkennen¹²⁶. Im Gegensatz zu den hiesigen Ergebnissen ist dieser lineare Zusammenhang jedoch negativ¹²⁶. Wie bereits oben angeführt, könnte dies zum einem an der unterschiedlichen Messmethode sowie den unterschiedlich begutachteten ZNS-Regionen liegen, und zum anderen an den unterschiedlich verwendeten Tiermodellen der MS. Die Ergebnisse von Schregel et al. wurden anhand von MRE-Studien generiert. Die so gewonnenen Daten können zwar *in vivo* eine gewisse Interessensregion beurteilen. Die mikrometergenaue Analyse, wie sie durch AFM-Messungen erfolgen kann, ist jedoch nicht möglich. Es könnte daher möglich sein, dass die Daten von Schregel et al. nur einen kleinen Ausschnitt einer Interessensregion zeigen und dieses Bild in einer anderen Region nicht bestätigt werden könnte. Im Vergleich dazu kann das Rückenmark bei AFM-Messmethoden zwar nicht *in vivo*, jedoch mikrometergenau erfasst und analysiert werden. Dies könnte eine potenzielle Erklärung der kontroversen Ergebnisse sein. Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit das EAE-Modell zur Beurteilung der Astrogliose verwendet. Dieses zeichnet sich durch einen schubförmigen Verlauf aus. Im toxisch induzierten Cuprizon-Modell ist diese Einteilung nicht möglich. Durch die fehlende Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Krankheitsstadien im Cuprizon-Modell kann die GFAP-Expression im Krankheitsverlauf nur schwer beurteilt werden. Deshalb ist eine Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Fachliteratur nur eingeschränkt möglich. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen, müssten weitere mechanische und auch immunhistochemische Analysen unter denselben Bedingungen durchgeführt werden.

Die mechanischen Gewebeeigenschaften werden durch die zugrundeliegenden histologischen Strukturen beeinflusst. Ferner besteht auch ein Zusammenhang zwischen den histologischen Strukturen untereinander, insbesondere zwischen der Zelldichte und den weiter begutachteten histologischen Parametern (Mikroglia/Makrophageninfiltration, Demyelinisierungsgrad, Astrogliose).

Die Astrogliose stieg sowohl im Gesamtkollektiv aller Tiere, im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere als auch in den unterschiedlichen Krankheitsstadien mit zunehmender Zelldichte. Astrozyten sind die am häufigsten vorkommenden Zellen des ZNS ¹⁰⁴ und so scheint es auch plausibel, dass mit zunehmender Zellzahl der Astrozytengehalt und damit die GFAP-Expression steigt.

In gleicher Weise korreliert die Zelldichte auch mit dem Ausmaß der Demyelinisierung: Je höher die Zelldichte, um so stärker ist der Grad der Demyelinisierung. Dies war vor allem im Gesamtkollektiv aller Tiere und in der Schubphase erkennbar. Ferner konnte gezeigt werden, dass die GFAP-Expression in der Schubphase am höchsten war. Aktivierte Astrozyten können Myelin schädigen ¹⁰³. Die Schädigung erfolgt durch die Freisetzung direkt toxischer Mediatoren wie Glutamat ^{106,108}, ROS sowie NO oder ATP ¹⁰⁸. Die in der Schubphase erhöhte Astrogliose könnte so zur Zerstörung der Myelinscheide führen. Dieser mögliche Zusammenhang könnte den positiven linearen Zusammenhang zwischen der Zelldichte und dem Ausmaß der Demyelinisierung erklären. Zur Bestätigung dieser Vermutung müssten weitere Analysen, die die Astrogliose mit dem Demyelinisierungsgrad vergleichen, durchgeführt werden.

Wird der Zusammenhang zwischen Zelldichte und Mikroglia/Makrophageninfiltration untersucht, besteht zwischen dem semiquantitativen Score von Iba1 und der Zelldichte im Gesamtkollektiv aller Tiere und der erkrankten Tiere, der akuten Phase und der Schubphase eine positive lineare Korrelation, d. h. mit zunehmender Zellzahl steigt auch der Mikroglia/Makrophagengehalt. In der Remissionsphase ist dies nicht zu beobachten. Eine mögliche Ursache könnten der stagnierende Entzündungsprozess und die einsetzende Remyelinisierung in der Remissionsphase sein. Dies bestätigt auch der geringe semiquantitative Score der Remissionsphase. Um die semiquantitativen Ergebnisse zu bestätigen,

wurden Intensitätsmessungen der jeweiligen Antikörperfärbung durchgeführt. Anders als beim semiquantitativen Score kommt es im Gesamtkollektiv aller Tiere und im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere in der weißen Substanz zur Reduktion des Mikroglia/Makrophagengehalts (gemessen anhand der Intensität) mit zunehmender Zelldichte. Diese kontroversen Ergebnisse könnten beispielsweise aufgrund starker Hintergrundsignale oder Artefakte entstanden sein. Infolgedessen wird ein falsch positives Signal als Antikörpersignal gemessen und könnte möglicherweise zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Bei der Begutachtung mittels des semiquantitativen Scores kann hingegen zwischen Iba1-positiven Zellen und starkem Hintergrundsignal oder Artefakten unterschieden werden, wodurch diese nicht in die Bewertung mit einbezogen werden. Ferner ist die Intensität zweier Schnitte nicht immer vergleichbar. Dies liegt an den nicht immer gleichen Aufnahmeparametern. Die minimale Intensität wurde immer anhand des vorherrschenden Hintergrunds eingestellt. Die maximale Intensität wurde automatisch ermittelt und verwendet. Da nicht immer der gleiche Hintergrund vorhanden war, unterschieden sich die Intensitäten von Bild zu Bild. Unterschiedliche Signalstärken könnten auch aufgrund der nicht immer gleichen Antikörperkonzentration pro Gewebeschnitt entstanden sein. Zwar wurde immer die gleiche Gesamtantikörperkonzentration verwendet, die individuelle Antikörperkonzentration pro Bild könnte trotzdem unterschiedlich sein.

Die oben genannten Gründe könnten eine mögliche Ursache der kontroversen Ergebnisse zwischen dem semiquantitativen Score von Iba1 und der Iba1-Signalstärke darstellen.

Die Schwere der Krankheit steht in einem signifikanten Zusammenhang mit der Zelldichte in der weißen Substanz. Die EAE entsteht durch einen Zusammenbruch der BBB und Einwanderung von pathogenen T-Zellen in das ZNS. Diese werden wiederum reaktiviert und sezernieren unter anderem proinflammatorische Zytokine¹. Durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren und Proteasen kommt es neben der Rekrutierung von B-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und Mastzellen aus dem peripheren Blut auch zur Aktivierung von residenten Zellen wie Astrozyten und Mikrogliazellen¹. Gemeinsam mit den T-Zellen richten

sich die eingewanderten Zellen gegen die Myelinscheide. Da die weiße Substanz fast ausschließlich aus myelinisierten Axonen besteht, scheint es daher plausibel, dass die eingewanderten Zellen vor allem in der weißen Substanz auffindbar sind. Ferner unterhalten die reaktivierten T-Zellen und eingewanderten Zellen den Entzündungsprozess und fördern so die Progression der Krankheit. Es scheint daher möglich und wahrscheinlich, dass die Schwere der EAE mit zunehmender Zelldichte zunimmt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Demyelinisierung mit zunehmendem EAE-Score steigt. Gleiches konnte auch beispielsweise in einer Studie von Batoulis et al. festgestellt werden ¹⁶⁰. Die myelinisierten Axone sind für die schnelle saltatorische Erregungsleitung zuständig. Durch Zerstörung der Myelinscheide kann es zu einer fehlenden und verlangsamten Erregungsweiterleitung kommen. Diese fehlerhafte Signalweiterleitung äußert sich wiederum in neurologischen Ausfallerscheinungen, die bis zu einem gewissen Grad reversibel sind. Die neurologischen Ausfallerscheinungen werden anhand des EAE-Scores bestimmt. Dieser ist umso höher, je ausgeprägter die neurologische Symptomatik ist, d. h. je stärker die Reizweiterleitung gestört ist. Es scheint daher wahrscheinlich, dass der Demyelinisierungsgrad den EAE-Score beeinflusst. Ferner zeigten zwei Tiere in der Remissionsphase keine Symptome. Das Ausmaß der Demyelinisierung war bei beiden dieser Tiere am geringsten ausgeprägt, verglichen mit den Tieren mit EAE-Symptomatik. Dieses Ergebnis bestätigt weiterhin den Zusammenhang zwischen Schwere der Krankheit und Demyelinisierungsgrad, und es scheint daher möglich, dass das Ausmaß der Demyelinisierung das strukturelle Korrelat der klinischen Symptomatik ist.

Die hiesigen Ergebnisse konnten zudem zeigen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Schwere der EAE und der GFAP-Expression besteht. Wie auch bei den beiden anderen begutachteten Parametern (Zelldichte, Demyelinisierungsgrad) steigt das Ausmaß der Astrogliose mit zunehmender Schwere der EAE. Wie bereits oben erwähnt, können aktivierte Astrozyten Myelin schädigen ¹⁰³ und so die Erregungsweiterleitung verhindern. Die steigende GFAP-Expression könnte dementsprechend zu einer verstärkten

Entmarkung der Myelinscheiden führen, was wiederum eine fehlerhafte Erregungsweiterleitung zur Folge hätte. Diese spiegelt sich wiederum in einer verstärkten EAE-Symptomatik wieder.

Ferner reagieren Astrozyten mit Bildung einer Glianarbe auf die destruktiven Vorgänge im ZNS. Glianarben konnten in der Schubphase der EAE festgestellt werden. Das Vorhandensein von Glianarben in der Schubphase ging mit einer erhöhten GFAP-Expression und EAE-Score einher und lässt einen vermeintlichen Zusammenhang zwischen dem EAE-Score und der Astrogliose erkennen. Die Glianarbe stellt eine Art physikalische Barriere um demyelinisierte Areale dar ¹⁰⁴. Dadurch soll verhindert werden, dass sich die Gewebeerstörung weiter ausbreitet ¹⁰³. Das von den Astrozyten gebildete physikalische Hindernis übt jedoch auch einen negativen Effekt auf regenerative Prozesse aus, indem es sowohl die Remyelinisierung als auch die axonale Regeneration verhindert ^{103,106}. Infolge der fehlenden Regenerationsfähigkeit des ZNS durch Bildung von Glianarben sind die neurologischen Ausfallerscheinungen irreversibel und eine Besserung der Symptomatik, welche sich in einer Reduktion des EAE-Scores ausdrücken würde, ist nicht zu erwarten. Zur Bestätigung dieser Annahme müssten weiterführende Analysen, die sich mit der Schwere der EAE und der GFAP-Expression beschäftigen, durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

MS ist eine der häufigsten und bedeutsamsten entzündlichen Autoimmunerkrankungen bei jungen Erwachsenen. Obwohl die klassischen Kennzeichen der Krankheit wie Infiltration von Immunzellen, Demyelinisierung, Astrogliose und axonale Schädigung bekannt sind, sind die genauen Ursachen und die zugrundeliegende Pathophysiologie noch nicht geklärt.

In der Fachliteratur wurden bereits biomechanische Veränderungen mit histologischen Veränderungen im ZNS in Verbindung gebracht. Der genaue Zusammenhang und das Ausmaß zwischen den mechanischen Gewebeeigenschaften und den zugrundeliegenden histologischen Veränderungen wurde bis heute jedoch nur wenig erforscht.

Die vorliegende Arbeit untersuchte in ihrem methodischen Rahmen den möglichen Zusammenhang zwischen den mechanischen Veränderungen des Gewebes und den zugrundeliegenden histologischen Gewebeveränderungen in den unterschiedlichen Krankheitsstadien der EAE, dem Tiermodell der MS.

Die hier dargestellten Experimente konnten demonstrieren, dass das ZNS-Gewebe durch zunehmende Zelldichte steifer wird, während es bei fortschreitender Demyelinisierung zur Erweichung des Gewebes kommt. Ferner wurden die mechanischen Gewebeeigenschaften in den unterschiedlichen Krankheitsstadien der EAE durch die Astrogliose und die Mikroglia/Makrophageninfiltration beeinflusst.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Zusammenhang zwischen den histologischen Veränderungen wie der Zelldichte, dem Demyelinisierungsgrad, der Astrogliose und der Mikroglia/Makrophageninfiltration und den mechanischen Gewebeeigenschaften in den unterschiedlichen Krankheitsstadien der EAE besteht. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass die zugrundeliegenden histologischen Veränderungen ursächlich für die veränderten mechanischen Gewebeeigenschaften sind.

Die Ergebnisse lassen hoffen, dass das Erkennen von mikrostrukturellen Veränderungen durch klinisch anwendbare bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanzelastografie in Zukunft einen neuen diagnostischen Ansatz für

das Erkennen der MS darstellen und ferner sowohl als möglicher Ansatzpunkt neuer Therapiemöglichkeiten der MS dienen als auch bei der Prognoseeinschätzung von MS helfen können.

6 Literaturverzeichnis

1. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
2. Trapp BD, Nave K-A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 2008;31:247-69.
3. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372:1502-17.
4. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006;52:61-76.
5. Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Göppfarth D. Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland: Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung (Originalien). *Der Nervenarzt* 2014;85:990-8.
6. Ruth AM. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *The Lancet Neurology* 2004;3:709-18.
7. Dymnt DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2004;3:104-10.
8. Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. *Human molecular genetics* 1998;7:1229-34.
9. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinavis-Tourniaire P, Moreau T, Group PiMS. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 1998;339:285-91.
10. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *The Lancet Neurology* 2010;9:727-39.
11. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, et al. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Jama* 2003;289:1533-6.
12. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology* 2015;15:545.

13. https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2012/pdf/030-050I_S2e_Multiple_Sklerose_Diagnostik_Therapie_2014-08_verlaengert.pdf. Stand: 27.08.2018, 8:50 Uhr.
14. Vollmer T. The natural history of relapses in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 2007;256:S5-S13.
15. Trapp BD, Ransohoff RM, Fisher E, Rudick RA. Neurodegeneration in multiple sclerosis: relationship to neurological disability. *The Neuroscientist* 1999;5:48-57.
16. Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2009;8:280-91.
17. Dutta R, Trapp BD. Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis—insights from pathology. *Current opinion in neurology* 2014;27:271.
18. Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Current opinion in neurology* 1999;12:295-302.
19. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 2007;17:210-8.
20. Brønnum - Hansen H, Koch - Henriksen N, Stenager E. Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain* 2004;127:844-50.
21. Kingwell E, van der Kop M, Zhao Y, et al. Relative mortality and survival in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:61-6.
22. Hirst C, Swingler R, Compston D, Ben-Shlomo Y, Robertson NP. Survival and cause of death in multiple sclerosis: a prospective population-based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2008;79:1016-21.
23. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001;7:115-21.
24. Disanto G, Morahan J, Barnett M, Giovannoni G, Ramagopalan S. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2012;78:823-32.

25. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung H-P. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* 2006;2:201.
26. Grigoriadis N, Pesch V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European journal of neurology* 2015;22:3-13.
27. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nature immunology* 2001;2:762.
28. Keegan B, Mark NJH. Multiple Sclerosis. *Annu Rev Med* 2002;53:285-302.
29. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996;85:299-302.
30. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Archives of neurology* 2005;62:865-70.
31. Tintore M, Rovira A, Brieva L, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. *Multiple Sclerosis Journal* 2001;7:359-63.
32. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology* 2012;11:157-69.
33. Joseph FG, Hirst CL, Pickersgill TP, Ben-Shlomo Y, Robertson NP, Scolding NJ. CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2009;80:292-6.
34. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neurology* 2012;8:613.
35. Cepok S, Jacobsen M, Schock S, et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001;124:2169-76.
36. Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R, et al. Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. *PloS one* 2008;3:e2559.

37. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassman H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology* 2000;47:707-17.
38. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing–remitting multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2008;358:676-88.
39. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, et al. Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2017;376:209-20.
40. Rivera A, Chen C-C, Ron N, Dougherty JP, Ron Y. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *International immunology* 2001;13:1583-93.
41. Harp CT, Lovett-Racke AE, Racke MK, Frohman EM, Monson NL. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clinical Immunology* 2008;128:382-91.
42. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, et al. MHC class II–dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 2013;210:2921-37.
43. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B - cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathology* 2004;14:164-74.
44. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007;130:1089-104.
45. Fletcher JM, Lalor S, Sweeney C, Tubridy N, Mills K. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical & Experimental Immunology* 2010;162:1-11.

46. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of multiple sclerosis. *European journal of pharmacology* 2015;759:182-91.
47. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathology* 2017;27:123-37.
48. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica* 2009;118:723-36.
49. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathology* 2001;11:107-16.
50. Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S. Experimental autoimmune encephalomyelitis—achievements and prospective advances. *Apmis* 2011;119:819-30.
51. Oleszak EL, Chang JR, Friedman H, Katsetos CD, Platsoucas CD. Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. *Clinical microbiology reviews* 2004;17:174-207.
52. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta neuropathologica* 2017;133:223-44.
53. Tsunoda I, Fujinami RS. Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmune pharmacology* 2010;5:355-69.
54. Constantinescu CS, Farooqi N, O'brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology* 2011;164:1079-106.
55. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006;129:1953-71.
56. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annual review of immunology* 1990;8:579-621.

57. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Reviews Immunology* 2007;7:904.
58. Koritschoner R, Schweinburg F. Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitätsf Exp Therapie* 1925;42:217-83.
59. Rivers TM, Sprunt D, Berry G. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *Journal of Experimental Medicine* 1933;58:39-53.
60. Freund J, McDermott K. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 1942;49:548-53.
61. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols* 2006;1:1810.
62. 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. *The Journal of Immunology* 2002;169:117-25.
63. Chen X, Howard OZ, Oppenheim JJ. Pertussis toxin by inducing IL-6 promotes the generation of IL-17-producing CD4 cells. *The Journal of Immunology* 2007;178:6123-9.
64. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 2006;177:566-73.
65. Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of molecular medicine* 1997;75:165-73.
66. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *Journal of Experimental Medicine* 2003;197:1073-81.

67. Pöllinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *Journal of Experimental Medicine* 2009;206:1303-16.
68. Tuohy V, Sobel R, Lees M. Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. *The Journal of Immunology* 1988;140:1868-73.
69. Kuerten S, Lichtenegger FS, Faas S, Angelov DN, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice. *Journal of neuroimmunology* 2006;177:99-111.
70. Tuohy V, Lu Z, Sobel R, Laursen R, Lees M. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *The Journal of Immunology* 1989;142:1523-7.
71. Bernard C. EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALO - MYELITIS IN MICE: GENETIC CONTROL OF SUSCEPTIBILITY. *International Journal of Immunogenetics* 1976;3:263-74.
72. Fritz R, Zhao ML. Active and passive experimental autoimmune encephalomyelitis in strain 129/J (H - 2b) mice. *Journal of neuroscience research* 1996;45:471-4.
73. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 2009;132:1175-89.
74. Lassmann H, van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS letters* 2011;585:3715-23.
75. Rawji KS, Yong VW. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clinical and Developmental Immunology* 2013;2013.
76. David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience* 2011;12:388.
77. Ransohoff RM. Mechanisms of inflammation in MS tissue: adhesion molecules and chemokines. *Journal of neuroimmunology* 1999;98:57-68.

78. Rasmussen S, Wang Y, Kivisäkk P, et al. Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2007;130:2816-29.
79. Nikić I, Merkler D, Sorbara C, et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* 2011;17:495.
80. Schonberg DL, Goldstein EZ, Sahinkaya FR, Wei P, Popovich PG, McTigue DM. Ferritin stimulates oligodendrocyte genesis in the adult spinal cord and can be transferred from macrophages to NG2 cells in vivo. *Journal of Neuroscience* 2012;32:5374-84.
81. Shechter R, London A, Varol C, et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS medicine* 2009;6:e1000113.
82. Yin Y, Henzl MT, Lorber B, et al. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nature neuroscience* 2006;9:843.
83. Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nature neuroscience* 2013;16:1211.
84. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 2009;462:94.
85. Takeuchi H, Mizuno T, Zhang G, et al. Neuritic beading induced by activated microglia is an early feature of neuronal dysfunction toward neuronal death by inhibition of mitochondrial respiration and axonal transport. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:10444-54.
86. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 1998;338:278-85.
87. Lüllmann-Rauch; R, Paulsen F. *Taschenlehrbuch Histologie*: Thieme Verlag; 2012; 4 Auflage; S. 196-200.

88. Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nature Reviews Neuroscience* 2002;3:705.
89. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005;128:2705-12.
90. Hofman F, Hinton D, Johnson K, Merrill J. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *Journal of Experimental Medicine* 1989;170:607-12.
91. Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Annals of neurology* 1988;23:339-46.
92. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis: correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000;123:1174-83.
93. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP-Y. TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature neuroscience* 2001;4:1116.
94. Prineas J, Graham J. Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Annals of neurology* 1981;10:149-58.
95. Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody - and complement - mediated demyelination. *Annals of neurology* 1998;43:465-71.
96. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis—new concepts. *Brain research bulletin* 2003;61:321-6.
97. Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, et al. Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2003;62:25-33.
98. Lassmann H. Heterogene Mechanismen der Entmarkung und Axondegeneration in Multiple-Sklerose-Herden: diagnostische und therapeutische Konsequenzen. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 2003;4:11-5.

99. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *New England Journal of Medicine* 2006;354:942-55.
100. Itoyama Y, Sternberger NH, Richardson EP, Walker DL, Quarles RH, Padgett BL. Distribution of papovavirus, myelin - associated glycoprotein, and myelin basic protein in progressive multifocal leukoencephalopathy lesions. *Annals of neurology* 1982;11:396-407.
101. Williams A, Piaton G, Lubetzki C. Astrocytes—friends or foes in multiple sclerosis? *Glia* 2007;55:1300-12.
102. He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007;39:661-5.
103. Correale J, Farez MF. The role of astrocytes in multiple sclerosis progression. *Frontiers in neurology* 2015;6:180.
104. Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cellular and molecular life sciences* 2008;65:2702.
105. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001;36:180-90.
106. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 1993;54:15-36.
107. Selmaj K, Farooq M, Norton W, Raine C, Brosnan C. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology* 1990;144:129-35.
108. Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia* 2013;61:453-65.
109. Franke H, Verkhratsky A, Burnstock G, Illes P. Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic signalling* 2012;8:629-57.
110. Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N - acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Annals of neurology* 2000;48:893-901.
111. Davie C, Barker G, Webb S, et al. Persistent functional deficit in multiple sclerosis and autosomal dominant cerebellar ataxia is associated with axon loss. *Brain* 1995;118:1583-92.

112. Dutta R, McDonough J, Yin X, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Annals of neurology* 2006;59:478-89.
113. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain: a journal of neurology* 1997;120:393-9.
114. Smith KJ, Kapoor R, Hall SM, Davies M. Electrically active axons degenerate when exposed to nitric oxide. *Annals of neurology* 2001;49:470-6.
115. Redford E, Kapoor R, Smith K. Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain: a journal of neurology* 1997;120:2149-57.
116. Kapoor R, Davies M, Blaker PA, Hall SM, Smith KJ. Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide - mediated degeneration. *Annals of neurology* 2003;53:174-80.
117. Waxman SG. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nature Reviews Neuroscience* 2006;7:932.
118. Craner MJ, Newcombe J, Black JA, Hartle C, Cuzner ML, Waxman SG. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1. 2 and Nav1. 6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:8168-73.
119. Zamboni JL, Zhao C, Ohno N, et al. Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis. *Brain* 2011;134:1901-13.
120. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2002;1:232-41.
121. Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, et al. Nitric oxide - mediated mitochondrial damage in the brain: Mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *Journal of neurochemistry* 1997;68:2227-40.
122. Ouardouz M, Coderre E, Basak A, et al. Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: I. GluR6 kainate receptors. *Annals of neurology* 2009;65:151-9.

123. Compston A, Lassmann H, McDonald I. The story of multiple sclerosis. *McAlpine's Multiple Sclerosis* London: Churchill Livingstone 2006:3-68.
124. Bakshi R, Thompson AJ, Rocca MA, et al. MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. *The Lancet Neurology* 2008;7:615-25.
125. Wuerfel J, Paul F, Beierbach B, et al. MR-elastography reveals degradation of tissue integrity in multiple sclerosis. *Neuroimage* 2010;49:2520-5.
126. Schregel K, née Tysiak EW, Garteiser P, et al. Demyelination reduces brain parenchymal stiffness quantified in vivo by magnetic resonance elastography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109:6650-5.
127. Riek K, Millward JM, Hamann I, et al. Magnetic resonance elastography reveals altered brain viscoelasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *NeuroImage: Clinical* 2012;1:81-90.
128. Streitberger K-J, Sack I, Krefting D, et al. Brain viscoelasticity alteration in chronic-progressive multiple sclerosis. *PloS one* 2012;7:e29888.
129. Fehlner A, Behrens JR, Streitberger KJ, et al. Higher - resolution MR elastography reveals early mechanical signatures of neuroinflammation in patients with clinically isolated syndrome. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2016;44:51-8.
130. Lipp A, Trbojevic R, Paul F, et al. Cerebral magnetic resonance elastography in supranuclear palsy and idiopathic Parkinson's disease. *NeuroImage: Clinical* 2013;3:381-7.
131. Murphy MC, Huston J, Jack CR, et al. Decreased brain stiffness in Alzheimer's disease determined by magnetic resonance elastography. *Journal of magnetic resonance imaging* 2011;34:494-8.
132. Sack I, Streitberger K-J, Krefting D, Paul F, Braun J. The influence of physiological aging and atrophy on brain viscoelastic properties in humans. *PloS one* 2011;6:e23451.
133. Klein C, Hain EG, Braun J, et al. Enhanced adult neurogenesis increases brain stiffness: in vivo magnetic resonance elastography in a mouse model of dopamine depletion. *PLoS One* 2014;9:e92582.

134. Freimann FB, Müller S, Streitberger KJ, et al. MR elastography in a murine stroke model reveals correlation of macroscopic viscoelastic properties of the brain with neuronal density. *NMR in Biomedicine* 2013;26:1534-9.
135. Millward JM, Guo J, Berndt D, Braun J, Sack I, Infante - Duarte C. Tissue structure and inflammatory processes shape viscoelastic properties of the mouse brain. *NMR in Biomedicine* 2015;28:831-9.
136. Koser DE, Moeendarbary E, Hanne J, Kuerten S, Franze K. CNS cell distribution and axon orientation determine local spinal cord mechanical properties. *Biophysical journal* 2015;108:2137-47.
137. Christ AF, Franze K, Gautier H, et al. Mechanical difference between white and gray matter in the rat cerebellum measured by scanning force microscopy. *Journal of biomechanics* 2010;43:2986-92.
138. Ozawa H, Matsumoto T, Ohashi T, Sato M, Kokubun S. Comparison of spinal cord gray matter and white matter softness: measurement by pipette aspiration method. *Journal of Neurosurgery: Spine* 2001;95:221-4.
139. Kruse SA, Rose GH, Glaser KJ, et al. Magnetic resonance elastography of the brain. *Neuroimage* 2008;39:231-7.
140. Franze K, Janmey PA, Guck J. Mechanics in neuronal development and repair. *Annual review of biomedical engineering* 2013;15:227-51.
141. Franze K, Guck J. The biophysics of neuronal growth. *Reports on Progress in Physics* 2010;73:094601.
142. Franze K. The mechanical control of nervous system development. *Development* 2013;140:3069-77.
143. Moore SW, Sheetz MP. Biophysics of substrate interaction: influence on neural motility, differentiation, and repair. *Developmental neurobiology* 2011;71:1090-101.
144. Jagielska A, Norman AL, Whyte G, Vliet KJV, Guck J, Franklin RJ. Mechanical environment modulates biological properties of oligodendrocyte progenitor cells. *Stem cells and development* 2012;21:2905-14.
145. Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, Sawyer ES, Janmey PA. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over

- glial growth in mixed cortical cultures. *Biophysical journal* 2006;90:3012-8.
146. Moshayedi P, Ng G, Kwok JC, et al. The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials* 2014;35:3919-25.
 147. Flanagan LA, Ju Y-E, Marg B, Osterfield M, Janmey PA. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 2002;13:2411.
 148. Koser DE, Thompson AJ, Foster SK, et al. Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nature neuroscience* 2016;19:1592.
 149. Bollmann L, Koser DE, Shahapure R, et al. Microglia mechanics: immune activation alters traction forces and durotaxis. *Frontiers in cellular neuroscience* 2015;9:363.
 150. Lourenço T, De Faria JP, Bippes CA, et al. Modulation of oligodendrocyte differentiation and maturation by combined biochemical and mechanical cues. *Scientific reports* 2016;6:21563.
 151. Moshayedi P, da F Costa L, Christ A, et al. Mechanosensitivity of astrocytes on optimized polyacrylamide gels analyzed by quantitative morphometry. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2010;22:194114.
 152. Urbanski MM, Kingsbury L, Moussouros D, et al. Myelinating glia differentiation is regulated by extracellular matrix elasticity. *Scientific reports* 2016;6:33751.
 153. Lantoine J, Grevesse T, Villers A, et al. Matrix stiffness modulates formation and activity of neuronal networks of controlled architectures. *Biomaterials* 2016;89:14-24.
 154. Xue Jiang PCG, Baogang Li, Yangzhou Du, Melinda K. Kutzinger, Michelle L. Previtera, Noshir A. Langrana, Bonnie L. Firestein. Cell growth in response to mechanical stiffness is affected by neuron-astroglia interactions. *The Open Neuroscience Journal* 2007;1:7-14.
 155. Yu X, Bellamkonda RV. Dorsal root ganglia neurite extension is inhibited by mechanical and chondroitin sulfate - rich interfaces. *Journal of neuroscience research* 2001;66:303-10.

156. Koser DE. Biomechanical Control of the Developing and Diseased Central Nervous System Universität zu Köln; 2016.
157. Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, et al. MP4-and MOG: 35–55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *Journal of neuroimmunology* 2007;189:31-40.
158. Mitra P, Brownstone RM. An in vitro spinal cord slice preparation for recording from lumbar motoneurons of the adult mouse. *Journal of neurophysiology* 2012;107:728-41.
159. Hutter JL, Bechhoefer J. Calibration of atomic - force microscope tips. *Review of Scientific Instruments* 1993;64:1868-73.
160. Batoulis H, Uhl M, Addicks K, Lehmann PV, Kuerten S. The magnitude of the antigen - specific T cell response is separated from the severity of spinal cord histopathology in remitting - relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 2012;60:794-805.
161. Weickenmeier J, de Rooij R, Budday S, Steinmann P, Ovaert T, Kuhl E. Brain stiffness increases with myelin content. *Acta biomaterialia* 2016;42:265-72.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht über die verschiedenen Verlaufsformen der MS.....	5
Abbildung 2 Repräsentative Beispielbilder für den semiquantitativen Score von Iba1 (rot), MBP, GFAP (grün) und CD3 ⁺ (rot), alle Bilder mit DAPI-positiven Zellkernen (blau) überlagert.	42
Abbildung 3 Bestimmung der Zelldichte am Beispiel der weißen Substanz.	44
Abbildung 4 Mikroglia/Makrophageninfiltration im gesunden Rückenmark.....	48
Abbildung 5 Mikroglia/Makrophageninfiltration in der akuten Phase der EAE.....	49
Abbildung 6 Mikroglia/Makrophageninfiltration in der Remissionsphase der EAE.....	50
Abbildung 7 Mikroglia/Makrophageninfiltration in der Schubphase der EAE.....	51
Abbildung 8 Veränderung der Mikroglia/Makrophageninfiltration im Krankheitsverlauf der EAE.	51
Abbildung 9 Myelinisierungsgrad im gesunden Rückenmark.	53
Abbildung 10 Ausmaß der Demyelinisierung in der akuten Phase der EAE.....	54
Abbildung 11 Ausmaß der Demyelinisierung in der Remissionsphase der EAE.	55
Abbildung 12 Ausmaß der Demyelinisierung in der Schubphase der EAE.....	56
Abbildung 13 Veränderung der Demyelinisierung im Krankheitsverlauf der EAE.....	56
Abbildung 14 GFAP-Expression im gesunden Rückenmark.....	58
Abbildung 15 Astrogliose in der akuten Phase der EAE.	59
Abbildung 16 Astrogliose in der Remissionsphase der EAE.....	60
Abbildung 17 Ausmaß der Astrogliose in der Schubphase der EAE.	61
Abbildung 18 Veränderung der GFAP-Expression im Krankheitsverlauf der EAE.	61
Abbildung 19 T-Zellinfiltration im gesunden Rückenmark.....	63
Abbildung 20 T-Zellinfiltration in der akuten Phase der EAE.	64
Abbildung 21 T-Zellinfiltration in der Remissionsphase der EAE.....	65
Abbildung 22 T-Zellinfiltration in der Schubphase der EAE.	66
Abbildung 23 Vergleich der Iba1-Fluoreszenzintensitäten in allen Stadien der weißen Substanz.	67
Abbildung 24 Vergleich der Iba1-Fluoreszenzintensitäten in allen drei Stadien der grauen Substanz.....	68
Abbildung 25 Vergleich der MBP-Signalstärken in der weißen Substanz mit der der grauen Substanz.....	69
Abbildung 26 Veränderung der MBP-Signalstärke im Krankheitsverlauf der EAE.	70
Abbildung 27 Vergleich der GFAP-Fluoreszenzintensitäten zwischen weißer und grauer Substanz.....	71
Abbildung 28 Vergleich der GFAP-Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Stadien mit den Kontrollen in der weißen Substanz.....	72
Abbildung 29 Vergleich der Zelldichte zwischen weißer Substanz und grauer Substanz.....	73

Abbildung 30 Vergleich der Zelldichte im Krankheitsverlauf der EAE mit der der Kontrolltiere. .74	74
Abbildung 31 Veränderungen der histologischen Parameter (Mikroglia/Makrophageninfiltration (Iba1, rot), Demyelinisierungsgrad (MBP, grün), Astrogliose (GFAP, grün) und Zelldichte (DAPI, blau)) in den unterschiedlichen Stadien der EAE (Akut, Remission, Schub, Kontrolle).77	77
Abbildung 32 Linearer Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der Mikroglia/Makrophageninfiltration (links), dem Ausmaß der Demyelinisierung (Mitte) sowie der Astrogliose (rechts).78	78
Abbildung 33 Linearer Zusammenhang zwischen der Zelldichte und dem Ausmaß der Astrogliose im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere.79	79
Abbildung 34 Korrelation zwischen der Zelldichte und der Astrogliose in der akuten Phase in der weißen Substanz und grauen Substanz.79	79
Abbildung 35 Korrelation zwischen der Zelldichte und der Mikroglia/Makrophageninfiltration im Gesamtkollektiv in der weißen Substanz.81	81
Abbildung 36 Vergleich der Steifheit zwischen weißer Substanz und grauer Substanz.83	83
Abbildung 37 Linearer Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Astrogliose im Gesamtkollektiv aller Tiere.84	84
Abbildung 38 Korrelation zwischen der Steifheit und der Astrogliose in der weißen Substanz. .85	85
Abbildung 39 Linearer Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Mikroglia/Makrophageninfiltration.86	86
Abbildung 40 Korrelation zwischen der Steifheit und der Mikroglia/Makrophageninfiltration in der Remissionsphase in der grauen Substanz.86	86
Abbildung 41 Zusammenhang zwischen der Steifheit und dem Demyelinisierungsgrad in allen Krankheitsstadien der EAE.87	87
Abbildung 42 Zusammenhang zwischen der Steifheit und der Astrogliose (GFAP-Score) in der weißen Substanz.88	88
Abbildung 43 Korrelation der Steifheit mit der Zelldichte im Gesamtkollektiv aller Tiere (links) sowie im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (rechts) innerhalb der weißen Substanz. .89	89
Abbildung 44 Zusammenhang zwischen Steifheit und Zelldichte in der weißen Substanz in allen Krankheitsstadien der EAE.90	90
Abbildung 45 Linearer Zusammenhang zwischen dem EAE-Score und der Zelldichte im Gesamtkollektiv aller Tiere.91	91
Abbildung 46 Zusammenhang zwischen der Schwere der Krankheit (EAE-Score) und der Zelldichte (DAPI).92	92
Abbildung 47 Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der EAE und dem Ausmaß der Demyelinisierung im Gesamtkollektiv aller Tiere (links), sowie im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (rechts).93	93

Abbildung 48 Zusammenhang zwischen der Schwere der EAE und der Astrogliose im Gesamtkollektiv aller Tiere (links) sowie im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (rechts).
.....93

Abbildung 49 Korrelation zwischen dem EAE-Score und der Mikroglia/Makrophageninfiltration im Gesamtkollektiv aller Tiere (links) sowie im Gesamtkollektiv der erkrankten Tiere (rechts).
.....94

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung der Versuchstiere.	33
--	----

9 Danksagung

Ich danke allen Beteiligten, ganz besonders aber meiner Doktormutter Prof. Dr. Stefanie Kürten für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, an ihrem Lehrstuhl promovieren zu dürfen. Ich möchte mich für ihre aufgeschlossene Art und Geduld sowie ihr persönliches Engagement bedanken. Zu jeder Zeit war ich mir ihrer Unterstützung und jeglicher Hilfe gewiss und konnte so sehr von ihrem Erfahrungsschatz und ihrer Expertise profitieren. Ihre fachliche Begleitung und ihr ermutigendes und dennoch kritisches Interesse verhalfen mir zu neuen Ideen und justierten meinen Fokus auf das Wesentliche. In förderlicher Atmosphäre half mir ihre einzigartige, zielstrebige, faszinierende Art über Arbeitsflauten hinweg und weckte neuen Ehrgeiz in mir. Wie selbstverständlich wurden mir durch sie sämtliche Fördermittel jeglicher Art, seien es technische Hilfsmittel, Räumlichkeiten sowie geistige und mentale Unterstützung zur Verfügung gestellt. Ihre beeindruckende Kompetenz und ihr hervorragendes Fachwissen bereicherten meine wissenschaftliche Arbeit allgemein. Liebe Steffi, ich möchte mich dafür ganz herzlich bei dir Bedanken.

Mein Dank gilt auch Professor Dr. med. Süleyman Ergün für die Möglichkeit, an seinem Institut promovieren zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Mentor Dr. David Koser für die herausragende, begeisterte und freundschaftliche Begleitung dieser Arbeit. Er übertrug die Begeisterung für dieses Projekt und generell die Passion für das wissenschaftliche Arbeiten auf mich und stand mir bei Problemen stets mit einem offenen Ohr zur Seite. Ich danke ihm für die gute Zusammenarbeit und die spannende Zeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Giovanna Pommerschein bedanken. Trotz Laboralltag hat sie Zeit für mich und meine Arbeit gefunden und mir bei der Datenerhebung geholfen. Ohne ihre vertrauensvolle Umgangsweise und stetige Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterer Dank gilt Marie Wunsch für die Unterstützung und Geduld während der Laborarbeit. Sie hat trotz knapp bemessener Zeit immer Zeit für mich gefunden, um mich in die Laborarbeit und das wissenschaftliche Arbeiten einzuarbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei der medizinisch-technischen Assistentin Brigitte Treffny bedanken, für ihre Unterstützung bei den praktischen Arbeiten in der experimentellen Phase.

Außerdem möchte ich mich noch bei Elenora Emilia Meier und Erna Kleinschrot für die tatkräftige Unterstützung bei der Vorarbeit dieser Dissertation bedanken.

Mein Dank gilt auch meinem Freund Michael Hofmeister, für seine unermüdliche Geduld und Motivation während dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei meiner Familie bedanken, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit stets unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht dabei an meine Eltern für den einzigartigen Rückhalt und die tolle Unterstützung während meines Studiums und der Promotion. Sie haben immer an mich geglaubt, standen mir jederzeit zur Seite und waren ein Vorbild für mich. Und nicht zu vergessen an meinen Bruder, Julius Groth, der immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Oma, Adelheid Becker, für ihre Liebe und zeitlebende Unterstützung bedanken.

10 Lebenslauf

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sofie Claire Groth an Eides statt, die Dissertation „Korrelation der Elastizität von Rückenmarksgewebe und histologischen Veränderungen in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt, und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Bei der Vorarbeit, den immunhistologischen Färbungen und der Bildaufnahme habe ich Unterstützung von folgenden Personen erhalten:

Dr. David E. Koser, Giovanna Pommerschein, Brigitte Treffny, Eleonora Emilia Maier

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Fürstenfeldbruck, den 28.08.2018

Sofie Claire Groth