



**Studien zur Inflammation und neuronalem Schaden in
genetischen Modellen von progredienter Multipler Sklerose**

**Studies in inflammation and neuronal damage in genetic
models of progressive multiple sclerosis**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

David Stadler

aus

Rom

Würzburg 2020

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Kastenmüller

1. Betreuer: Prof. Dr. Rudolf Martini

2. Betreuer: Prof. Dr. Anna-Leena Sirén

3. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Lutz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Studies in inflammation and neuronal damage in genetic models of progressive multiple sclerosis” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

München, 17.09.2020
Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Studien zur Inflammation und neuronalem Schaden in genetischen Modellen von progredienter Multipler 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.

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

München, 17.09.2020
Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Systematik des zentralen Nervensystems	1
1.2. Myelin im zentralen Nervensystem	2
1.3. Multiple Sklerose und ihre Subformen	4
1.4. Histopathologie aktiver Läsionen	6
1.5. Primär progressive Multiple Sklerose.....	9
1.6. Autoimmune oder neurodegenerative Erkrankung?.....	10
1.7. Generierung eines Mausmodells für progrediente Multiple Sklerose basierend auf Mutationen im Proteolipid Protein 1 Gen.....	12
1.8. Ziel der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Mausmodell.....	16
2.2. Gewebepräparation.....	16
2.3. Immunhistochemie	17
2.3.1. Immunhistochemie nach CD4 positiven Zellen	17
2.3.2. Immunhistochemie nach CD8 positiven Zellen	18
2.3.3. Immunhistochemie nach F4/80 positiven Zellen	19
2.3.4. Immunhistochemie nach SMI-32 positiven Sphäroiden	19
2.4. Nissl-Färbung nach Retinaganglienzellen.....	20
2.5. Optische Kohärenztomographie (OCT).....	20
2.6. Elektronenmikroskopische Auswertung	21
2.7. Rotarod	22
2.8. Statistische Methoden.....	22
3. Ergebnisse	24
3.1. Histopathologische Untersuchungen.....	24

3.2. Entzündliche Vorgänge in den Mausmutanten.....	32
3.3. Klinischer Phänotyp	38
4. Diskussion	41
4.1. Klinische Ausprägung der Mutationen.....	41
4.2. Schaden an Neuron und Myelin	42
4.3. Immunzellen.....	46
4.3.1. Auswirkung des angeborenen Immunsystems	46
4.3.2. Auswirkungen des adaptiven Immunsystems	49
4.4. Schaden an Myelin und Neuron unter inflammatorischen Bedingungen	52
4.5. Möglicher Schädigungsmechanismus.....	53
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis	60
7. Abbildungsverzeichnis.....	79
8. Anhang	80
8.1. Technische Geräte.....	80
8.2. Software	81
8.3. Reagenzien.....	81
8.4. Puffer und Lösungen.....	83
8.5. Antikörper.....	84
9. Abkürzungsverzeichnis	85
10. Danksagung	89
11. Lebenslauf.....	91

Ein Teil der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Groh J, Friedman HC, Orel N, Ip CW, Fischer S, Spahn I, Schäffner E, Hörner M, Stadler D, Buttman M, Varallyay C, Solymosi L, Sendtner M, Peterson AC, Martini R (2016) Pathogenic inflammation in the CNS of mice carrying human PLP1 mutations. *Hum Mol Genet* 25(21):4686–4702. doi:10.1093/hmg/ddw296

1. Einleitung

1.1. Systematik des zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst Gehirn und Rückenmark. Diese sind in die Hirnhäute, sogenannte Meningen, und in das Hirnwasser, auch Liquor, eingebettet. Das Gehirn kann weiterhin in unterschiedliche Anteile unterschieden werden, die auch für verschiedene Funktionen zuständig sind. So folgt auf das Rückenmark zunächst der Hirnstamm, bestehend aus dem verlängerten Mark (Medulla oblongata), der Brücke (Pons) und dem Mittelhirn (Mesencephalon). Dorsal des Hirnstammes liegt das Kleinhirn (Cerebellum), zuständig für Erlernen, Koordination und Feinabstimmung von Bewegungen. Nach kranial folgt dann das Zwischenhirn (Diencephalon), mit dem Thalamus, dem Hypothalamus, dem Subthalamus, dem Epithalamus und der Epiphyse. Nach außen gelangt man schließlich zum Großhirn (Telencephalon) [1]. Makroskopisch kann man das ZNS grob in die weiße und graue Substanz unterscheiden. In der grauen Substanz finden sich hauptsächlich die Perikarya der Neurone sowie das Neuropil (eine Ansammlung von Dendriten, Nervenfasern und Gliazellen) wieder, während sich bei der weißen Substanz die mit Myelin ummantelten Axone dieser Neurone befinden. In der Großhirnrinde befindet sich die weiße Substanz hauptsächlich im Inneren, dem deshalb sogenannten Marklager. Nach außen wird das Marklager von der grauen Substanz ummantelt, dem sogenannten Cortex. Allerdings gibt es auch in den zentraleren Anteilen des Gehirns Ansammlungen von grauer Substanz, die Kerngebiete oder Nuclei [2]. Neben den Neuronen finden sich im ZNS außerdem verschiedene Gliazellen. Ein Teil dieser Glia besteht aus Astroglia oder Astrozyten, die neben anderen wichtigen Aufgaben für die Stabilität des ZNS sowie der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zuständig sind. Weiter haben sie wichtige Eigenschaften in der Synapsenbildung sowie der Wiederaufnahme der Transmitter aus dem synaptischen Spalt [3, 4]. Sie spielen auch unter inflammatorischen Bedingungen eine Rolle, da sie unter anderem einen Einfluss auf die Leukozytenmigration sowie die Bildung pro- und antiinflammatorischer Zytokine haben [5]. Weitere Gliazellen sind die

Oligodendrozyten (ODZ), die für den Aufbau der Myelinscheide zuständig sind, worauf im Folgenden noch genauer eingegangen wird.

Ungefähr zehn Prozent der zentralen Gliazellen bestehen aus Mikrogliazellen. Diese stammen von Vorläuferzellen aus dem Dottersack ab und sind bereits in der Fetalzeit in das ZNS eingewandert und bilden hier eine eigenständige Zellpopulation. In anderen Geweben wurden diese Vorläuferzellen in der weiteren Entwicklung durch Monozyten ersetzt, die aus dem Knochenmark stammen [6, 7]. Nichtsdestotrotz ähneln die Aufgaben der Mikroglia, denen der Makrophagen. So sind auch sie phagozytierende Abwehrzellen, die unter anderem neurotoxische Substanzen sezernieren, als Antigen präsentierende Zelle fungieren und untergegangenes Gewebe oder Antigen-Antikörper-Komplexe phagozytieren können [1, 2]. Weiter scheinen Mikroglia in der Entwicklung und Plastizität der Synapsen beteiligt zu sein, ein Teil des Komplementsystems zu sein sowie eine wichtige Rolle in der ZNS-Homöostase und Gewebereparatur zu spielen [6].

1.2. Myelin im zentralen Nervensystem

Wie bereits angesprochen kommen im ZNS neben den sogenannten marklosen Fasern, myelinisierte Axone vor. Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem sind für die Myelinisierung allerdings keine Schwann-Zellen, sondern die sogenannten Oligodendrozyten verantwortlich. Diese können mit ihrer Myelinhülle nicht nur ein Axon, sondern bis zu 60 Axone umschließen [8]. Zwischen diesen Segmenten kommt es zur Ausbildung von nicht-myelinisierten Einschnürungen, den sogenannten Ranvier'schen Schnürringen. An dieser Stelle des Axons sammeln sich die Natrium-Kanäle und bilden so die Grundlage für die saltatorische Erregungsleitung. Diese ist dafür verantwortlich, dass es zu einer schnelleren Erregungsausbreitung kommt, verglichen zu nicht-myelinisierten Fasern. Somit ist eine wesentliche Aufgabe des Myelins die Aufrechterhaltung der schnellen Erregungsleitung. Es wird aber auch vermutet, dass die Oligodendrozyten zusätzlich für die Aufrechterhaltung der axonalen Funktion und für die Versorgung der Axone zuständig sind [9]. Die Myelinscheide besteht aus der inneren und äußeren Plasmamembran der Oligodendrozyten, die sich

mehrmals um das Axon wickeln. Hierbei bilden sich die sogenannte ‚major dense line‘ und die ‚intraperiod line‘ [10]. Das Myelin selbst besteht zu 70% aus Lipiden und zu 30% aus Proteinen. Im kompakten Teil des Myelins im ZNS kommen verschiedene Proteine vor, wobei das Proteolipid Protein (PLP) und das Basische-Myelin Protein (MBP) den Großteil dieser Proteine ausmachen (Abbildung 1). MBP scheint für die Kompaktierung der ‚major dense line‘ verantwortlich zu sein [11, 12]. Auch für PLP wird vermutet, dass es in der Stabilisierung der Myelinschicht eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zur Myelinscheide des peripheren Nervensystems besitzen die zentralnervösen Nervenfasern keine Basalmembran [1, 2, 10, 13].

Wie bereits kurz angesprochen stellt das PLP zusammen mit dem MBP mit 60-80% einen Großteil der Proteine des zentralnervösen Myelins. Es hat ein Molekulargewicht von 30 kDa und besitzt 276 Aminosäuren [14]. Es wird angenommen, dass PLP eine Funktion bei der Stabilisierung der ‚intraperiod line‘ genannten Struktur besitzt und damit der Aufrechterhaltung der Myelinscheide im ZNS dient. Neben PLP existiert noch eine alternativ geschnittene Isoform, DM-20. Es wird vermutet, dass diese Unterform neben strukturellen Aufgaben auch früh in der Entwicklung des ZNS eine Rolle spielt, vor allem in der Oligodendrozytenmigration und -differenzierung. Allerdings scheinen PLP und DM-20 bei der Myelinbildung keine essentielle Rolle zu spielen, so kommt es in PLP knockout Mäusen zunächst zu einer normalen Entwicklung und erst im Verlauf zur axonalen Degeneration im ZNS [15, 16].

Da Myelin wichtige Aufgaben im ZNS übernimmt, ist es kaum überraschend, dass es bei Beeinträchtigungen der Myelinschicht zu neurologischen Erkrankungen kommen kann. Eine der bekanntesten stellt die Multiple Sklerose dar, eine Erkrankung, die unter anderem durch eine Demyelinisierung charakterisiert ist.

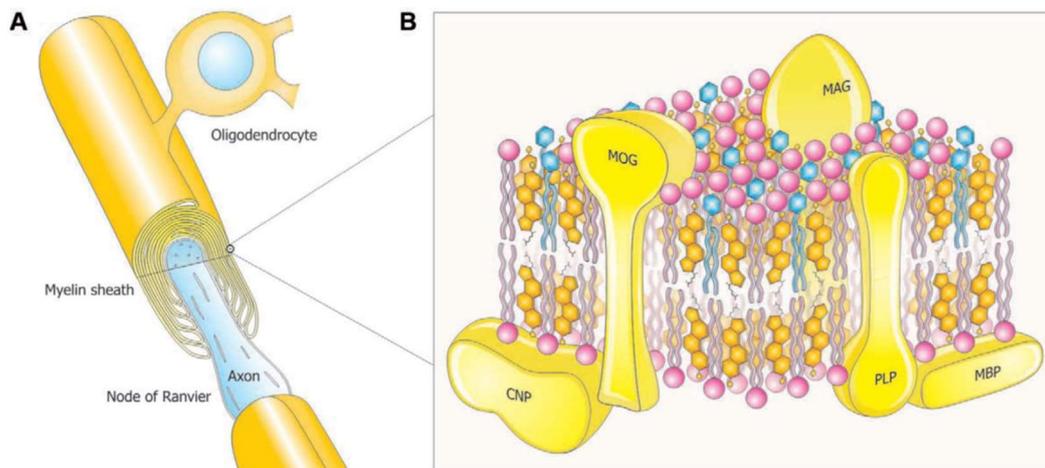


Abbildung 1: Aufbau der Myelinscheide modifiziert nach Podbielska et al. 2009 [17], mit freundlicher Genehmigung durch Sage Publications. A) Darstellung eines durch einen Oligodendrozyten ummantelten Axons mit Abbildung eines Ranvier'schen Schnürrings. B) Schematische Darstellung einer Lamelle der Myelinschicht, bestehend aus Proteinen und Lipiden.

1.3. Multiple Sklerose und ihre Subformen

Multiple Sklerose (MS) ist eine neurologische Erkrankung, die weltweit über zwei Millionen [18] und in Deutschland zwischen 100.000 bis 140.000 Patienten betrifft [19]. Mit einem Erkrankungsbeginn zwischen dem zwanzigsten und dreißigsten Lebensjahr ist sie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter [19, 20]. Die Multiple Sklerose als Krankheitsbild wurde bereits 1868 von Charcot charakterisiert. Er beschrieb sie histologisch als Erkrankung mit Zeichen der fokalen Demyelinisierung und Inflammation (auch als aktive Läsion bezeichnet), bei der die Axone relativ erhalten bleiben. Allerdings ist heutzutage bekannt, dass es im Verlauf der Erkrankung durchaus zur Schädigung von Axonen kommt [21, 22]. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass es sich um eine immunvermittelte Schädigung des zentralen Nervensystems mit Ausbildung aktiver Läsionen handeln könnte [23, 24]. Bereits 1996 wurden unterschiedliche Subformen der Multiplen Sklerose beschrieben. Hier wurden zunächst die schubförmige Form (im Englischen Relapsing, Relapsing Multiple Sclerosis, RRMS), die sekundär progrediente Multiple

Sklerose (SPMS), die primär progressive Multiple Sklerose (PPMS) sowie die progressive relapsing Multiple Sklerose (PRMS) unterschieden. Im Jahr 2014 wurde die Einteilung der Subformen ergänzt sodass auch das klinisch isolierte Syndrom und das radiologisch isolierte Syndrom Erwähnung finden, da diese möglicherweise die erste Erscheinung einer MS darstellen könnten. Weiterhin wurde zusätzlich die Aktivität und Progression der Erkrankung eingebracht. Diese führt dazu, dass der Typ der PRMS nicht mehr Teil der Subgruppen ist, sondern als aktive Form der PPMS eingeteilt wird [25]. Unter Aktivität wird ein erneuter Schub oder eine neu-aufgetretene Läsion oder Vergrößerung einer bekannten Läsion in der Kernspintomographie beschrieben. Unter Progression wird eine zunehmende neurologische Dysfunktion ohne Erholung verstanden [25].

Am häufigsten sind Patienten von der RRMS mit ca. 85% betroffen. Diese Form der Multiplen Sklerose tritt um das dreißigste Lebensjahr auf und betrifft dreimal häufiger Frauen als Männer [19]. Hier kommt es immer wieder zu Schüben, von denen sich die Patienten im Anfangsstadium der Erkrankung wieder vollständig erholen können. Diese Schübe entsprechen der bereits angesprochenen Entwicklung aktiver Läsionen. Ein Schub ist definiert als ein über vierundzwanzig Stunden anhaltendes Symptom, das nicht durch Fieber oder Infektion ausgelöst wurde, und typisch für eine aktive Läsion ist [26]. Aus diesem Stadium der wiederkehrenden Schübe mit vollständiger Erholung gehen allerdings ungefähr 80% der Patienten nach fünf bis fünfunddreißig Jahren in die sekundäre progressive Form über [27–29], die ähnlich der primär progredienten MS (PPMS), unter der 10-15% der Patienten leiden, ohne aufgesetzte Schübe einen chronisch progredienten Verlauf zeigt [23, 30, 31].

Die Symptome bei Schüben entsprechen der Lokalisation der aktiven Läsionen im ZNS. Somit kann es zu einer Vielzahl verschiedener Ausfälle kommen, die unter anderen das motorische, das sensible oder das autonome System betreffen. Typische Symptome stellen die einseitige Optikusneuritis, Hirnnervenausfälle, Sensibilitätsausfälle, Kleinhirnstörungen, muskuläre Schwäche, Blasenstörungen oder Sexualdysfunktionen dar [30, 32]. Daneben

kann es auch zu Symptomen des psychiatrischen Spektrums, wie Depression oder erhöhte Ängstlichkeit, kommen [33]. In der Diagnostik werden die revidierten McDonald-Kriterien angewandt, die eine räumliche und zeitliche Dissemination der Schübe fordern [34]. Der Nachweis gelingt einerseits in der klinisch-neurologischen Untersuchung, aber auch mittels diagnostischer Hilfsmittel, unter anderen die Liquor Diagnostik und Kernspintomographie (MRT), elektrophysiologische Untersuchungen, Blutuntersuchungen und optische Kohärenztomographie (OCT), wobei hier ein Hauptaugenmerk auch auf den Ausschluss verschiedenster Differentialdiagnosen gelegt werden muss.

Multiple Sklerose ist bis heute nicht heilbar, da es sich aber um eine immunvermittelte Schädigung handelt gibt es einige immunmodifizierende Therapiemöglichkeiten, die allerdings zum Großteil nur bei der schubförmigen MS zugelassen sind [23, 32]. Erst vor kurzer Zeit wurde mit Ocrelizumab nun eine Therapie für die PPMS zugelassen, wobei es sich um einen Antikörper gegen das auf B-Zellen vorhandene CD20 richtet [35].

1.4. Histopathologie aktiver Läsionen

Die bereits angesprochenen Läsionen mit Demyelinisierung und Inflammation finden sich in allen Formen der Multiplen Sklerose, während sich PPMS und SPMS allerdings ähneln gibt es durchaus Unterschiede zur RRMS. Zunächst wird daher auf die Histopathologie der schubförmigen Multiplen Sklerose eingegangen, bevor die Unterschiede zur progressiven MS genauer betrachtet werden.

Bei der schubförmigen Multiplen Sklerose finden sich typischerweise mehrere aktive fokale Läsionen, auch Plaques genannt. Betroffen ist dabei hauptsächlich die weiße, aber auch die graue Substanz [36–38]. Diese aktiven Läsionen sind durch eine Inflammation mit verschiedenen Entzündungszellen sowie eine ausgeprägte Demyelinisierung gekennzeichnet [39–42]. Diese werden begleitet von axonaler Schädigung sowie vermehrter Präsenz von Astrozyten. Im Folgenden soll nun ein kurzer Überblick über Demyelinisierung, Remyelinisierung, die Bildung der Glia-Narbe, axonaler Schaden sowie die beteiligten Entzündungszellen gegeben werden.

Wie bereits häufiger erwähnt finden sich im ZNS von Patienten mit Multipler Sklerose fokale aktive Läsionen, bestehend aus Inflammation und Demyelinisierung. Obwohl es Studien an Mäusen gibt, die den Mechanismus der Demyelinisierung durch das Immunsystem erforschen, so sind diese Ergebnisse wenn sie auf den Patienten übertragen werden nur bedingt zutreffend [41]. Um dem Mechanismus der Demyelinisierung auf den Grund zu gehen, gab es eine große Studie, die MS-Läsionen in der frühen Phase der Erkrankung untersuchte [40]. In dieser konnten vier verschiedene histologische Muster herausgearbeitet werden. Kurz zusammengefasst besteht das erste Muster aus einer Mikroglia vermittelten, das zweite aus einer Antikörper vermittelten Demyelinisierung. Der histologische Typ drei ist durch eine distale Oligodendropathie und Typ vier durch ausgeprägte ODZ-Degeneration gekennzeichnet. Allen Typen ist allerdings eine ausgeprägte T-Zell und Mikroglia, beziehungsweise (bzw.) Makrophagen Aktivierung gemein. Die einzelnen histologischen Typen konnten keiner klinischen Subgruppe eindeutig zugeordnet werden [40, 43, 44]. Der genaue Mechanismus allerdings, wie es zur Demyelinisierung kommt, bleibt bis jetzt unbekannt [37].

Neben der Demyelinisierung kommt es in den Läsionen mit der Zeit zu einer ausgeprägten Narbenbildung, die durch Astrozyten vermittelt wird [45]. Diese führt nicht nur zu einer Abschirmung der entzündlichen Vorgänge zum restlichen Parenchym, sondern scheint auch aktiv an der Hemmung der Remyelinisierung sowie der axonalen Regeneration teilzuhaben [37, 46]. Allerdings ist die genaue Rolle der Astrozyten in dieser Erkrankung keinesfalls geklärt, so gibt es ebenso Hinweise auf gegenteilige, positive Effekte durch Astrozyten, beispielsweise die Förderung von Remyelinisierung und Axonregeneration [46, 47].

Im weiteren Verlauf kommt es nicht nur in inaktiven Läsionen, sondern auch in Läsionen mit anhaltender Demyelinisierung zu einer Remyelinisierung durch Oligodendrozyten-Progenitorzellen, die unter anderem dadurch zu einer Verbesserung des klinischen Phänotyps, also einer Erholung des Schubes, führen kann [48–51]. Neben den bereits genannten Kennzeichen aktiver Läsionen, kommt es zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion, die aus CD8

positiven T-Zellen, CD4 positiven T-Zellen, B-Zellen sowie aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen besteht [29, 41, 44, 52]. Zunächst sind in aktiven Läsionen, vor allem in der RRMS, allerdings nur wenige Lymphozyten vorzufinden, deren Anzahl erst im Verlauf steigt. Zu diesem Zeitpunkt sind hauptsächlich Mikroglia und Makrophagen mit dem zunehmendem Gewebeschaden assoziiert [28, 53]. Das Zytoplasma dieser Makrophagen/Mikroglia scheint mit Myelin-Abbauprodukten gefüllt zu sein [54]. Im weiteren Verlauf kommt es einerseits zu einer Störung der Bluthirnschranke und zu einer zunehmenden Einwanderung von Lymphozyten [28, 55]. Bei der Verteilung dieser Lymphozyten fällt auf, dass es eine höhere Anzahl CD8 positiver T-Zellen im Vergleich zu CD4 positiven T-Zellen und B-Zellen gibt [28].

Im Verlauf der Erkrankung verändert sich die Pathologie und geht in die progressive Phase über, die SPMS. Diese scheint aufzutreten, sobald der irreversible Schaden die Kompensationsmechanismen des ZNS überschreitet (Abbildung 2).

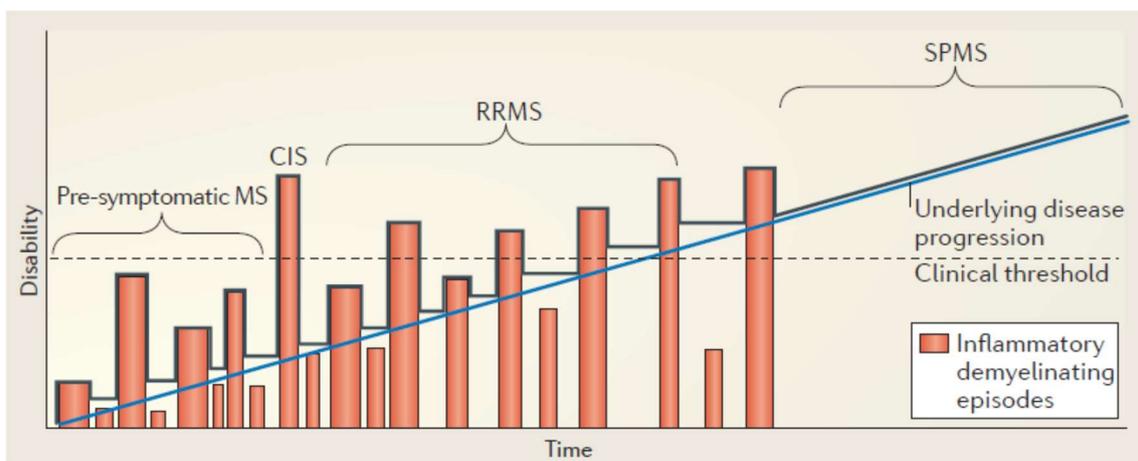


Abbildung 2: Übergang der RRMS in SPMS nach Stys et al. 2012 [56], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature. Dargestellt ist der Übergang der schubförmigen MS (RRMS) in eine sekundär progrediente Phase (SPMS). Dabei kommt es bereits in der Phase der RRMS zu einer subklinischen progredienten Verschlechterung, die sobald die Kompensationsmechanismen des ZNS ausgereizt sind, in die SPMS übergeht.

Diese ähnelt der PPMS mit dem Unterschied, dass es bei der primären Variante keine vorausgehenden Schübe gab. Stehen bei der RRMS noch fokale

demyelinisierende Herde in der weißen Substanz im Vordergrund, kommt es im Verlauf der progressiven MS zu einer Ausweitung schon bestehender Herde und einer eher diffusen Beteiligung der normal erscheinenden weißen und grauen Substanz, die auch zu einer großflächigen kortikalen Demyelinisierung führt [28, 57].

Neben der Demyelinisierung, die das klinische Erscheinungsbild alleine nicht erklären kann [58], kommt es in allen Formen der MS zusätzlich zu einem zunehmenden Verlust der Axone [21, 22, 59].

Vor allem bei der RRMS zeigt sich, dass Neurodegeneration anfangs hauptsächlich in aktiven Läsionen auftritt [59, 60]. Diese Neurodegeneration scheint hauptverantwortlich für den irreversiblen Fortgang der Erkrankung zu sein [61]. Die Mechanismen sind bis jetzt nicht eindeutig geklärt, obwohl es einige Hypothesen gibt [58]. Hierbei scheint es eine positive Korrelation zwischen Neurodegeneration und Entzündungsaktivität zu geben, wobei sie zumindest teilweise unabhängig von der Demyelinisierung auftritt [60, 62]. Dieser Umstand kann auch in der optischen Kohärenztomographie beobachtet werden, da sich hier vor allem die Abnahme der retinalen Nervenfaserschicht zeigt, die hauptsächlich aus nicht myelinisierten Axonen besteht, bevor sie im Sehnerv myelinisiert auftreten [63]. Die zunehmende Neurodegeneration resultiert schlussendlich in einer zunehmenden Hirnatrophie.

1.5. Primär progressive Multiple Sklerose

Nachdem bisher nur der progressive Verlauf der SPMS nach vorheriger RRMS angesprochen wurde, wird nun näher auf die PPMS eingegangen. Dies ist eine Form der MS, die ohne vorherige Schübe direkt mit dem progressiven Verlauf startet. Das Erkrankungsalter liegt im Mittelwert bei vierzig Jahren und die PPMS tritt damit bis zu zehn Jahre später auf als die RRMS [64], wobei sie in der zeitlichen Nähe des Auftretens der SPMS liegt [54]. Auch gibt es im Gegensatz zur RRMS keinen Geschlechterunterschied, so sind Männer und Frauen ungefähr gleich häufig betroffen [54, 55]. Aufgrund dieser Unterschiede existieren auch andere diagnostische Kriterien im Vergleich zur RRMS. So muss hier eine einjährige Progression der Erkrankung stattfinden und zusätzlich zwei der drei

folgenden Punkte zutreffen [34]: 1.) Eine oder mehr hyperintense Läsionen in einem T2 gewichteten MRT, die charakteristisch für MS sind und entweder periventrikulär, kortikal, juxtakortikal oder infratentoriell auftreten. 2.) Zwei oder mehr T2 hyperintense Läsionen im Rückenmark. 3.) Auftreten oligoklonaler Banden im Liquor.

Klinisch charakterisiert ist die PPMS am häufigsten durch eine progressive spastische Paraparese der Beine, wobei sensitive Ausfälle nicht so häufig auftreten [54, 64]. Obwohl in allen Formen der MS fokale demyelinisierende Läsionen vorkommen, finden sich die oben beschriebenen klassischen aktiven Läsionen hauptsächlich bei der RRMS, während sich bei SPMS und PPMS eher inaktive oder chronisch aktive Läsionen mit langsamer Ausbreitung an den Rändern finden [39]. Allerdings findet sich bei der SPMS eine höhere Zelldichte, die eine erhöhte Entzündungsaktivität in sekundär progredienten Formen vermuten lässt [54, 65]. Zusätzlich findet sich bei den progressiven Formen eine kortikale Demyelinisierung sowie eine diffuse axonale Schädigung der normal erscheinenden weißen Substanz, die mit einer erhöhten Entzündungsaktivität, bestehend aus T-Lymphozyten und der Aktivierung von Mikrogliazellen, verglichen zur RRMS einhergeht [39]. Auch ist im Verlauf der progressiven MS eine Zunahme von Plasmazellen und B-Zellen zu sehen, die sich hauptsächlich perivaskulär und in den Meningen befinden. Dort können sie auch aus B-Zellen bestehende Aggregate bilden [52]. Das Ausmaß dieser Akkumulation in den Meningen korreliert mit dem Ausmaß an Demyelinisierung und Neurodegeneration in kortikalen Läsionen [66]. Im Unterschied zur RRMS findet sich allerdings bei der PPMS und SPMS keine ausgeprägte Störung der Bluthirnschranke [28].

1.6. Autoimmune oder neurodegenerative Erkrankung?

Die gerade beschriebenen Unterschiede zwischen RRMS und PPMS haben seit einigen Jahren die Frage aufgebracht, ob es sich bei der PPMS eventuell nicht wie bisher vermutet, um eine durch Autoimmunprozesse vermittelte Neurodegeneration handelt, sondern andersherum um eine primäre Neurodegeneration handelt, deren Folge eine Aktivierung des Immunsystems mit

verstärkter Schädigung des Gewebes ist. So postulieren Stys und Kollegen [56], dass die Erkenntnisse der letzten Jahre über MS nicht nur durch die Theorie einer primären Autoimmunität, sondern genauso durch eine primäre Neurodegeneration erklärt werden können. (Abbildung 3).

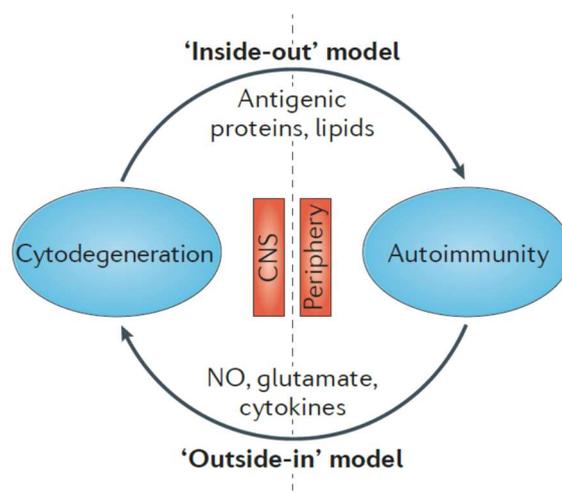


Abbildung 3: ‚Inside-out‘ Modell nach Stys et al. 2012 [56], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature. Gezeigt sind hier die beiden Theorien der Pathogenese von MS. So geht das ‚Inside-out‘ Modell davon aus, dass es zunächst zu einer Gewebeschädigung kommt, die daraufhin zu einer Immunreaktion führt und die Schädigung verstärkt. Beim ‚Outside-In‘ Modell wird davon ausgegangen, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt, die daraufhin zu Gewebeschädigung führt.

So wird angeführt, dass in sehr frühen Phasen der Erkrankung, Störungen der Myelinschicht zunächst an den innersten Lamellen auftreten und nicht an den äußersten, wie man es bei einer primär durch Lymphozyten vermittelten Schädigung vermuten würde [67]. Auffallend ist ebenfalls, dass es entgegen der ursprünglichen Meinungen in frühen aktiven Läsionen nicht zu einer durch T-Zellen aktivierten Makrophagen-vermittelten Zerstörung der Oligodendrozyten kommt, sondern dass es zunächst zu einem Untergang der ODZ kommt, bevor es zur Phagozytose durch Mikroglia und daraufhin zur Einwanderung aktivierter Lymphozyten kommt [53, 68]. Da es sich bei den Abbauprodukten und Bestandteilen des Myelins um Proteine und Lipide [17, 69, 70] mit immunogenem Potential handelt, führt das zu der Annahme, dass es erst durch die Präsenz

dieses immunogenen Materials zu einer Entzündungsreaktion kommt. Außerdem zeigt sich in kortikalen Läsionen axonaler Schaden und Demyelinisierung [28, 57], während die Anzahl an Entzündungszellen zumindest in der fortgeschrittenen Erkrankung geringer ist als in Läsionen der weißen Substanz [57, 71]. Weiterhin zeigten pathologische Studien, dass es sowohl in der normal erscheinenden weißen Substanz als auch in der abnormal erscheinenden weißen Substanz zu einer Abnahme der Axone und des Myelins kommt, obwohl in diesen Patienten wenige Entzündungszellen der adaptiven Immunabwehr zu finden waren [39, 72]. Auch eine neuere Studie, die T- und B-Zell-Infiltrate in weiter fortgeschrittener PMS zeigte [52], widerspricht der These nicht. So kann es auch durch eine zunehmende, primäre Neurodegeneration zu einer Aktivierung von Entzündungszellen kommen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass es zwar viele therapeutische Möglichkeiten für die RRMS gibt, diese aber nach Beginn der progressiven Phase ihre Wirksamkeit zu verlieren scheinen [73, 74]. So können diese die fortlaufende axonale Degeneration, Hirnatrophie und Demyelinisierung selten aufhalten. Erst in letzter Zeit zeigten sich in Studien einige therapeutische Ansätze, die zumindest einen abmildernden Effekt haben sollen. Hierzu zählen Ocrelizumab, ein CD20 Antikörper, Siponimod, ein Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor Modulator und Ibudilast, das Phosphodiesterasen, den Makrophagen Migrationsinhibitor Faktor und den Toll-like Rezeptor 4 hemmt [75, 76]. Diese Erkenntnisse führen zu der Vermutung, dass alle Formen der MS Teil desselben Krankheitsspektrums sind, dabei allerdings abhängig von der interindividuell unterschiedlichen immunologischen Reaktion auf den zugrundeliegenden primär neurodegenerativen Mechanismus sind [56].

1.7. Generierung eines Mausmodells für progrediente Multiple Sklerose basierend auf Mutationen im Proteolipid Protein 1 Gen

Ein mögliches Beispiel für Autoimmunreaktionen als Folge primärer neuraler Schäden könnte in genetischen Mutationen des Proteolipid Protein 1 Gens (*PLP 1*) liegen. So gab es zwei Fallberichte, die Punktmutationen im Proteolipid Protein 1 Gen nachwiesen und dabei einen klinischen Phänotyp, ähnlich der PPMS und RRMS aufzeigten. So wurde einerseits durch Warshawsky und Kollegen die

Punktmutation Leu30Arg heterozygot bei einer Frau festgestellt, deren Klinik die diagnostischen Kriterien einer PPMS erfüllte [77]. Zusätzlich hatte diese Patientin einen Sohn, der früh an der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit (PMD) starb und diese Punktmutation hemizygot besaß. Andererseits konnte durch Gorman und Kollegen in einem Jungen mit einer komplizierten hereditären spastischen Paraplegie (HSP) eine PLP Punktmutation Arg137Trp festgestellt werden. Allerdings zeigte dieser einen auf hochdosierte intravenöse Kortisongabe ansprechenden schubförmigen Verlauf, der die Kriterien einer MS erfüllte [78]. Weiter zeigte sich in einer Untersuchung der für *PLP 1* codierenden Regionen in weiblichen MS-Patientinnen, in einer Patientin ebenfalls eine Mutation des *PLP 1* Gens [79].

Generell kann es bei Punktmutationen oder Genom-Duplikationen des PLP-Gens zu zwei klinisch unterschiedlichen Erkrankungen kommen, der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit oder der hereditären spastischen Paraplegie [80]. Typische Symptome der PMD sind unter anderen ein hypotoner Muskeltonus, ein Nystagmus und eine motorische Entwicklungsverzögerung [81]. Da es sich bei *PLP 1* um ein Gen auf dem X-Chromosom handelt, sind bei diesen Erkrankungen hauptsächlich Männer betroffen, während Frauen in den meisten Fällen nicht betroffen sind und wenn nur in einer sehr milden Ausprägung [80]. Allerdings konnte, wie bereits angesprochen, durch Warshawsky und Kollegen eine Patientin beschrieben werden, bei der eine PPMS diagnostiziert wurde und die dabei Trägerin einer heterozygoten Punktmutation des *PLP 1* Gens war [77]. Da sich diese sowie der von Gorman beschriebene Patient, mit MS-ähnlichen Phänotypen darstellten, war es nun von großem Interesse die bekannten Mutationen dieser Patienten in ein Mausmodell einzubringen und diese genauer zu untersuchen.

In Zusammenarbeit von Dr. Janos Groh und der Arbeitsgruppe um Prof. Alan Peterson (Montreal) konnten entsprechende Mausmodelle generiert werden [82]. Zunächst wurden die Punktmutationen durch Mutagenese in menschliche cDNA eingefügt, daraufhin wurde diese mit den Mutationen (*hPLPW*, *hPLPG*) in einen Vektor eingebracht („entry vector“) und mit einem Enhancer versehen, der die

Expression spezifisch in Oligodendrozyten antreibt [83]. Diese wurden in einen Zielvektor transferiert, so dass die cDNA in der Nähe des X-chromosomalen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Lokuses (HPRT-Lokus) integriert werden konnte. Die daraus entstandenen transgenen Linien wurden mit *Plp 1* defizienten Mäusen (*PlpKo*) gekreuzt, um Mäuse zu generieren, die auf dem Allel mit der Punktmutation nur die mutierte cDNA enthielten. So konnte sichergestellt werden, dass alle männlichen Tiere X-chromosomal nur das mutierte Gen (*hPLPW*, *hPLPG*) trugen. Die weiblichen Tiere konnten einerseits auf beiden X-Chromosomen die Mutation tragen und damit homozygot für das jeweilige Gen sein (*hPLPW/PlpKo*, *hPLPG/PlpKo*), oder sie trugen die Mutation nur auf einem Allel sowie auf dem anderen Allel das Wildtyp-Gen und stellten so die heterozygote Form dar (*hPLPW/PlpKo* het). Da in den Fallberichten einerseits die hemizygoten *hPLPG*, andererseits die heterozygoten *hPLPW* Punktmutation für den jeweiligen MS-typischen Phänotyp verantwortlich waren, konzentriert sich diese Arbeit auf die Auswertung dieser beiden Modelle, also den heterozygoten *hPLPW/PlpKo* und den homo- oder hemizygoten *hPLPG/PlpKo* sowie als Vergleich die bereits bekannten *PlpKo* Mausmutanten.

Nachdem zur Auswertung eben auch die bereits angesprochenen heterozygoten *hPLPW/PlpKo* Mausmutanten herangezogen werden, muss vorher auf die Verteilung des mutierten Gens mit ‚knockout‘-Hintergrund in den Oligodendrozyten eingegangen werden. Bei weiblichen Mäusen gibt es im Gegensatz zum Männchen zwei X-Chromosomen, davon wird allerdings nur eines benötigt. Daher wird eines dieser X-Chromosomen in der Zelle zufällig ausgeschaltet, auch zufällige X-Inaktivierung genannt. Daraus entsteht beim Weibchen ein genetisches Mosaik und in ein und demselben Nerven können sowohl wildtypische als auch mutierte Oligodendrozyten vorhanden sein. Hierbei ist es von Interesse, wie viele der Oligodendrozyten das mutierte Allel tragen und welche pathologischen Auswirkungen das auf die individuellen Zellen hat. In frühen Untersuchungen konnte theoretisch gezeigt werden, dass es im ZNS zu einer gleichmäßigen Verteilung des mütterlichen und väterlichen Allels zu je 50% kommt [84]. In Bezug auf genetisch veränderte Oligodendrozyten gab es weitere Untersuchungen, die das *Plp*-Gen betrafen. So kam es bei heterozygot *Plp*-

defizienten Mäusen zu einem etwas abweichenden Verhältnis. In der Erstbeschreibung zeigte sich, dass 57% +/- 3% des Myelins PLP positiv waren. In einer anderen Studie besaßen 65 % der Oligodendrozyten das normale Plp Gen, während 35 % Plp1 defizient waren [15, 85].

1.8. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die klinische und histopathologische Charakterisierung der 18 Monate alten Mausmutante, die heterozygot die Warshawsky-Mutation trägt (hPLPW/PlpKo het). Diese wird mit einer Wildtyp (Wt) Gruppe, Mäusen, die die Gorman-Mutation (hPLPG/PlpKo) tragen und PLP knock-out Mäusen (PLPko), verglichen. Als Marker für die klinische Ausprägung der Mutationen soll die Zeit auf dem Rotarod bewertet werden. Weitere Zielgrößen sollen in immunhistochemischen Untersuchungen der neuronale Schaden sowie das Vorhandensein von Entzündungszellen des adaptiven, beziehungsweise angeborenen Immunsystems sein. Zudem soll der neuronale Schaden sowie die Anzahl myelinisierter Axone mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden. Des Weiteren wird die Retina mittels OCT beurteilt.

2. Material und Methoden

2.1. Mausmodell

Die meisten analysierten Mäuse waren 18 Monate alt, mit Ausnahme der Tiere für die elektronenmikroskopische Auswertung, die 12 Monate alt waren. Die analysierten Mausstämme, Wildtypen (*Wt*), heterozygote *hPLPW/PlpKo*, hemi- bzw. homozygote *hPLPG/PlpKo* und hemi- bzw. homozygote *PlpKo* wurden alle auf C57BL/6 Hintergrund gezüchtet [82]. Die Mäuse wurden in der Tierhaltung der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg in einzeln belüfteten Käfigen gehalten. Es erfolgte ein regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus mit 12 Stunden Licht (< 300 Lux) und 12 Stunden Dunkelheit. Alle durchgeführten Versuche wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt. Die Genotypen wurden mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) bestimmt, wofür isolierte DNA aus der Schwanzspitze verwendet wurde. Die Genotypisierung erfolgte wie in der entsprechenden Publikation, zu der diese Daten beitrugen, beschrieben und wurde durch Bettina Meyer durchgeführt [82].

2.2. Gewebepreparation

Zunächst wurden die Mäuse tierschutzgerecht mittels CO₂ vermittelter Asphyxie getötet. Daraufhin wurde der Thorax geöffnet und eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit Heparin versetzt und die Mäuse transkardial perfundiert, bis die Leber entfärbt und das Blut aus dem Kreislauf entfernt worden war. Im Anschluss wurden die für die histologische Aufarbeitung benötigten Gewebe, der Nervus opticus und der Augapfel, entfernt und entsprechend weiterverarbeitet. Dazu wurde der Sehnerv längs in O.C.T Medium (Sakura) gebettet und in Methylbutan eingefroren, das zuvor durch Stickstoff gekühlt worden war. Die Lagerung der dadurch gewonnenen Blöcke erfolgt bei -20°C.

Die Blöcke wurden mittels Kryostat (Leica) in 10µm dicke Längsschnitte geschnitten und auf Objektträger gelegt. Diese wurden bis zur weiteren Verarbeitung wieder bei -20°C aufbewahrt.

Die Präparation der Retina erfolgte unmittelbar nach Entnahme der Augen. Zunächst wurden vorsichtig Glaskörper, Kornea und Linse entfernt und die

Retina für dreißig Minuten in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Im Anschluss konnte die Retina durch vier Einschnitte flach auf einen Objektträger gelegt, luftgetrocknet und eine Nissl-Färbung durchgeführt werden. Dafür wurden die Objektträger mittels 0,1% Cresyl-Violet für zehn Minuten gefärbt und im Anschluss gewaschen, dehydriert und zum Mikroskopieren mit VitroClud (Langenbrick) aufbereitet.

2.3. Immunhistochemie

Zur Darstellung der unten weiter ausgeführten Zellen wurden jeweils 10µm dicke Längsschnitte des Sehnervs verwendet, die bis zur Färbung und Auswertung bei -20°C gelagert wurden. Die Licht- und Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte an einem Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) mit aufgesetzter CCD-Kamera (Visitron Systems). Ausgewertet wurden jeweils mindestens 2 Längsschnitte pro Tier und immunhistochemischer Färbung. Der Untersucher war für jede Untersuchung einfach geblindet. Es wurden alle im Parenchym erkennbaren fluoreszenzpositiven Profile, die zusätzlich einen in der DAPI-Färbung erkennbaren Zellkern besaßen, ausgezählt. Fluoreszenzpositive Profile, die in den Meningen oder Teilen der Retina zu sehen waren, wurden für diese Arbeit nicht in der Auswertung berücksichtigt. Als Negativkontrolle diente ein Nervus opticus ohne Primär-Antikörper. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der angefärbten Profile, die daraufhin ins Verhältnis zur Größe des ausgezählten Bereichs des Sehnervs gesetzt wurde. Abhängig von der Immunhistochemischen Färbung erfolgte die Auszählung manuell oder mithilfe von ImageJ (NIH). Die Fläche wurde ebenfalls mit ImageJ (NIH) gemessen.

2.3.1. Immunhistochemie nach CD4 positiven Zellen

Zunächst wurden die Längsschnitte des Nervus opticus für zehn Minuten in Aceton bei -20°C fixiert, bevor sie für fünfzehn Minuten in drei Einzelschritten für jeweils fünf Minuten in 1x PBS gewaschen wurden. Daraufhin wurden die Nervenlängsschnitte für dreißig Minuten mit einer 5% bovinen Serumalbumin-Lösung (BSA) geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Im Anschluss konnte der Ratte Anti-Maus CD4-Antikörper (Serotec, 1:1000), in 1% BSA gelöst, über Nacht bei -4°C binden. Am nächsten Tag wurden die

Längsschnitte erneut mit 1x PBS dreimal für jeweils fünf Minuten gewaschen, bevor der Ziege Anti-Ratte Cy3 Sekundärantikörper (Dianova, 1:300) in 1% BSA gelöst für eine Stunde auf die Längsschnitte gegeben wurde. Die weitere Aufbereitung erfolgte in Dunkelheit, um den Fluoreszenz-Effekt nicht abzuschwächen. Danach wurde erneut dreimal für jeweils fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen und daraufhin ein DAPI-Antikörper (Sigma-Aldrich, 1:500.000) in 1% BSA für zehn Minuten zur Zellkernfärbung auf die Längsschnitte aufgetragen. Es schloss sich ein erneuter Waschschrift mit 1x PBS dreimal fünf Minuten an. Abschließend wurden die Präparate mit einem Deckgläschen und Aqua-Poly/Mount (Polysciences) oder DABCO versehen, wobei die Objektträger mit DABCO noch mit VitroGlud (Langenbrick) umrandet wurden. Bis zur vollständigen Auswertung wurden die Objektträger im Dunkeln bei -20°C gelagert. Die Auszählung erfolgte anschließend manuell unter Fluoreszenzlicht am Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) mit aufgesetzter CCD-Kamera (Visitrom Systems). Ausgewertet wurden sechs Wt, sechs heterozygote hPLPW/PlpKo, acht hPLPG/PlpKo und sechs PlpKo.

2.3.2. Immunhistochemie nach CD8 positiven Zellen

Analog zu der CD4-Färbung (siehe Kapitel 2.3.1) wurden die Längsschnitte des Nervus opticus zunächst auch mit Aceton für zehn Minuten bei -20°C fixiert, mit 1x PBS dreimal für jeweils fünf Minuten gewaschen und mit 5% BSA dreißig Minuten geblockt. Für die eigentliche Färbung wurde ein Ratte Anti-Maus CD8-Antikörper (Serotec, 1:500) in 1% BSA als Primärantikörper verwendet und die Längsschnitte bei 4°C über Nacht inkubiert. Wie oben bereits beschrieben, schloss sich daraufhin ein erneuter Waschschrift, die Bindung des Ziege Anti-Ratte Cy3-Antikörper (Dianova, 1:300) in 1% BSA als Sekundärantikörper für sechzig Minuten sowie nach dem nächsten Waschgang die Bindung des DAPI-Antikörpers (Sigma-Aldrich, 1:500.000) in 1% BSA an. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Ausgewertet wurden fünf Wt, sechs heterozygote hPLPW/PlpKo, sieben hPLPG/PlpKo und fünf PlpKo.

2.3.3. Immunhistochemie nach F4/80 positiven Zellen

Die Färbung auf F4/80 erfolgte wie bereits in Kapitel 2.3.1 und Kapitel 2.3.2 beschrieben nach Fixierung mit Aceton, einem Waschgang mit 1x PBS und Blockung mit 5% BSA. Als Primärantikörper wurde ein Ratte Anti-Maus F4/80 Antikörper (Serotec, 1:300) verwendet und die Nervenlängsschnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die anschließende Verarbeitung erfolgt wie oben beschrieben. Die Auszählung erfolgte, nach Anfertigen von zwei repräsentativen Bildern pro ausgewertetem Nervenlängsschnitt mittels Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) mit aufgesetzter CCD-Kamera (Visitrom Systems), durch ImageJ (NIH). Ausgewertet wurden acht Wt, vier heterozygote hPLPW/PlpKo, sechs hPLPG/PlpKo und vier PlpKo.

2.3.4. Immunhistochemie nach SMI-32 positiven Sphäroiden

Um die Nervenlängsschnitte auf axonalen Schaden zu untersuchen, wurden diese mit einem SMI-32 Antikörper, der an nichtphosphoryliertes Neurofilament bindet, inkubiert. Dazu wurden die Nervenlängsschnitte aufgetaut und in 4 % Paraformaldehyd (PFA) Lösung für zehn Minuten postfixiert. Nach dreimaligem jeweils fünf-minütigem Waschen in 1x PBS, wurden die Objektträger für weitere zwanzig Minuten in eine mit Methanol gefüllten Küvette zusammen mit 0,3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gegeben. Anschließend wurde erneut für fünfzehn Minuten dreimal gewaschen, woraufhin die Nervenlängsschnitte für sechzig Minuten mit 10% BSA und 1% normaler Ziegenserum-Lösung (NGS) bedeckt wurden. Schließlich wurden die Objektträger mit dem Maus Anti-Maus SMI-32-Antikörper (Covance, 1:2000) in 1% BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte erneut ein fünfzehn-minütiger Waschgang mit 1x PBS, danach erfolgte der Avidin-Biotin-Block (Vector Laboratories) für jeweils fünfzehn Minuten. Im Anschluss wurde ein biotinylierter Ziege Anti-Maus Sekundärantikörper (Vector, 1:100) in 1% BSA auf die Objektträger aufgetragen und nach einem weiteren Waschgang das ABC-Kit (Vector Laboratories) in 1% BSA für dreißig Minuten aufgetragen. Darauffolgend wurde eine in 10 ml destilliertem Wasser gelöste Diaminobenzidin-Tablette (DAB) mittels H₂O₂ aktiviert und auf den Objektträger aufgetragen. Der Färbevorgang wurde beobachtet und bei gewünschter Farbintensität nach ungefähr einer Minute mit

destilliertem Wasser beendet. Die Objektträger wurden nun in destilliertem Wasser zweimal für je fünf Minuten gewaschen und danach mit Aquatex (Merck) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch, manuell am Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) mit aufgesetzter CCD-Kamera (Visitrom Systems). Die Flächenberechnung erfolgte mittels ImageJ (NIH). Ausgewertet wurden zwölf Wt, sieben heterozygote hPLPW/PlpKo, neun hPLPG/PlpKo und acht PlpKo.

2.4. Nissl-Färbung nach Retinaganglienzellen

Nach Aufbereitung der Retina und der Nissl-Färbung wurden die Retinapräparate mit dem Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss) ausgewertet. Dazu wurde die Retina in drei Segmente unterteilt, einem zentralem, nahe dem Eintritt des Sehnerves, einem äußerem und einem mittleren Segment. Nun wurden pro Retina und Segment je zwei Bilder gemacht, die mittels ImageJ (NIH) ausgewertet wurde. Hierzu wurden die retinalen Ganglienzellen (RGC) gezählt, die eindeutig in der Nissl-Färbung gefärbt und anhand ihres typischen Aussehens erkennbar waren. Die Anzahl an RGC wurde daraufhin ins Verhältnis zur ausgewerteten Fläche gesetzt und anschließend mit dem Faktor 0,633 multipliziert, um die Verkleinerung der Retina während des Färbe- und Dehydrierungsprozesses auszugleichen. Ausgewertet wurden sechs Wt, fünf heterozygote hPLPW/PlpKo, fünf hPLPG/PlpKo und sieben PlpKo Mäuse.

2.5. Optische Kohärenztomographie (OCT)

Mäuse, die mittels optischer Kohärenztomographie (Spectralis OCT; Heidelberg Engineering) untersucht wurden, mussten zunächst mittels Ketamin/Xylazin, intraperitoneal appliziert, anästhesiert werden. Daraufhin wurden die Pupillen mittels eines Tropfen 0,5% Tropicamid Augentropfen (Mydrum; Bausch & Lomb) geweitet und mit künstlichen Tränenflüssigkeit (Corneregel Fluid; Bausch & Lomb) gegen Austrocknung geschützt sowie mit einer aus Polymethylakrylat bestehenden harten Kontaktlinse (Krümmung: 1,7 mm, Durchmesser: 3,2 mm; Cantor + Nissl) versehen. Zur Darstellung der Retina der Maus war zusätzlich eine +25 Dioptrien Linse (Heidelberg Engineering) vonnöten, die vor die Kamera gesetzt wurde. Die Aufnahmen wurden mit der zugehörigen Software durchgeführt (Heidelberg Eye Explorer, HEYEX, Version 1.7.1; Heidelberg

Engineering). Nachdem die Aufnahmen beendet waren, wurde die Linse entfernt und gesäubert, die Augen zum Schutz vor Austrocknung erneut mit künstlicher Tränenflüssigkeit (Corneregel Fluid; Bausch & Lomb) bedeckt und die Mäuse warmgehalten. Die Aufnahmen der Retina wurden mit der zugehörigen Software ausgewertet (Heidelberg Eye Explorer, HEYEX, Version 1.7.1; Heidelberg Engineering), wobei die Schichten der Retina mit hochauflösenden peripapillären Aufnahmen untersucht wurden. Diese wurden manuell in 600x Vergrößerung und 1:1 μm Ansicht ausgewertet. Die folgenden vier Schichten konnten unterschieden werden. Eine Schicht bestehend aus 1. Nervenfaserschicht, Ganglienzellschicht und innerer plexiformer Schicht; 2. Innere Körnerschicht; 3. Äußere plexiforme Schicht, äußere Körnerschicht, innere und äußere Photorezeptorenschicht; 4. Pigmentepithel und Choriokapillärer Komplex, wobei in dieser Arbeit hauptsächlich auf die erste Schicht eingegangen wird. Messungen durch große Blutgefäße wurden vermieden. Insgesamt wurden pro Maus und Genotyp jeweils fünf bis zehn Messungen pro Retina gemacht und aus diesen ein Mittelwert mittels MS Excel (Microsoft) gewonnen. Ausgewertet wurden acht Wt, drei heterozygote hPLPW/PlpKo, fünf hPLPG/PlpKo und vier PlpKo Mäuse. [86]

2.6. Elektronenmikroskopische Auswertung

Nachdem die Mäuse wie bereits beschrieben getötet und das Blut aus dem Kreislauf entfernt wurde, konnten die Mäuse mit einer 4% Paraformaldehyd (PFA) und 2% Glutaraldehyd (GA) in Cacodylatpuffer-Lösung transkardial perfundiert werden. Nach Entnahme der Sehnerven wurden diese in derselben Lösung über Nacht postfixiert. Daraufhin wurde das Gewebe in 2% Osmiumtetroxid, versetzt mit 0,1M Cacodylatpuffer osmifiziert und mittels aufsteigender Acetonreihe dehydriert. Dann erfolgte die Einbettung in Spurr-Medium und die weitere Verarbeitung zu ultradünnen Querschnitten. Diese wurden mit Bleizitrat gefärbt und daraufhin mit einem Elektronenmikroskop (Zeiss Leo 906 E; Oberkochen) und aufgesetzter ProScan Slow Scan CCD Kamera (ProScan; Lagerlefeld) sowie zugehöriger iTEM Bildgebungssoftware (Olympus Soft Imaging System; Hamburg) untersucht. Die Auswertung erfolgte an 12 Monaten alten Mäusen, wobei einerseits auf Myelinschaden geachtet wurde, der durch dünn- oder demyelinisierte Axone charakterisiert wurde.

Andererseits wurde neuronaler Schaden beurteilt, ausgedrückt durch Vakuolen und Sphäroide. Pro Tier wurden mindestens acht Bilder aufgenommen und analysiert. Der Schaden an Myelin und Neuron wurde als Anteil in Prozent angegeben. Ausgewertet wurden drei Wt, vier heterozygote hPLPW/PlpKo, drei hPLPG/PlpKo und vier PlpKo.

2.7. Rotarod

Die Mäuse wurden auf ein Rotarod System (TSE Systems), mit sich ständig beschleunigender Walze (5-50 rpm), gesetzt. Daraufhin wurde die Zeit gemessen, bis die Tiere nicht mehr in der Lage waren sich auf der Walze zu halten, maximal jedoch für 300 Sekunden. Ein Durchgang bestand aus fünf Läufen, mit mehrminütigen Pausen dazwischen. Pro Versuchstier gab es insgesamt drei Durchgänge, von denen zwei an einem Tag und der Nächste am Folgetag durchgeführt wurde. Zwischen den Durchgängen am ersten Tag gab es eine, mindestens drei Stunden dauernde, Pause. Aus den sich entsprechenden Läufen der einzelnen Durchgänge (1. Läufe untereinander, 2. Läufe untereinander, etc.) wurde der Mittelwert gebildet und mit den Werten der anderen Mausmutanten verglichen. Zusätzlich wurde ein kumulativer Mittelwert aus allen Läufen pro Tier gebildet und die daraus entstehenden Mittelwerte miteinander verglichen. Ausgewertet wurden drei Wt, vier heterozygote hPLPW/PlpKo, vier hPLPG/PlpKo und drei PlpKo.

2.8. Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen sowie die Grapherstellung wurden mittels PASW Statistics 18 (SPSS.Inc, IBM) und Photoshop CS3 (Adobe) oder MS PowerPoint (Microsoft) durchgeführt. Eine Abschätzung der Stichprobengröße sowie eine a priori Power-Analyse wurden im Vorfeld wie in der zugehörigen Publikation beschrieben vorgenommen [82]. Da alle Parameter erfahrungsgemäß normalverteilt sind, wurden zunächst alle Stichproben mittels Levene-Tests auf Homogenität der Varianzen überprüft. Je nach Ausgang dieser Testung erfolgte die weitere Auswertung mittels One-Way-ANOVA und Tukey's Post-Hoc-Test oder Games-Howell Post-Hoc-Test. Signifikante Unterschiede wurden in den

Abbildungen mittels * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ gekennzeichnet.
Die Daten wurden als Mittelwert (M) +/- Standardabweichung (SD) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Histopathologische Untersuchungen

Wie zu Beginn bereits erwähnt kommt es bei der Multiplen Sklerose typischerweise neben der Einwanderung bzw. Aktivierung von Immunzellen zur Demyelinisierung und dem Auftreten von neuronalem Schaden. Das Ausmaß des Schadens am Myelin wurde über das Elektronenmikroskop analysiert, die Schädigung der Neurone wurde mittels Darstellung des axonalen Schadens einerseits immunhistochemisch durch SMI-32 Antikörper, andererseits elektronenmikroskopisch sowie durch die Auszählung retinaler Ganglienzellen quantifiziert.

In elektronenmikroskopischen Darstellungen des Querschnitts des Sehnervs von 12 Monate alten Mäusen zeigte sich ein erhöhter Anteil dünn- oder demyelinisierter Axone in hPLPG/PlpKo und PlpKo Tieren verglichen zu den Wildtypen. Außerdem zeichnete sich ab, dass die heterozygoten hPLPW/PlpKo zwar durchaus signifikant geschädigtes Myelin aufwiesen, aber im Trend nicht so stark betroffen waren, verglichen zu den hPLPG/PlpKo und PlpKo (Abbildung 4). Ähnlich verhielt es sich mit dem Anteil an Vakuolen und Sphäroiden, ein Zeichen für axonalen Schaden [87, 88]. Auch hier war in den hPLPG/PlpKo und in den PlpKo Mäusen ein erhöhter Anteil axonalen Schadens verglichen zu den Wildtypen zu finden. Die heterozygoten hPLPW/PlpKo zeigten ebenfalls vermehrt Vakuolen und Sphäroide verglichen zu den Wildtypen, und zeigten gleichzeitig einen Trend zu einem geringeren axonalen Schaden im Vergleich zu den hPLPG/PlpKo und PlpKo Mäusen (Abbildung 5).

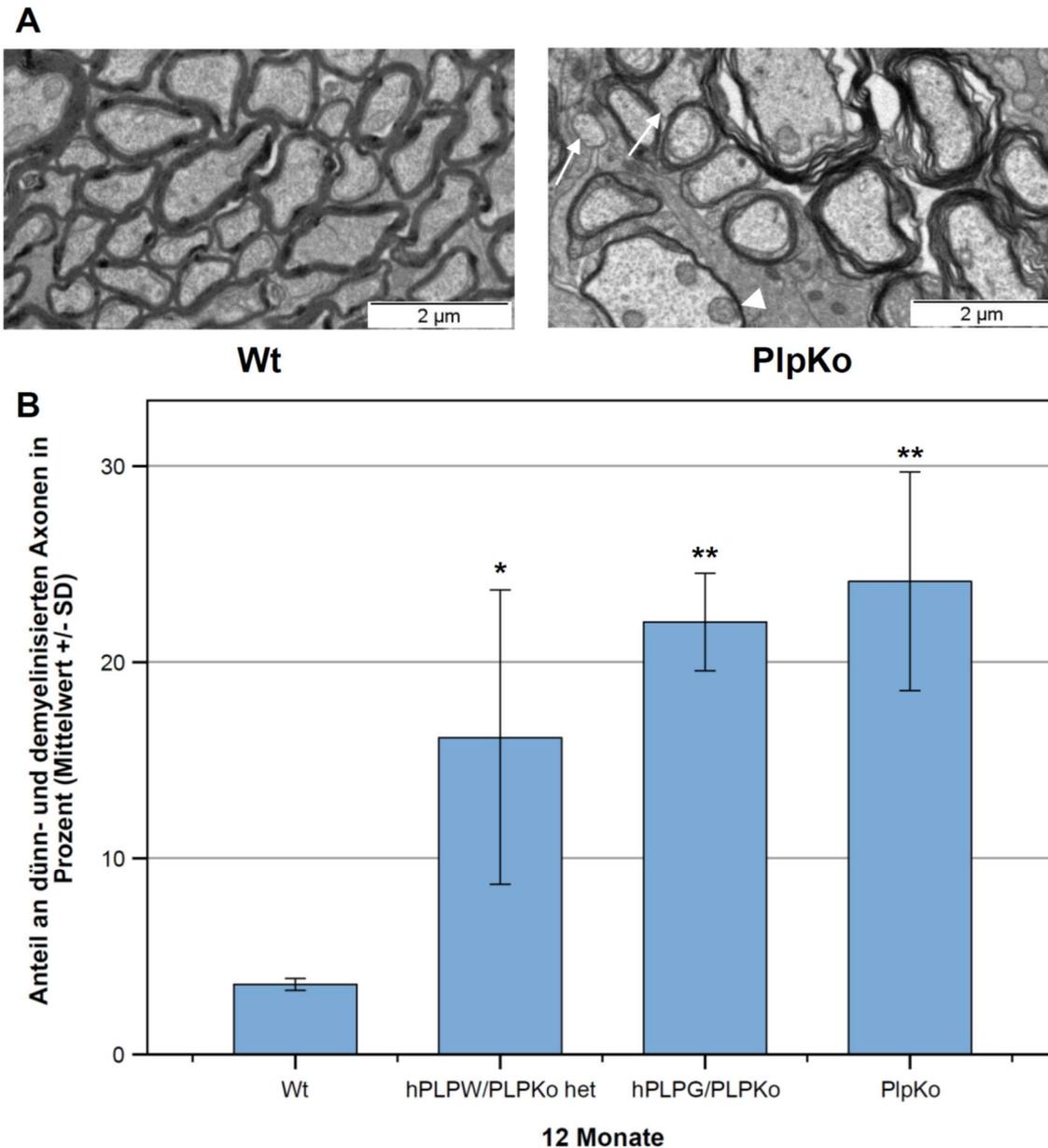


Abbildung 4: Darstellung und Quantifizierung von dünn- und demyelinisierten Axonen. A) Darstellung von Querschnitten des Nervus opticus im Elektronenmikroskop sowie dünn- (weißer Pfeilkopf) oder demyelinisierter Axone (weiße Pfeile). **B)** In der Auswertung zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil dünn- oder demyelinisierter Axone in allen Mausmutanten verglichen zum Wildtyp. Zusätzlich zeichnete sich aber auch ein Trend zwischen den heterozygoten hPLPW/PlpKo und den beiden anderen Mausmutanten ab. (Wt: M= 3,56 % +/- SD: 0,30 %; hPLPW/PlpKo het: M= 16,15 % +/- SD: 7,52 %; hPLPG/PlpKo: M= 22,05 % +/- SD: 2,49 %; PlpKo: M= 24,11 % +/- SD: 5,57 %). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Tukey. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. (Wt: n = 3; hPLPW/PlpKo het: n = 4; hPLPG/PlpKo: n = 3; PlpKo: n = 4).

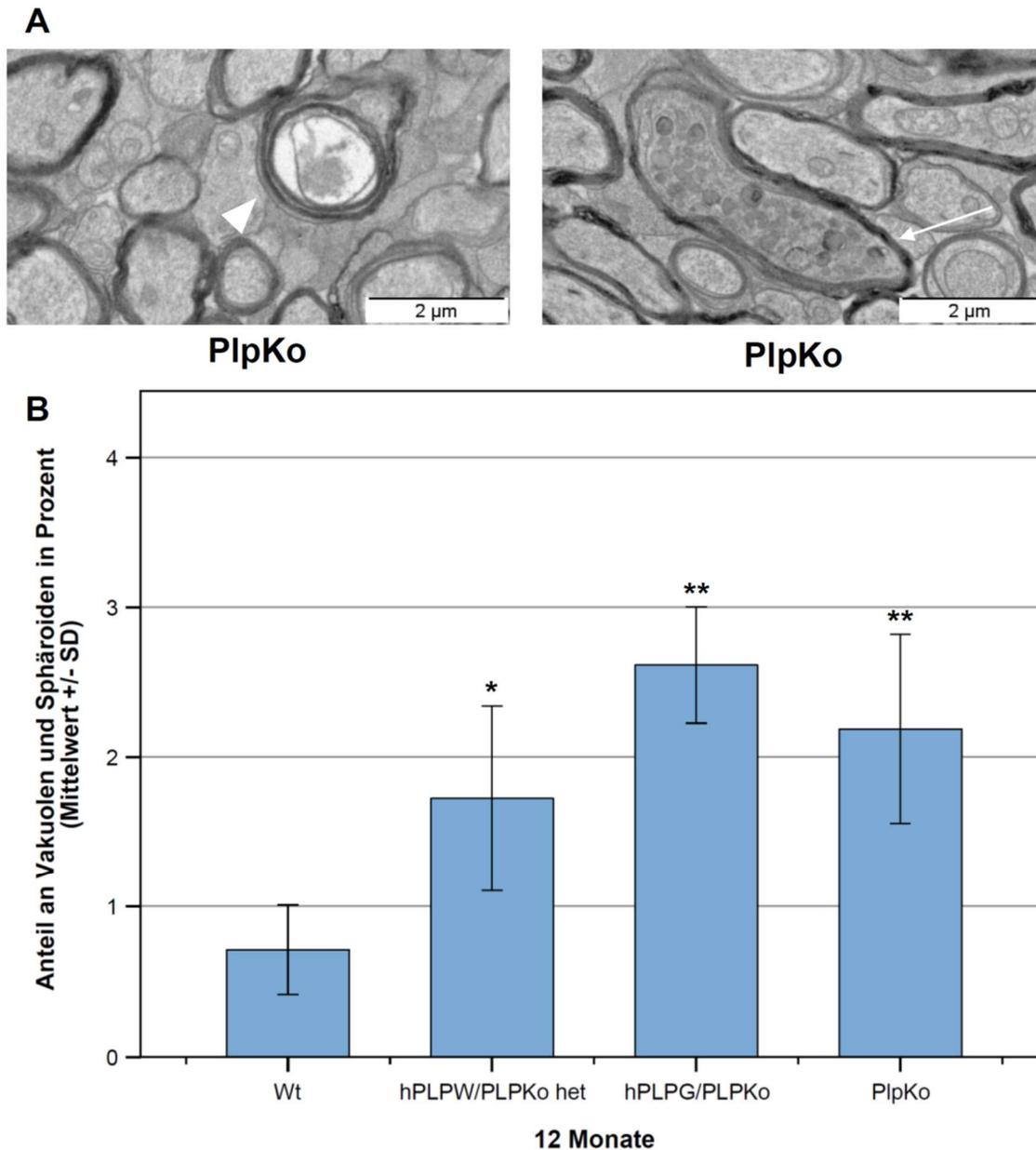


Abbildung 5: Darstellung und Quantifizierung von Vakuolen und Sphäroiden. A) Darstellung von Querschnitten des Nervus opticus im Elektronenmikroskop sowie Vakuolen (weißer Pfeilkopf) und Sphäroiden (weißer Pfeil). **B)** In der Auswertung zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil von Vakuolen und Sphäroiden in den hPLPG/PlpKo, den PlpKo und auch den heterozygoten hPLPW/PlpKo Tieren. Letztere zeigten aber einen Trend zu einem geringeren axonalen Schaden im Vergleich zu den hPLPG/PlpKo und PlpKo Mäusen. (Wt: M= 0,71 % +/- SD: 0,30 %; hPLPW/PlpKo het: M= 1,72 % +/- SD: 0,62 %; hPLPG/PlpKo: M= 2,61 % +/- SD: 0,39 %; PlpKo: M= 2,19 % +/- SD: 0,63 %) Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Tukey. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. (Wt: n = 3; hPLPW/PlpKo het: n = 4; hPLPG/PlpKo: n = 3; PlpKo: n = 4).

Um den axonalen Schaden in den Mausmutanten weiter charakterisieren zu können, wurde der Nervus opticus mit SMI-32 Antikörpern gefärbt. SMI-32 ist ein monoklonaler Antikörper gegen nicht-phosphoryliertes Neurofilament, das in Nervenzellen und ihren Dendriten vorkommt. In den zugehörigen Axonen ist das Neurofilament ebenfalls vorhanden, dieses ist bei intakter Myelinscheide aber phosphoryliert und wird deshalb in Axonen mit intakter Myelinscheide kaum angefärbt. Daher gelingt durch die Immunhistochemie mit SMI-32 der Nachweis einer Demyelinisierung oder axonaler Schädigung. Der axonale Schaden präsentierte sich in Form von SMI-32 positiver Sphäroide, die quantifiziert und in den verschiedenen Gruppen verglichen werden konnten [22]. Hier zeigte sich ein deutlicher und signifikanter Unterschied zwischen den Wt und den Mausmutanten. Interessanterweise ließ sich hier auch zwischen den heterozygoten hPLPW/PlpKo und den restlichen Mutanten, hPLPG/PlpKo sowie PlpKo ein signifikanter Unterschied nachweisen (Abbildung 6).

A

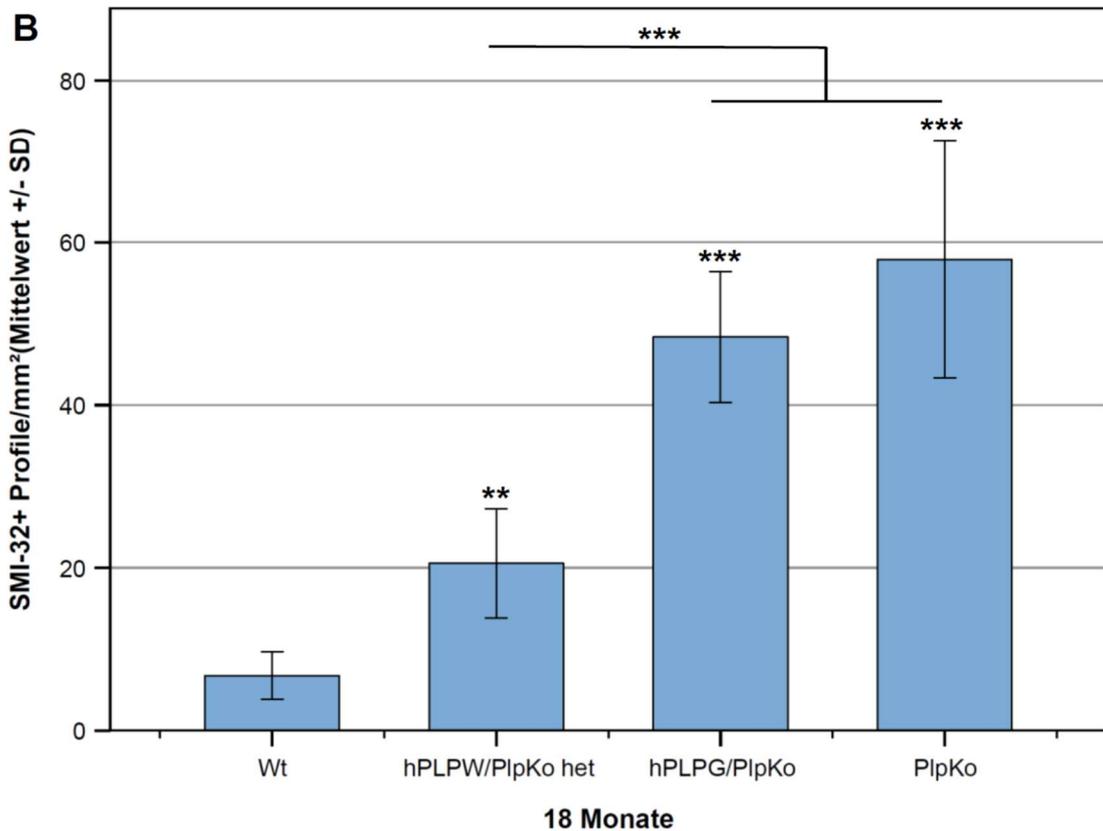
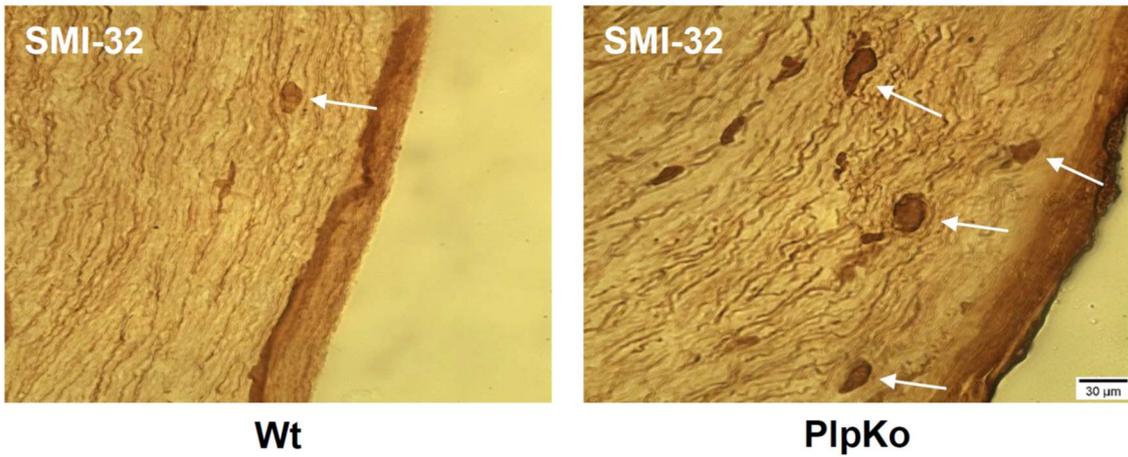


Abbildung 6: Darstellung und Quantifizierung SMI-32 positiver Sphäroide. A) Darstellung nicht-phosphorylierter Neurofilamente mittels SMI-32 und somit von axonalen Sphäroiden (Pfeile) in Wt und PlpKo. **B)** Es konnten signifikante Unterschiede aller drei Mausmutanten (hPLPW/PlpKo het, hPLPG/PlpKo, PlpKo) verglichen zu den Wildtypen (Wt) im Auftreten axonaler Sphäroide gezeigt werden. So zeigten alle Mausmutanten vermehrt axonale Sphäroide, die als Zeichen axonaler Degeneration gewertet wurden. Zwischen den Mausmutanten zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede. Die heterozygoten

hPLPW/PlpKo wiesen geringere axonale Degeneration im Vergleich zu den beiden anderen Mutanten-Gruppen (hPLPG/PlpKo, PlpKo) auf. Diese zeigten untereinander keinen signifikanten Unterschied. (Wt: M: 6,74 Sphäroide/mm² +/- SD: 2,91 Sphäroide/mm²; hPLPW/PlpKo het: M: 20,54 Sphäroide/mm² +/- SD: 6,69 Sphäroide/mm²; hPLPG/PlpKo: M: 48,36 Sphäroide/mm² +/- SD: 8,02 Sphäroide/mm²; PlpKo: M: 57,91 Sphäroide/mm² +/- SD: 14,60 Sphäroide/mm²). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Games-Howell. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; * = p < 0,001. (Wt: n = 12; hPLPW/PlpKo het: n = 7; hPLPG/PlpKo: n = 9; PlpKo: n = 8).**

Bei Multipler Sklerose kommt es neben dem axonalen Schaden im Sehnerv und der Ausdünnung der Nervenfaserschicht der Retina im Verlauf ebenso zu einem zunehmenden Verlust der retinalen Ganglienzellen (RGC) in allen Subtypen der Erkrankung [89]. Diese können auch im Mausmodell durch eine Nissl-Färbung der Retina quantifiziert werden. Die Auszählung erfolgte in einem inneren, Optikus-nahen Segment, einem mittleren und einem äußeren, Optikus-fernen Segment, woraus sich ein Mittelwert für die Anzahl an RGC in der Retina ergibt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Verlust der retinalen Ganglienzellen in allen drei Gruppen der Mutanten (Abbildung 7), wobei die heterozygoten hPLPW/PlpKo tendenziell einen geringeren, aber nicht signifikanten Verlust aufzeigt, verglichen zu hPLPG/PlpKo und PlpKo.

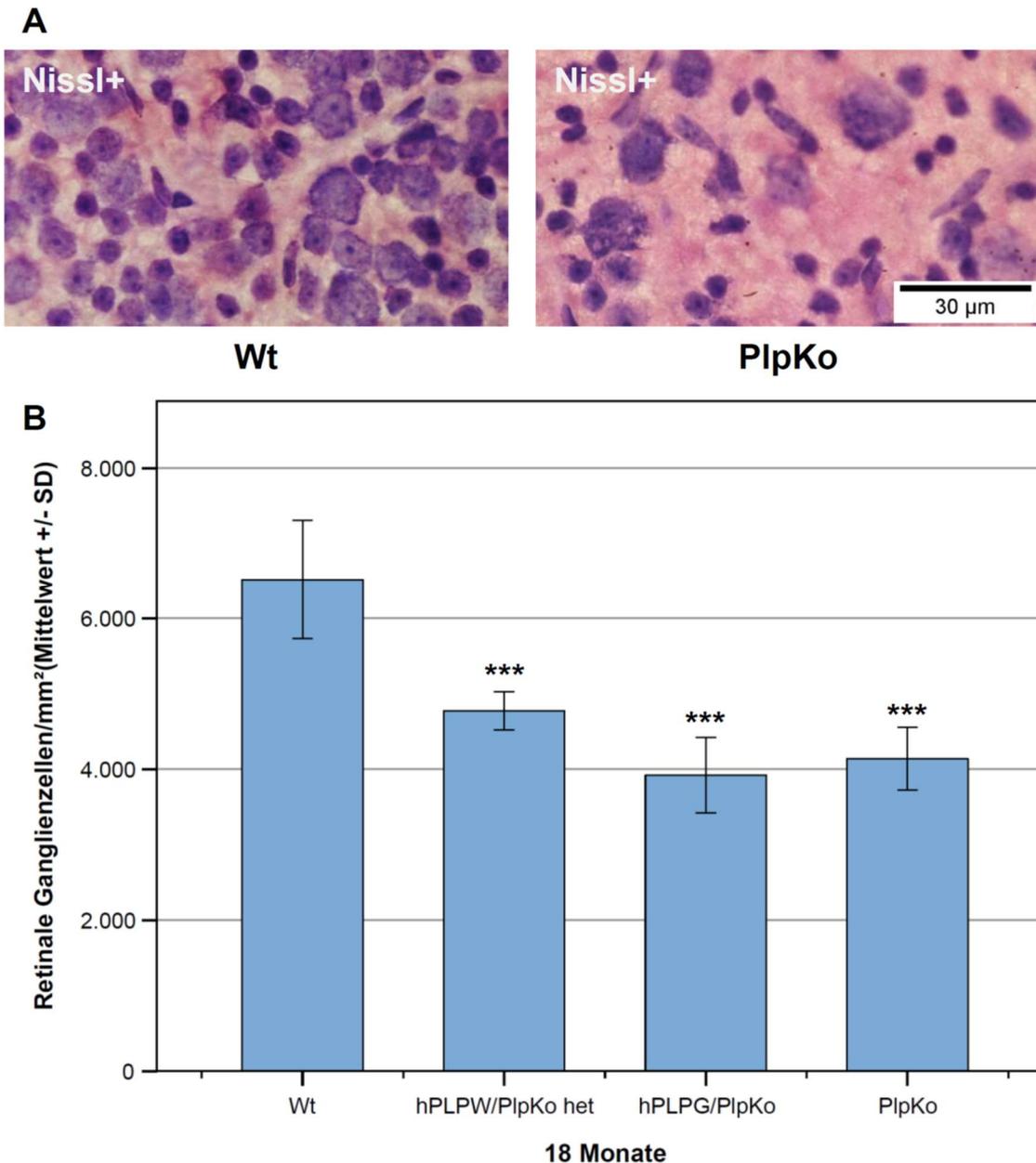


Abbildung 7: Darstellung und Quantifizierung Nissl positiver RGC. A) Darstellung von Retinaganglienzellen (RGC) durch Nissl-Färbung in Wt und PlpKo. B) Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Dichte retinaler Ganglienzellen (RGC) aller Mausmutanten-Gruppen im Vergleich zu den Wildtypen (Wt). Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Mutanten-Gruppen zeigte sich nicht, wobei eine Tendenz zu einem geringeren Verlust retinaler Ganglienzellen (RGC) in den heterozygoten Tieren deutlich wurde. (Wt: M: 6522,19 RGC/mm² +/- SD: 789,69 RGC/mm²; hPLPW/PlpKo het: M: 4773,85 RGC/mm² +/- SD: 252,89 RGC/mm²; hPLPG/PlpKo: M: 3921,66 RGC/mm² +/- SD: 502,30 RGC/mm²; PlpKo: M: 4140,45 RGC/mm² +/- SD: 415,13 RGC/mm²). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Tukey. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001. (Wt: n = 6; hPLPW/PlpKo het: n = 5; hPLPG/PlpKo: n = 5; PlpKo: n = 7).

Als klinisch relevanter nicht-invasiver Verlaufsparemeter diene die hochauflösende optische Kohärenztomographie (OCT). Durch diese Technik ist es möglich die Dicke der einzelnen Retinaschichten, sowohl beim Menschen als auch bei der Maus, zu erfassen. Da in der Multiplen Sklerose eine Ausdünnung der Nervenfaserschicht, der retinalen Ganglienzellschicht sowie der inneren plexiformen Schicht beobachtet werden kann [90], sollten diese Schichten gemeinsam in den verschiedenen Gruppen untersucht werden.

Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied einerseits zwischen Wt zu den heterozygoten hPLPW/PlpKo, andererseits zu hPLPG/PlpKo und PlpKo. Dabei fiel auf, dass zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen den heterozygoten hPLPW/PlpKo zu hPLPG/PlpKo und PlpKo Mausmutanten bestand (Abbildung 8).

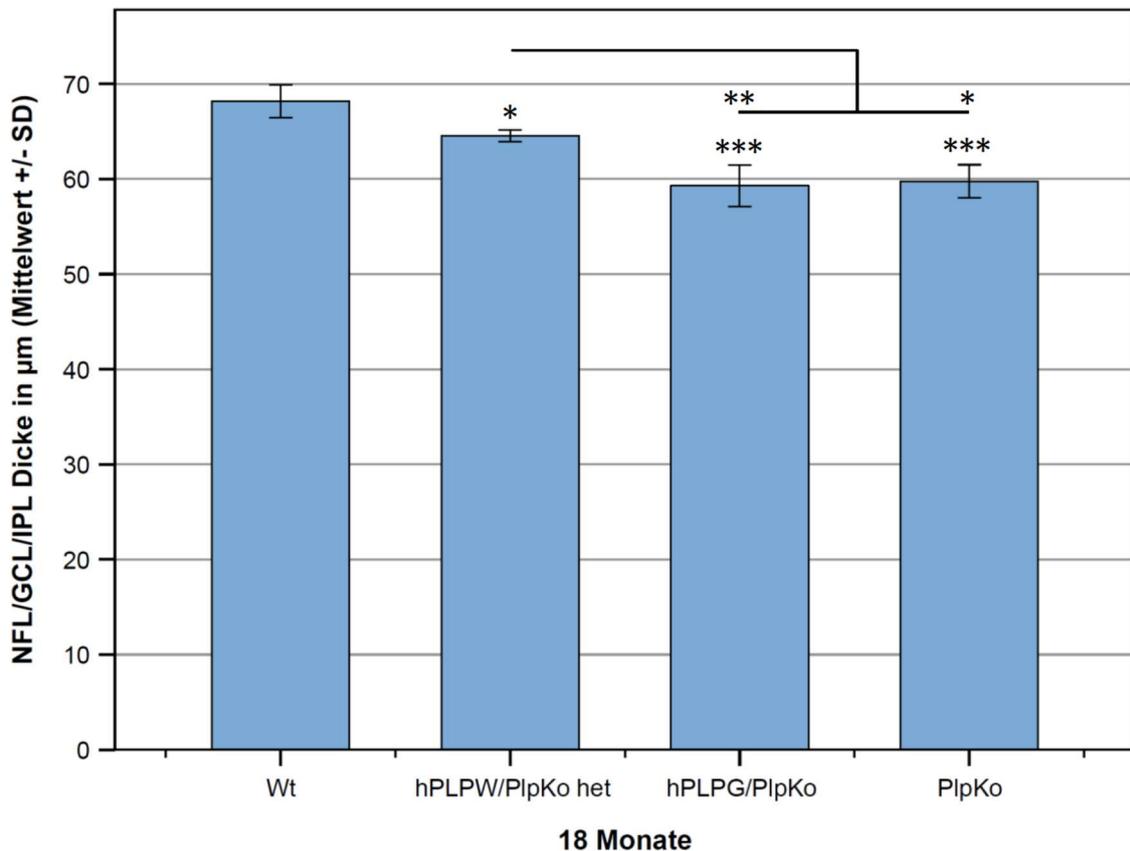


Abbildung 8: Auswertung der Schichten der Retina im OCT. Zwischen den vier Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede, so wiesen alle 18 Monate alten Mausmutanten eine signifikante Ausdünnung der NFL/GCL/IPL gegenüber den Wildtypen (Wt) auf. Es bestand aber auch eine signifikant geringere Ausdünnung der Schichten in den heterozygoten hPLPW/PlpKo im Vergleich zu den hPLPG/PlpKo und PlpKo Mausmutanten. Ein Unterschied zwischen den hPLPG/PlpKo und PlpKo konnte nicht gezeigt werden. (Wt: M: 68,19 µm +/- SD: 1,73 µm; hPLPW/PlpKo het: M: 64,56 µm +/- SD: 0,62 µm; hPLPG/PlpKo: M: 59,29 µm +/- SD: 2,20 µm; PlpKo: M: 59,75 µm +/- SD: 1,75 µm). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Tukey. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; * = p < 0,001. (Wt: n = 8; hPLPW/PlpKo het: n = 3; hPLPG/PlpKo: n = 5; PlpKo: n = 4)**

3.2. Entzündliche Vorgänge in den Mausmutanten

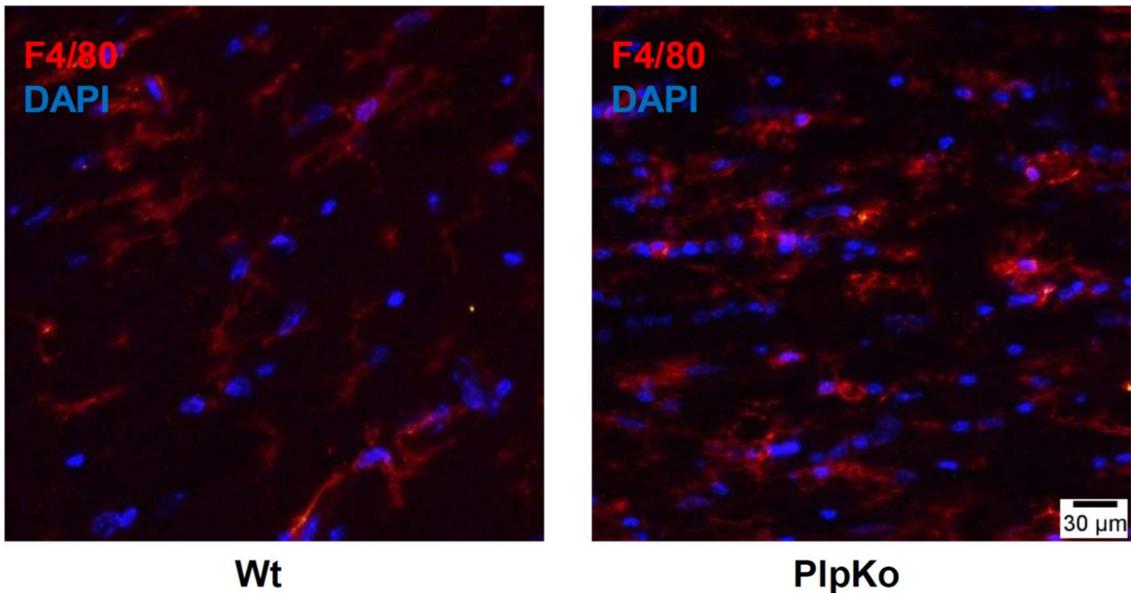
Neben der bisher gezeigten Schädigung von Myelin und Neuron, soll im Folgenden das Vorhandensein verschiedener Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems dargestellt werden. Dazu wurden mittels

Immunhistochemie der Sehnerv in den verschiedenen Mausmutanten nach CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen und F4/80+ Mikroglia/Makrophagen gefärbt.

Als Teil des angeborenen Immunsystems übernehmen Mikroglia vielfältige Aufgaben und gehen bei Schädigung des ZNS in einen aktivierten Zustand über. So konnte auch bei Multipler Sklerose eine erhöhte Anzahl aktivierter Mikroglia im Parenchym gefunden werden und es wird vermutet, dass sie dabei einen Anteil an der Pathogenese haben [60]. Als ein Marker für murine Makrophagen [91] und Mikroglia [92] ist F4/80 bekannt, ein Glykoprotein, das einerseits durch Zell-Zell-Kontakte Teil der Interaktion zwischen natürlichen Killer-Zellen und Makrophagen ist, andererseits an der Entwicklung regulatorischer T-Zellen beteiligt ist [93]. Die Auswertung der Anzahl der Makrophagen/Mikrogliazellen erfolgte im Sehnerv, wobei nur F4/80 positive Profile mit DAPI gefärbtem Zellkern ausgewertet wurden (Abbildung 9).

Hier zeigte sich eine deutliche, signifikante Vermehrung der Makrophagen/Mikrogliazellen in allen drei Mausmutanten-Gruppen, den heterozygoten hPLPW/PlpKo, den hPLPG/PlpKo und den PlpKo, im Vergleich zum Wildtypen.

A



B

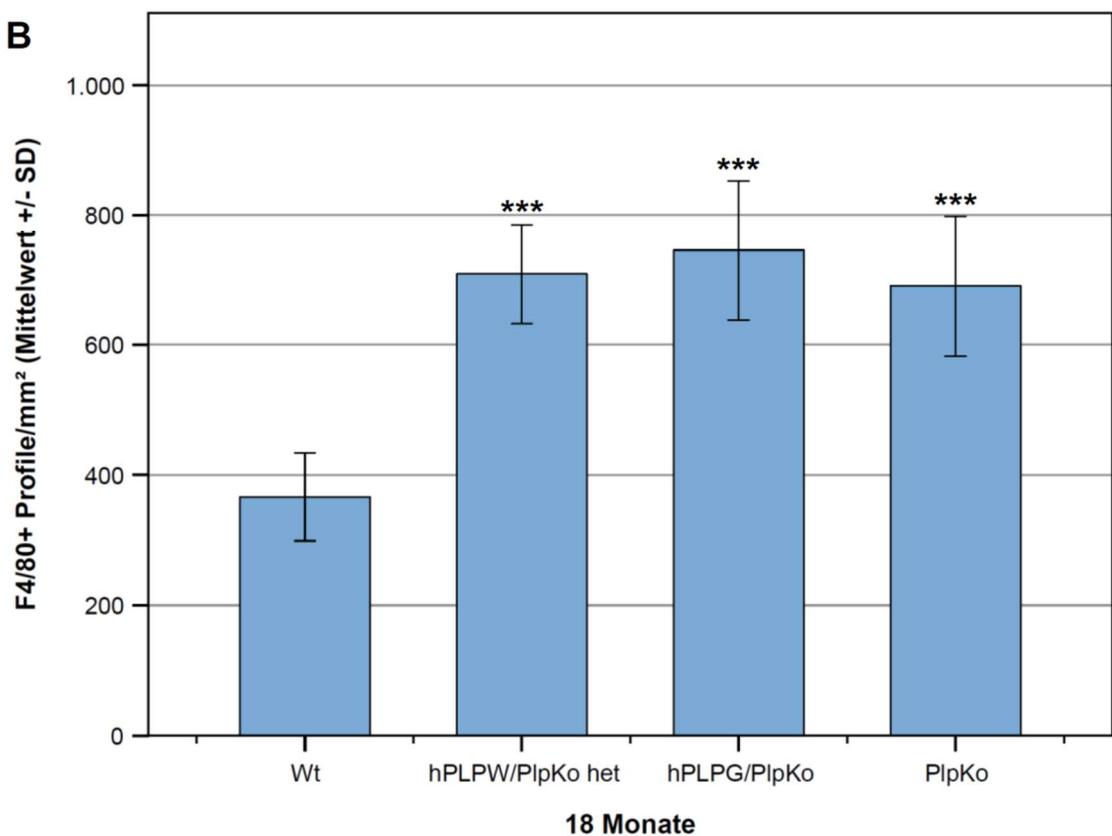


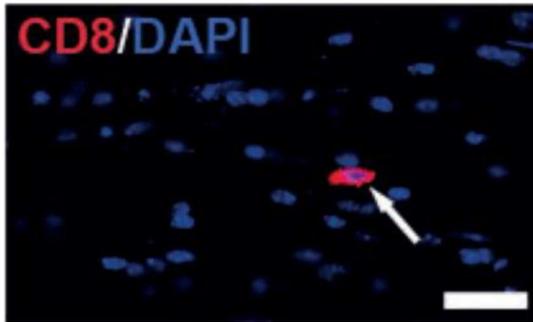
Abbildung 9: Darstellung und Quantifizierung F4/80 positiver Profile. A) Darstellung F4/80 positiver Makrophagen/Mikrogliazellen in Wt und PlpKo. B) Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl dieser in allen drei Mausmutanten-Gruppen (hPLPW/PlpKo het, hPLPG/PlpKo, PlpKo) verglichen zu den Wildtypen (Wt). Ein Unterschied zwischen den

einzelnen Mutantengruppen gab es nicht. (Wt: M: 366,12 F4/80+ Profil/mm² +/- SD: 23,80 F4/80+ Profil/mm²; hPLPW/PlpKo het: M: 708,58 F4/80+ Profil/mm² +/- SD: 76,27 F4/80+ Profil/mm²; hPLPG/PlpKo (M: 745,03 F4/80+ Profil/mm² +/- SD: 107,55 F4/80+ Profil/mm²; PlpKo: M: 690,11 F4/80+ Profil/mm² +/- SD: 108,15 F4/80+ Profil/mm²). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Tukey. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001. (Wt: n = 8; hPLPW/PlpKo het: n = 4; hPLPG/PlpKo: n = 6; PlpKo: n = 4)

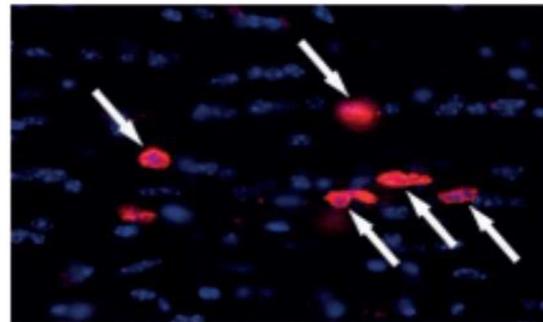
Neben den CD8+ T-Zellen scheinen auch CD4+ T-Zellen und ihre vielen Unterformen einen großen Einfluss auf die Pathogenese der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose zu haben [94, 95]. Deshalb wurde sowohl die Anzahl von CD8+, als auch von CD4+ T-Zellen in den Mausmutanten ausgewertet (Abbildung 10 und Abbildung 11). Auch hier wurden Schnitte des Sehnervs analysiert, wobei nur CD4+/CD8+ Profile gewertet wurden, die einerseits im Parenchym lokalisiert und andererseits einen mit DAPI gefärbten Zellkern besaßen.

Dabei sah man einen signifikanten Anstieg der CD8+ T-Zellen im Vergleich zwischen Wt und den heterozygoten hPLPW/PlpKo sowie hPLPG/PlpKo. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wt und PlpKo konnte zwar nicht festgestellt werden, allerdings zeigte sich durchaus ein Trend zu einer erhöhten Anzahl CD8+ T-Zellen, sodass die fehlende Signifikanz auch durch die hohe Standardabweichung bedingt sein kann. Hier bräuchte es weitere Untersuchungen mit mehr Mäusen (Abbildung 10).

In der Analyse CD4+ T-Zellen zeigte sich überraschenderweise eine signifikante Zunahme dieser in den heterozygoten hPLPW/PlpKo im Vergleich zu den Wt und hPLPG/PlpKo. Ein signifikanter Unterschied zwischen den heterozygoten hPLPW/PlpKo und den PlpKo Mäusen ließ sich zwar nicht feststellen, das könnte allerdings auch der hohen Standardabweichung der PlpKo geschuldet sein und würde weitere Untersuchungen benötigen. Ein Unterschied zwischen Wt und hPLPG/PlpKo und PlpKo konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 11).

A

Wt



hPLPG/PlpKo

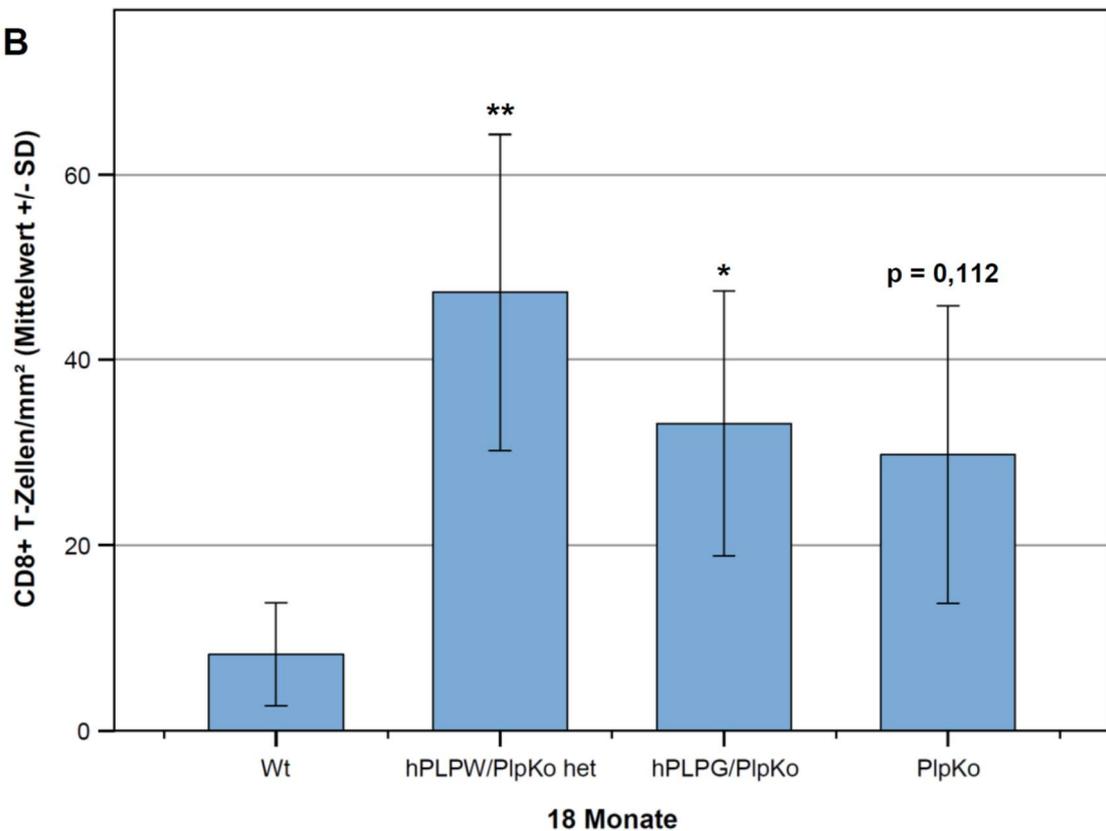
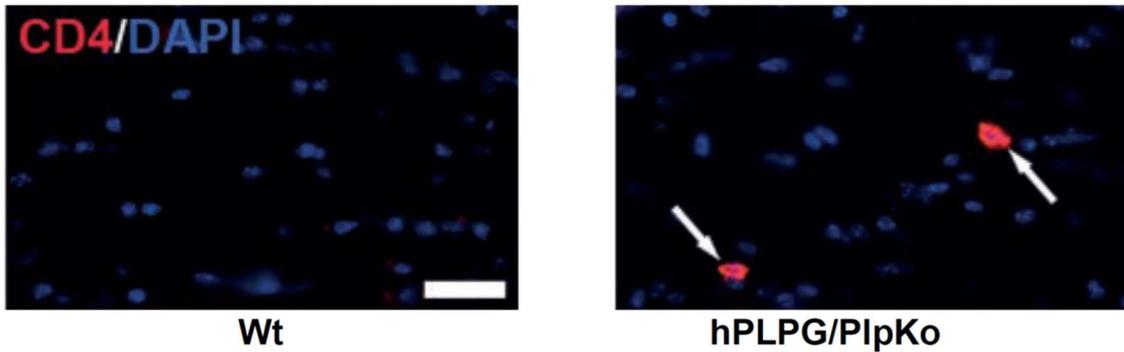
B

Abbildung 10: Darstellung und Quantifizierung CD8 positiver T-Zellen. A) Repräsentative Darstellung von CD8+ T-Zellen (weiße Pfeile), modifiziert nach Groh et al. 2016 [82], mit freundlicher Genehmigung durch Oxford University Press. Maßstab: 30µm. **B)** Bei der Suche nach CD8 positiven T-Zellen konnte eine signifikant vermehrte Anzahl dieser in zwei Gruppen der Mausmutanten (hPLPW/PlpKo het, hPLPG/PlpKo) verglichen zu den Wildtypen (Wt) gezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen (Wt) und PlpKo konnte zwar nicht gezeigt werden, allerdings zeigte sich auch hier eine Tendenz zu erhöhten Werten CD8 positiver T-Zellen. (Wt: M: 8,22 CD8+ T-Zelle/mm² +/- SD: 5,55 CD8+ T-Zelle/mm²; hPLPW/PlpKo het: M: 47,27 CD8+ T-Zelle/mm² +/- SD: 17,08 CD8+ T-Zelle/mm²; hPLPG/PlpKo: M: 33,08 CD8+ T-Zelle/mm² +/- SD: 14,27 CD8+ T-Zelle/mm²;

PlpKo: M: 29,75 CD8+ T-Zelle/mm² +/- SD: 16,03 CD8+ T-Zelle/mm²). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Tukey. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001. (Wt: n = 6; hPLPW/PlpKo het: n = 6 hPLPG/PlpKo: n = 8; PlpKo: n = 6).

A



B

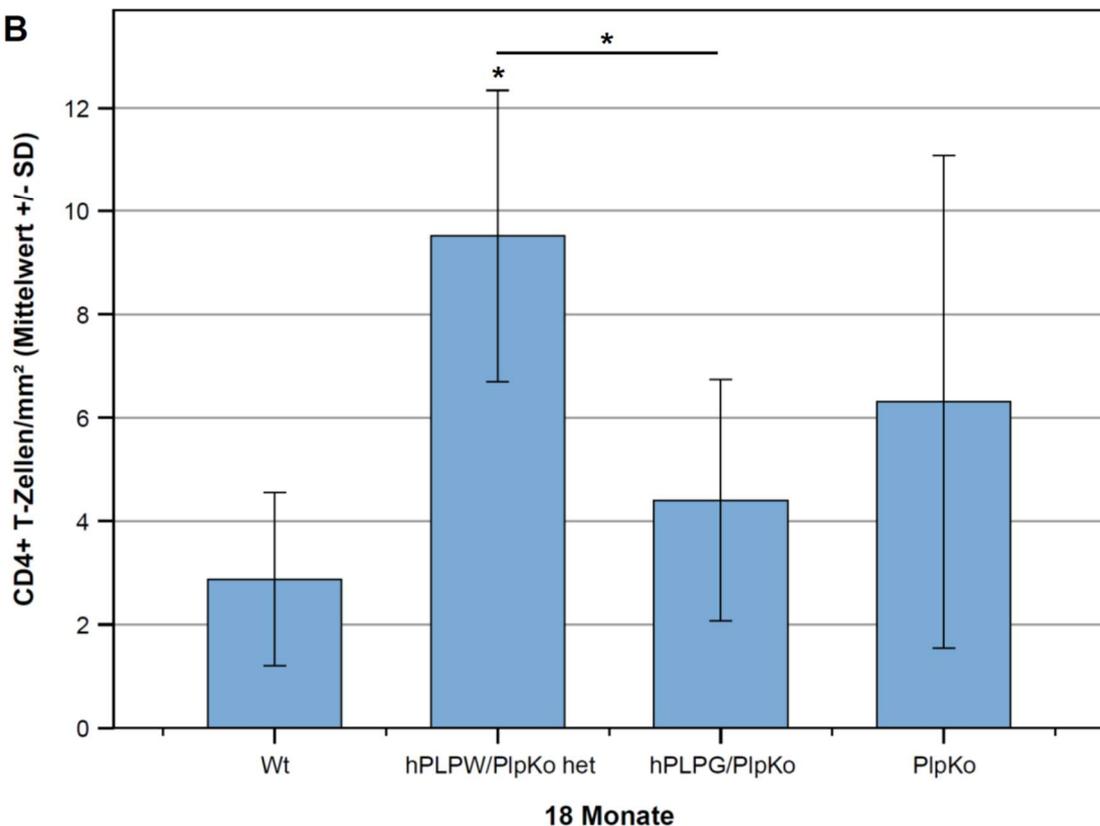


Abbildung 11: Darstellung und Quantifizierung CD4 positiver T-Zellen. A) Repräsentative Darstellung von CD8+ T-Zellen (weiße Pfeile), modifiziert nach Groh et al. 2016 [82], mit freundlicher Genehmigung durch Oxford University Press. Maßstab: 30µm. B) Die Auszählung CD4 positiver T-Zellen zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl dieser in den

heterozygoten hPLPW/PlpKo Mausmutanten im Vergleich zu den Wildtypen, aber auch verglichen zu den hPLPG/PlpKo Mausmutanten. Ein signifikanter Unterschied zwischen hPLPW/PlpKo het und PlpKo konnte nicht nachgewiesen werden, wobei aber eine Tendenz zu sehen war. Ein Unterschied zwischen den Wildtypen (Wt) und den anderen Mausmutanten (hPLPG/PlpKo, PlpKo) konnte nicht gezeigt werden. (Wt: M: 2,88 CD4+ T-Zelle/mm² +/- SD: 1,67 CD4+ T-Zelle/mm²; hPLPW/PlpKo het: M: 9,52 CD4+ T-Zelle/mm² +/- SD: 2,82 CD4+ T-Zelle/mm²; hPLPG/PlpKo: M: 4,40 CD4+ T-Zelle/mm² +/- SD: 2,33 CD4+ T-Zelle/mm²; PlpKo: M: 6,31 CD4+ T-Zelle/mm² +/- SD: 4,77 CD4+ T-Zelle/mm²). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Games-Howell. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. (Wt: n = 5; hPLPW/PlpKo het: n = 6; hPLPG/PlpKo: n = 7; PlpKo: n = 5).

3.3. Klinischer Phänotyp

Nachdem in den Tieren sowohl eine entzündliche Komponente als auch Schaden an Neuronen und Myelin nachgewiesen werden konnte, war nun die klinische Auswirkung dieser Veränderungen interessant. Dafür wurden die Tiere auf eine sich konstant beschleunigende Walze des Rotarod Apparats gesetzt und die Zeit gemessen, wie lange sie auf dieser balancieren konnten (Abbildung 12). Hier präsentierte sich in der kumulativen Analyse der Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und den hPLPG/PlpKo sowie PlpKo. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und den heterozygoten hPLPW/PlpKo Mutanten konnte nicht gezeigt werden, zwischen diesen und den beiden anderen Mutanten allerdings durchaus. Zwischen den hPLPG/PlpKo und den PlpKo gab es keinen signifikanten Unterschied.

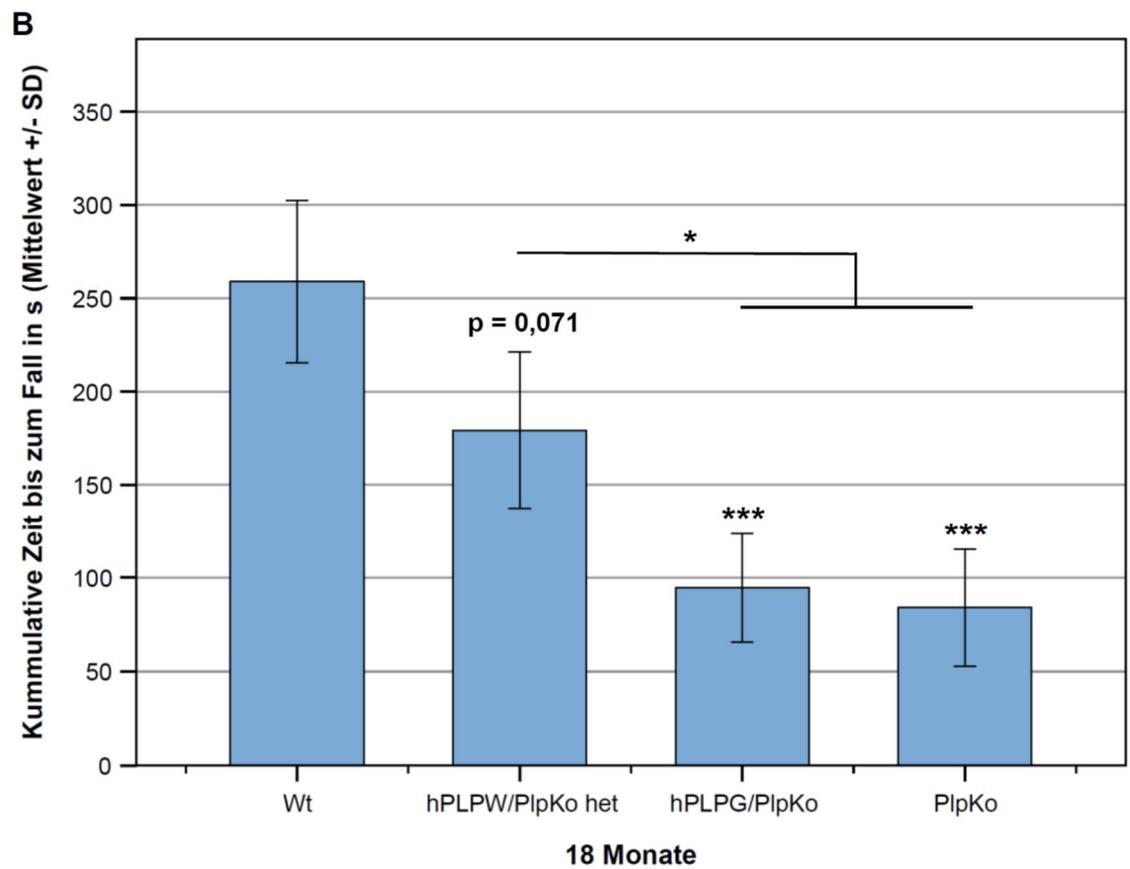
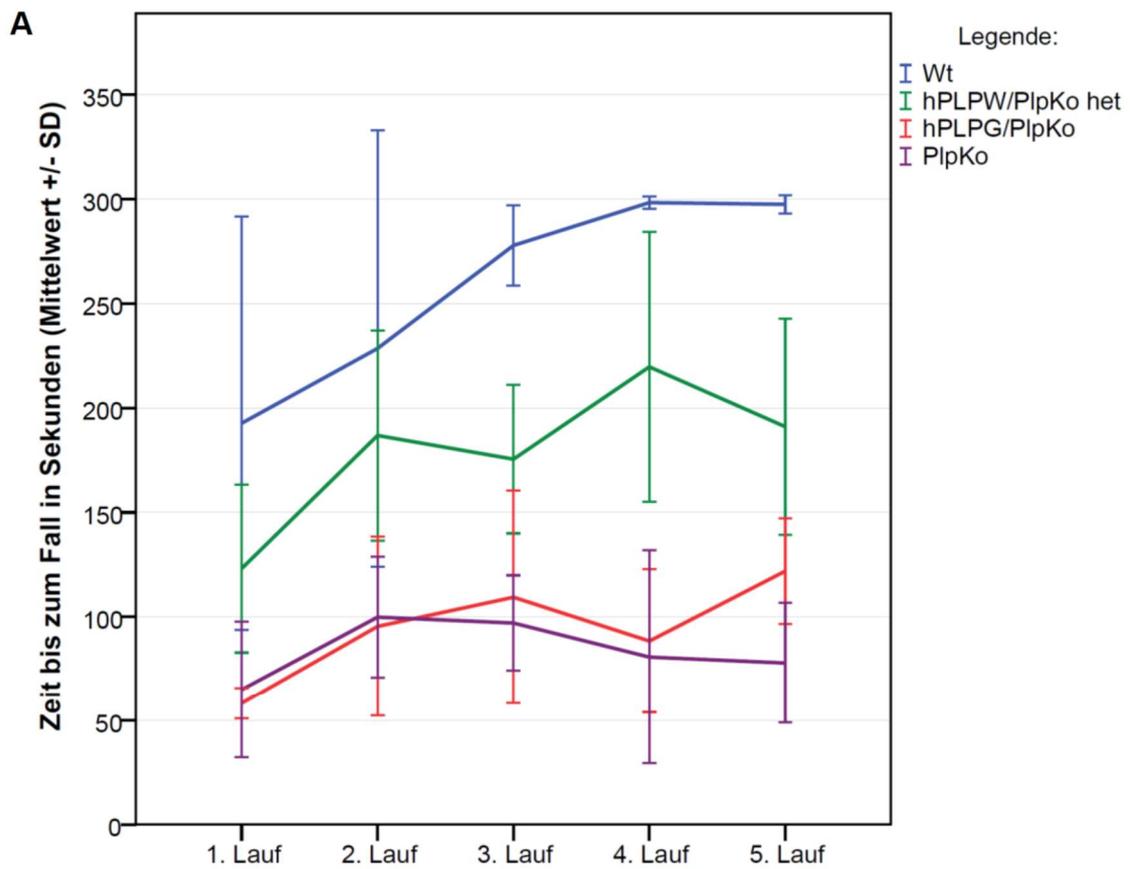


Abbildung 12: Auswertung der Rotarod-Analyse. A) Graphische Darstellung der Rotarod Analyse in den einzelnen Läufen. B) In der Rotarod Analyse zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypen und den hPLPG/PlpKo sowie PlpKo Mausmutanten. Die heterozygoten hPLPW/PlpKo Mutanten nehmen hier einen Mittelplatz zwischen den Wildtypen und den beiden anderen Gruppen ein. Ein signifikanter Unterschied zwischen hPLPW/Ko und Wt konnte nicht gezeigt werden, ein signifikanter Unterschied zu den anderen Mutanten (hPLPG/PlpKo, PlpKo) jedoch schon. (Wt: M: 258,97 s +/- SD: 43,53 s; hPLPW/PlpKo het: M: 179,22 s +/- SD: 41,98 s; hPLPG/PlpKo: M: 94,65 s +/- SD: 28,97 s; PlpKo: M: 84,07 s +/- SD: 41,98 s). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA in SPSS mit darauffolgenden Post-Hoc-Test nach Tukey. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$. (Wt: n = 3; hPLPW/PlpKo het: n = 4; hPLPG/PlpKo: n = 4; PlpKo: n = 3)**

4. Diskussion

4.1. Klinische Ausprägung der Mutationen

Das Ziel dieser Arbeit war es, 18 Monate alte Mausmutanten sowohl auf ihre klinische Präsentation sowie auf den Schaden an Myelin und Nervenzellen zu untersuchen, als auch eine Entzündungsreaktion nachzuweisen, die mit dem klinischen und histologischen Bild einer progressiven Multiplen Sklerose vereinbar ist.

Zunächst wurde die Auswirkung der Mutationen auf klinische Aspekte untersucht. Hierzu diente eine Methode, die bereits in einigen neurowissenschaftlichen Arbeiten Anwendung fand. Es handelt sich um das Rotarod, eine Messmethode, die objektiv und in vivo die motorischen Fähigkeiten der Mäuse bewerten soll. Diese Methode eignet sich hier besonders, da es einerseits bereits Voruntersuchungen in PlpKo Mausmutanten gab [15, 16] sowie andererseits Untersuchungen in Mäusen mit experimenteller Autoimmun Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell für Multiple Sklerose [96]. Diese zeigten eine gute Korrelation zwischen dem Abschneiden der Mäuse auf dem Rotarod und ihrer allgemeinen klinischen Erscheinung. In den Untersuchungen der PlpKo Mäuse mittels Rotarod zeigte sich zunächst kein Unterschied zu den Kontrollen, allerdings konnte in zunehmendem Alter durchaus eine Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten gezeigt werden [15, 16].

Die Auswertung der 18 Monate alten Mäuse ergab eine deutliche Verschlechterung der motorischen Leistung in den hPLPG/PlpKo und PlpKo mutanten Gruppen, wobei für die heterozygoten Tiere lediglich ein Trend zu einer geringeren Leistung zu erkennen war. Somit konnten auch die Ergebnisse der bereits erwähnten Studie bestätigt werden, die ebenfalls eine geringere Leistung in 16 Monate alten PlpKo Mäusen zeigte [16]. Die Diskrepanz zwischen homo- und heterozygoten Tieren könnte unter anderem durch das Vorhandensein gesunder ODZ in den heterozygoten Tieren erklärt werden, worauf aber noch detaillierter eingegangen werden soll.

Diese Ergebnisse passen somit gut in das Bild einer progressiven Multiplen Sklerose, da es sowohl bei der progressiven Form der Multiplen Sklerose, als auch bei der von Warshawsky beschriebenen Patientin [77] zu einer progressiven spastischen Paraparese der Beine kam [54, 64]. Neben der PPMS zeigen auch andere neurodegenerative Erkrankung, deren Grundlage eine Mutation des PLP-Gens ist, eine kontinuierliche Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten. So kommt es bei der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit von Geburt an zu einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung sowie im Verlauf der Erkrankung zu einer Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten und Ausbildung von Spastiken [80]. Auch bei der hereditären spastischen Paraplegie kommt es nach zunächst normaler motorischer Entwicklung zu einer zunehmenden motorischen Schwäche und Spastik [80].

Insgesamt lässt sich somit für die Mutanten eine PMS typische Klinik nachweisen, wobei diese selbstverständlich nicht pathognomonisch für diese Erkrankung ist.

4.2. Schaden an Neuron und Myelin

Bei der Beschreibung der ersten histopathologischen Untersuchungen aktiver Läsionen in Multipler Sklerose durch Charcot, wurde das Augenmerk zunächst auf die Inflammation und Demyelinisierung gelegt, bei relativem Erhalt der Axone [21]. Allerdings erkannte auch Charcot bereits axonale Veränderungen und im Verlauf gelang man zu der Erkenntnis, dass es neben Inflammation und Demyelinisierung auch zu neurodegenerativen Prozessen in MS kommt [21]. So kann man sowohl in aktiven Läsionen als auch in der progressiven Form der MS einen Untergang von Axonen beobachten [22, 39]. Bei der PMS ist diese neurodegenerative Komponente nicht mehr nur in Läsionen der weißen Substanz zu finden, sondern auch in der grauen Substanz sowie diffus im Parenchym des ZNS [39]. So auch in der Retina und im Sehnerv, wobei gezeigt werden konnte, dass es in allen Formen der MS zu einem signifikanten Verlust retinaler Ganglienzellen sowie einem Untergang von Axonen des Sehnervs kommt [89]. Da es sich bei dem visuellen System sowohl beim Menschen als auch in der Maus um eine leicht zu untersuchende Struktur handelt, wurde in dieser Arbeit

hauptsächlich die Retina sowie der Sehnerv von Mäusen zur Analyse herangezogen.

Zunächst wurden die Mäuse mittels hochauflösender Optischer Kohärenztomographie (SD-OCT) untersucht. Dieses Verfahren bietet in der Medizin die Möglichkeit die Retina (aber auch Arterien zum Beispiel in der Kardiologie im Rahmen der Katheterdiagnostik [97]) zu untersuchen und dabei die unterschiedlichen Schichten der Retina darzustellen. Vielfach findet die SD-OCT-Untersuchung Anwendung in der Ophthalmologie, beispielsweise in der Diagnostik der diabetischen Retinopathie oder des Glaukoms. Ebenso kommt sie vermehrt in der Neurologie im Rahmen wissenschaftlicher Studien bei neurologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose, Optikusneuritis, Alzheimer Demenz, M. Parkinson, Migräne, M. Huntington und einigen anderen zur Anwendung [98]. Durch die ausführliche Erforschung der Möglichkeiten des OCT in klinischen Studien, ist es besonders interessant auch die Mausmutanten mittels OCT zu untersuchen. Außerdem gab es bereits Versuche an Mäusen im Rahmen einer anderen neurodegenerativen Erkrankung der Neuronalen Ceroid Lipofuszinose. Hier konnte auch im Mausmodell ein Zusammenhang zwischen dem histologisch nachweisbaren Untergang retinaler Ganglienzellen und der Ausdünnung dieser Schichten im OCT gezeigt werden [86], womit diese Untersuchung als nicht invasive in vivo stattfindende Technik ein gut zugänglicher Parameter zur Darstellung axonaler Schädigung und retinaler Zelldegeneration ist. Das bestätigte sich auch in dieser Arbeit, da sich in allen Mutanten eine Ausdünnung der Schicht zeigte, die aus Ganglienzellen, Nervenfasern und der inneren plexiformen Schicht besteht, wobei dies bei den heterozygoten Tieren nicht so ausgeprägt war.

Die retinale Zelldegeneration wurde weiter analysiert, indem Retina-Präparate mittels Nissl-Färbung auf die Dichte retinaler Ganglienzellen untersucht wurden. Die aus den retinalen Ganglienzellen hervorgehenden Axone bleiben zunächst unmyelinisiert und ergeben die retinale Nervenfaserschicht. Nach Austritt aus der Retina werden diese Axone mit einer Myelinschicht, bestehend aus ODZ, umgeben und bilden den Sehnerv, entlang dem die visuellen Informationen

transportiert werden [99]. Hier zeigte sich eine reduzierte Dichte retinaler Ganglienzellen in allen Mausmutanten, wobei es zwischen den Mutanten keine signifikanten Unterschiede gab. Allerdings zeichnete sich in den heterozygoten Tieren doch ein Trend zu einem geringeren Verlust von RGC ab, verglichen zu den anderen Mausmutanten. Dieser Verlust an RGC könnte als Folge der Durchtrennung des zugehörigen Axons im Nervus opticus und anschließender retrograder Degeneration gewertet werden. So konnte in verschiedenen Studien ein Zusammenhang zwischen der Durchtrennung des Axons und dem Verlust von RGC hergestellt werden [100–102].

Zur genaueren Analyse des axonalen Schadens wurden die Sehnerven der Mäuse nach SMI-32 gefärbt und analysiert. SMI-32 ist ein Marker für nicht-phosphoryliertes Neurofilament, das in Nervenzellen, ihren Axonen und ihren Dendriten vorkommt. Da dieses in gesunden Nervenzellen mit intakter Myelinscheide nicht durch Antikörper immunhistochemisch erfasst wird, dient SMI-32 als Marker für axonalen Schaden. Dieser wird durch SMI-32 angefärbte axonale Sphäroide dargestellt, die einerseits auf eine Irritation, andererseits auf die vollständige Durchtrennung des Axons hinweisen [22]. Diese Sphäroide sind auch im Elektronenmikroskop nachweisbar, wobei sie zusammen mit Vakuolen, Zeichen der kompletten Degeneration eines Axons [87], axonalen Schaden anzeigen [88]. Die EM-Auswertung (12 Monate alte Tiere) konnte eine vermehrte Neurodegeneration in den Mutanten aufzeigen, wobei auch hier die heterozygoten Tiere weniger stark betroffen zu sein scheinen. Für die Plp defizienten Tiere hingegen ist ein vermehrtes Auftreten von Sphäroiden bereits bekannt [16, 88]. Dieser Trend und diese bereits bekannte Tatsache konnte schlussendlich in der Analyse SMI-32 positiver Sphäroide (18 Monate alte Tiere) bestätigt werden.

Diese Ergebnisse passen insgesamt gut in das Bild einer Multiplen Sklerose. So konnte im OCT von Patienten die unter verschiedenen Subtypen von Multipler Sklerose, RRMS, PPMS oder SPMS leiden, eine Ausdünnung der Nervenfaserschicht [63, 90, 103–108] und der Kombination aus Ganglienzellschicht sowie innerer plexiformer Schicht [90, 108–112] gefunden

werden. Einige Studien vermuten auch einen Zusammenhang zwischen der Ausdünnung und klinischen Verlaufsparemtern wie dem EDSS (Expanded Disability Status Scale) und SDMT (Symbol Digit Modalities Test) [110, 111, 113] sowie eine positive Korrelation mit einer verringerten Sehleistung [105, 107, 111–115].

Außerdem zeigt sich bei MS-Patienten ebenfalls eine reduzierte Dichte an retinalen Ganglienzellen im Vergleich zur Normalbevölkerung [89]. In das Bild passt auch das vermehrte Auftreten von axonalen Sphäroiden, die sich in Biopsien von MS-Patienten finden, wobei sie dort unter anderem aus einer Ansammlung von Mitochondrien bestehen [116]. Auch hier sind sie Zeichen der Schädigung oder Ausdruck der ablaufenden Waller'schen Degeneration [117].

Da es sich bei MS um eine demyelinisierende Erkrankung handelt, wurden die Sehnerven auch ultrastrukturell analysiert. Um Schäden an Myelin zu charakterisieren wurde die Anzahl an dünn-, und demyelinisierten Axonen ins Verhältnis zur Gesamtanzahl an Axonen gesetzt. Dabei zeigen dünnmyelinisierte Axone Remyelinisierung an, die auch in MS-Läsionen zu finden ist [116]. Dies kann auch als indirektes Maß für bereits davor abgelaufenen Schaden an ODZ gesehen werden. In den 12 Monate alten Tieren zeigt sich ein höherer Anteil dünn- oder demyelinisierter Fasern in den Mausmutanten, wobei es auch hier den Anschein hat, dass die heterozygoten Tiere nicht so stark betroffen sind. Da Groh et al. zeigen konnten, dass in jüngeren Tieren eine höhere Anzahl Axone myelinisiert ist, kann hier am ehesten von einer Demyelinisierung, passend zur PMS, ausgegangen werden [82]. Somit konnte gezeigt werden, dass es, passend zur Histopathologie der PMS, zu einer Schädigung der Neurone und des Myelins kommt. Die nächste Frage lautet, wie es zu Schäden an retinalen Ganglienzellen, Axonen und Myelin kommt. Bei Betrachtung dieses Mausmodells als mögliches Modell für PMS, kommt dabei als erstes das Immunsystem in den Sinn, andererseits könnte natürlich allein der genetische Schaden zu einer Störung der Integrität des Myelins und in der Folge zu einer Störung des Neurons kommen.

4.3. Immunzellen

Um dieser Frage weiter auf den Grund zu gehen, wurden zunächst das Vorhandensein von Zellen des adaptiven und natürlichen Immunsystems analysiert.

4.3.1. Auswirkung des angeborenen Immunsystems

Zum angeborenen Immunsystem des ZNS zählen hauptsächlich Mikrogliazellen, die ungefähr 10% der Zellmasse des ZNS ausmachen [118, 119]. Diese sind zumindest im Mausmodell bereits früh in der Embryonalphase in das ZNS eingewandert und stammen von frühen Vorläuferzellen aus dem Dottersack ab. Diese Vorläuferzellen werden außerhalb des ZNS zunächst durch Zellen ersetzt, die vom Dottersack in die Leber gewandert sind, hieraus entwickeln sich die Gewebemakrophagen. In einem weiteren Schritt werden in vielen Organen, zum Beispiel Haut und Darm, die Gewebemakrophagen durch Monozyten ersetzt, die von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark abstammen. Diese bilden sich zu Makrophagen aus. Neben den Mikrogliazellen im ZNS gibt es noch perivaskuläre und meningeale Makrophagen, die ebenfalls von den beschriebenen frühen Vorläuferzellen aus dem Dottersack abstammen. Eine Sonderrolle nimmt hier der Choroidplexus ein, der im adulten Zustand sowohl Makrophagen aus den frühen Vorläuferzellen als auch Makrophagen, die aus dem Knochenmark stammen, beherbergt [7].

Mikroglia erfüllt sowohl im gesunden als auch im geschädigten ZNS verschiedenste Aufgaben. So sind sie einerseits im Gesunden für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellen, Synapsen und des Myelins verantwortlich [118, 120]. Andererseits werden diese Mikrogliazellen bei Verletzungen des Gewebes aktiviert und können nun phagozytotisch aktiv werden sowie zytotoxische und proinflammatorische Zytokine sezernieren, um sowohl das adaptive als auch das natürliche Immunsystem zu aktivieren [118, 120]. Außerdem konnte in in-vitro und Mausexperimenten gezeigt werden, dass Mikroglia auch Antigen-präsentierende Rollen übernehmen und damit zur Aktivierung von T-Zellen beitragen können [120, 121]. Zudem wird vermutet, dass Mikroglia über die Produktion von ROS und NO zu einer Schädigung von

Neuronen und Myelin beitragen können [66, 122, 123]. Auch durch die Produktion von Zytokinen, kann es beispielweise durch Aktivierung von Astrozyten zu Neurotoxizität kommen [124]

Aufgrund ihrer vielschichtigen Aufgaben spielen Mikrogliazellen eine wichtige Rolle in verschiedenen Erkrankungen des ZNS, so findet man eine Aktivierung der Mikroglia, einerseits bei akuten Schädigungen des ZNS, wie bei einem Schlaganfall, aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer Demenz, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Huntington und vielen anderen [118, 119]. Hier scheinen sowohl die phagozytotischen Eigenschaften als auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine eine Rolle zu spielen [7].

Auch bei der PMS werden den Mikrogliazellen eine wichtige Rolle zugeordnet, so sind sie beispielsweise vermehrt an den Grenzen chronischer Läsionen zu finden [125] oder sind vermehrt in der Nähe von axonalem Schaden lokalisiert [126, 127]. Außerdem zeigt sich eine erhöhte Aktivität der Mikrogliazellen in Arealen mit Zeichen einer kortikalen Demyelinisierung sowie einer diffusen Schädigung der normal erscheinenden weißen Substanz [39]. Außerdem scheinen sie in MS phagozytotisch tätig zu sein, da Mikroglia gefüllt mit neuronalen Proteinen und Myelinbestandteilen gezeigt werden konnten [128, 129].

Deswegen war es hoch interessant, ob es auch in diesem Mausmodell zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen kommen würde. Und tatsächlich konnte man in allen drei Mutanten-Gruppen eine signifikant erhöhte Anzahl an Mikroglia/Makrophagen finden. Dies stimmt mit der Aktivierung von Mikroglia in MS überein. Selbstverständlich ist in dieser Arbeit kein Nachweis erfolgt, dass das natürliche (oder auch das adaptive) Immunsystem eine Rolle in der Pathogenese spielt. So könnten Mikroglia auch eine rein phagozytotische Aufgabe erfüllen oder durch Sekretion neuroprotektiver Zytokine unter Umständen protektiv für das ZNS sein [120, 130]. Andererseits ist es durchaus möglich, dass auch Mikroglia aktiv an der Demyelinisierung und dem Auftreten neuronalen Schadens beteiligt sind. So könnten sie einerseits die Aufrechterhaltung eines inflammatorischen Milieus durch Ausschütten proinflammatorischer

Zytokine und durch Antigen-Präsentation fördern oder andererseits selbst durch das Sezernieren zytotoxischer Moleküle an der Pathogenese beteiligt sein. So konnte auch in diesem Mausmodell durch Groh und Kollegen nachgewiesen werden, dass Mikroglia maßgeblich an der Pathogenese beteiligt sind und es nach Inhibition dieser zu einer deutlichen Verbesserung der histopathologischen Veränderungen kommt [131].

In anderen Studien konnte der Einfluss von Sialoadhesin (Sn) auf die Wirkung von Mikroglia/Makrophagen gezeigt werden. Sialoadhesin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das unter anderem im ZNS unter inflammatorischen Umständen hochreguliert wird [132]. Auch in diesem Mausmodell konnte durch Groh und Kollegen bei PlpKo und homozygoten hPLPW/PlpKo und hPLPG/PlpKo Mutanten neben einer erhöhten Anzahl an Makrophagen/Mikroglia eine verstärkte Expression von Sialoadhesin (Sn) festgestellt werden [82].

Für dieses Molekül konnten verschiedene Funktionen nachgewiesen werden, in der Interaktion mit regulatorischen T-Zellen, Antigenpräsentation, Phagozytose und Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. So konnte für Sn eine entscheidende Rolle in der Interaktion von Mikroglia/Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden [133, 134]. Dabei war in Mutanten, denen Sn fehlte, eine geringere Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen zu sehen. Außerdem konnte eine deutliche Reduzierung des Schadens im ZNS aufgezeigt werden.

Diese Auswirkung kann auf verschiedenen Grundlagen basieren, so konnte für Sn scheinbar eine direkte Rolle bei der Antigenpräsentation und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen in-vitro gezeigt werden [135]. Dieser Verdacht kann auch in einem Mausmodell für neuronale Ceroid Lipofuszinose (NCL) gestärkt werden, da hier eine hohe Expression von CD11c auf den meisten Sn⁺ Mikroglia/Makrophagen beobachtet werden konnte sowie die Tatsache, dass Sn⁺ Mikroglia/Makrophagen in direkten Kontakt zu CD8⁺ T-Zellen stehen [134]. Von Interesse dabei ist, dass CD11c⁺ Mikroglia/Makrophagen (in einem EAE-Modell und einem Cuprizone-Modell) ähnliche antigenpräsentierende

Eigenschaften wie bei dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnten [136, 137].

Eine weitere, möglicherweise zur pathogenen Rolle von Sn beitragende, Tatsache ist die Interaktion mit regulatorischen T-Zellen. So konnte zum einem in einem EAE-Modell eine Herabregulierung CD4⁺ CD25⁺ regulatorischer T-Zellen gezeigt werden [138]. Zum anderen konnte im Mausmodell für NCL bei Sn defizienten Mäusen ein Anstieg CD8 positiver T-Zellen beobachtet werden, die einen regulatorischen Phänotyp aufwiesen. So konnte ein möglicher hemmender Effekt von Sn auf regulatorische CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺ CD122⁺) und damit verstärkt zytotoxische CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden [134]. Auch konnte durch Hemmung von Sn eine reduzierte Phagozytoseleistung von Makrophagen gezeigt werden [139, 140].

4.3.2. Auswirkungen des adaptiven Immunsystems

Während das natürliche Immunsystem für die schnelle Reaktion auf pathogene Reize verantwortlich ist, spielt das adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle bei der hochspezifischen Immunabwehr. Unter anderen besteht diese einerseits aus CD4⁺, andererseits aus CD8⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, erkennen Antigene, die ihnen über den Major Histokompatibilitäts Komplex (MHC) Klasse 1 Moleküle präsentiert werden. CD4⁺ T-Zellen, beziehungsweise T-Helferzellen, bekommen die Antigene über MHC Klasse 2 Moleküle präsentiert. Ein weiterer Unterschied besteht in der Reaktion auf die Antigenpräsentation. So kommt es bei der Th1-Zelle, einer Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen, bei Aktivierung unter anderem zu einer Förderung phagozytotischer Maßnahmen. Im Gegensatz dazu, kommt es bei aktivierten CD8⁺ T-Zellen nach Bindung des MHC-1 Moleküls zur Initiierung einer direkten Zelllyse [141]. Diese kann einerseits durch das Ausschütten von Granula geschehen, die Perforine, Granzyme oder Granulysine enthalten oder andererseits durch Aktivierung der Apoptose über Fas-FasL Interaktion [142, 143]. Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten können unter inflammatorischen Bedingungen, wie bei Multipler Sklerose, MHC-1 Moleküle exprimieren und so ein Ziel für zytotoxische T-Zellen bieten [143–145].

Wie bereits ausführlich erwähnt, kommt es entweder von Beginn an oder im Verlauf der Multiplen Sklerose zu einer progressiven Form der Erkrankung. Hierbei zeigen sich verschiedene Formen der Schädigung. Während sich die Entzündungsreaktion in der RRMS vor allem in aktiven Läsionen der weißen und grauen Substanz abspielt, kommt es bei der PMS eher zu sich langsam ausweitenden Läsionen sowie zur Schädigung der normal erscheinenden weißen Substanz und Läsionen der grauen Substanz. Diese Arten der Schädigung sind mit der Ansammlung von T-Zellen und Mikroglia im Parenchym assoziiert [39, 52, 146], wobei die T-Zellen zu einem Großteil aus CD8+ T-Zellen bestehen [52].

In diesem Mausmodell konnte ebenfalls eine erhöhte Anzahl CD8+ T-Zellen in heterozygoten hPLPW/PlpKo und hPLPG/PlpKo Mäusen gefunden werden, außerdem war in den PlpKo Tieren ein Trend zu einer erhöhten Anzahl zu erkennen. Diese CD8+ T-Zellen traten verteilt im Parenchym des Sehnervs auf und passten hier zu dem Verlauf einer PMS. Generell konnte somit eine vermehrte Aktivität von CD8+ T-Zellen gezeigt werden, dies beweist aber nicht, dass diese auch einen Einfluss auf die Entwicklung des Phänotyps haben. Dieser Nachweis gelang allerdings Groh und Kollegen [82]. So konnte durch Verkreuzung der Mausmutanten mit Rag-1 defizienten Mäusen, also Tieren ohne reife T- und B-Lymphozyten [147], eine deutliche Verbesserung des klinischen und histopathologischen Phänotyps gelingen. Dies allein zeigt allerdings nicht an, welche Lymphozyten für die Pathogenese entscheidend sind. Dafür bräuchte es weitere Untersuchungen mit Knochenmarktransplantationen von Mäusen, denen entweder CD4+, CD8+ T-Zellen oder B-Zellen fehlen.

Ein vielversprechender Kandidat wären hier jedoch die zytotoxischen T-Zellen. So konnte in in-vitro und ex-vivo Experimenten gezeigt werden, dass CD8+ T-Zellen in der Lage sind, sowohl MHC-1 Molekül-tragende Oligodendrozyten [148] und Axone [149] direkt zu schädigen, als auch axonale Schäden bei Angriff auf umgebenden Oligodendrozyten zu provozieren [150, 151]. Außerdem konnte der schädigende Effekt CD8 positiver T-Zellen auch in anderen Mausmodellen gezeigt werden, die eine primär genetische Grunderkrankung repräsentieren. So konnte sowohl in Tieren, die PLP überexprimieren und so ein Mausmodell für

PMD darstellen [152], als auch in Ppt1 defizienten Tieren, ein Mausmodell für die infantile Neuronale Ceroid Lipofuszinose (CLN1) [153], eine pathogenetisch relevante Aktivierung CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Während PLP überexprimierende Mutanten allerdings hauptsächlich Störungen des Myelins zeigten, handelt es sich bei der neuronalen Ceroid Lipofuszinose um eine neurodegenerative lysosomale Speichererkrankung. Gemein ist beiden Modellen allerdings die Auswirkung des Immunsystems, die in beiden Fällen zu einem schlechteren Phänotyp führen. Außerdem zeigte sich hier vor allem der Einfluss CD8 positiver T-Zellen. Interessanterweise konnte in beiden Modellen eine Akkumulation von MHC-1 Molekülen auf den geschädigten Zellen, Oligodendrozyten (PLP überexprimierendes Modell) und Axonen (Ppt1 defiziente Mäuse), gezeigt werden sowie eine enge Nachbarschaft der zytotoxischen T-Zellen zu diesen.

Dieser Einfluss zytotoxischer T-Zellen wäre auch in diesem Modell denkbar, wobei zunächst interessant wäre, ob und wenn auf welchen Zellen MHC-1 Moleküle akkumulieren. So zeigt sich in den Mäusen sowohl axonaler Schaden, Untergang von Ganglienzellen sowie reduzierte Myelinisierung, also Anzeichen sowohl einer Schädigung der Neurone als auch der Oligodendrozyten, wobei in dieser Arbeit ein Angriff auf das Myelin, bzw. die ODZ wahrscheinlicher zu sein scheint. Dies zeigt sich vor allem im Vergleich der heterozygoten zu den homozygoten Tieren, da sich hier ein geringerer Anteil dünn- oder demyelinisierter Axone darstellt. Hierauf soll allerdings später noch genauer eingegangen werden.

Die Untersuchung auf CD4⁺ T-Zellen zeigte in den hPLPG/PlpKo und PlpKo keine erhöhte Anzahl im Vergleich zu den Wildtypen, wobei auch dies zu den beschriebenen Veränderungen bei PMS zutreffen könnte, da es sich bei der erhöhten Anzahl von T-Zellen hauptsächlich um CD8⁺ T-Zellen handelt. Allerdings zeigte sich im Gegensatz dazu bei den hPLPW/PlpKo eine höhere Anzahl CD4⁺ T-Zellen. Dies überrascht auf den ersten Blick, vor allem da es bei diesen Mutanten zu geringeren axonalen Schäden und Demyelinisierungen kommt. Hier wäre sicherlich eine weitere Charakterisierung interessant. So

könnte es sich bei ihnen auch um regulatorische CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T-Zellen handeln, die die Entzündungsreaktion hemmen, indem sie wie in der EAE gezeigt, die Aktivität von T-Effektorzellen hemmen [154] oder bei der Remyelinisierung helfen [155]. Im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen sind die CD4⁺ T-Zellen allerdings absolut gesehen in deutlich geringerer Anzahl vorhanden.

4.4. Schaden an Myelin und Neuron unter inflammatorischen Bedingungen

Wie kommt es nun zur Neurodegeneration unter inflammatorischen Bedingungen? Denkbar sind unterschiedliche Mechanismen. Einerseits könnte es durch die Demyelinisierung oder Schädigung des Myelins zu einer Schädigung des Neurons kommen, da es Überlegungen gibt, dass das Myelin nicht nur für die saltatorische Erregungsleitung gebraucht wird, sondern ebenso für die Versorgung der langen Axone verantwortlich ist [9, 88, 156]. Andererseits kann es auch zu einer direkten Schädigung des Neurons kommen, entweder durch das adaptive Immunsystem oder das angeborene. So konnte für zytotoxische T-Zellen eine neurotoxische Wirkung gezeigt werden, worauf bereits genauer eingegangen wurde [143, 148, 157]. Eine Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen könnte ebenfalls zu einer direkten Schädigung der Neurone führen. Hierbei könnten die Produktion von zytotoxischen Substanzen, wie Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) und ihre Wirkung auf Mitochondrien eine wichtige Rolle spielen [66, 118]. So sind Moleküle wie NADPH, die für die Produktion von ROS und NO verantwortlich sind, in Mikroglia/Makrophagen vermehrt, die sich in MS-Läsionen befinden [158]. Da Mitochondrien anfällig für oxidativen Stress sind und gleichzeitig eine wichtige Rolle in der Energieversorgung von Axonen spielen, könnte es durch eine Störung der Mitochondrienfunktion durch oxidativen Stress zu einer Schädigung von Neuronen kommen [66, 159]. Bei einer Störung dieser kommt es zu einer verminderten Energieversorgung und so möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der Ionenkanal-Funktionen. Durch diese Beeinträchtigung könnte es zu einer Akkumulation von Ca²⁺ Ionen kommen und dadurch zur Einleitung der Apoptose [66, 88, 123, 160, 161].

Auf den möglichen Schädigungsmechanismus in den Mausmutanten dieser Arbeit wird später ausführlich eingegangen.

Wie es beim Menschen zum Verlust von Myelin und axonaler Schädigung bei MS kommt ist bislang nicht abschließend geklärt, es scheint aber mehrere Möglichkeiten zu geben. So zeigten sich vier unterschiedliche histologische Typen, die entweder eine T-Zell und Mikroglia assoziierte, eine Antikörpervermittelte oder primäre Schädigung der Oligodendrozyten aufweist [40, 43]. Zusätzlich wurde in einer Studie gezeigt, dass sich in frühen Stadien der Läsionen vermehrt oxidierte DNA in ODZ nachweisen lassen, als Hinweis auf eine durch ROS/NOS vermittelte Schädigung [162]. Zusätzlich korrelierte das Ausmaß der DNA-Oxidation mit der Anzahl an Entzündungszellen, wie T-Zellen oder Mikroglia/Makrophagen [162]. So ist auch hier eine Schädigung durch Mikroglia/Makrophagen denkbar.

Schlussendlich wäre auch eine Kombination aus diesen Möglichkeiten denkbar. So führen zwar die erst genannten Mechanismen zur Schädigung des Neurons, würden allerdings verstärkt durch die Tatsache, dass die schützende, beziehungsweise versorgende Myelinhülle geschädigt wird.

4.5. Möglicher Schädigungsmechanismus

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in 18 Monate alten Mäusen durch eine Mutation in einem Myelinprotein zu einem PMS-typischen Entzündungs-Phänotypen kommen kann. Damit ist allerdings noch kein Nachweis erfolgt, dass die Entzündungsreaktion an der Pathogenese beteiligt ist. Dieser Nachweis gelang allerdings Groh und Kollegen, durch Kreuzung der Mausmutanten mit RAG-1 defizienten Mäusen [82, 131]. Somit stellen sich für dieses Mausmodell noch einige Fragen. Welche Struktur wird primär durch die Entzündungsreaktion geschädigt? Wie kommt es zu diesen Schäden und welche Rolle spielen die einzelnen Entzündungszellen. Die erste der Fragen, welche Struktur als erstes betroffen ist, kann im Vergleich zwischen heterozygoten hPLPW/PlpKo sowie hPLPG/PlpKo und PlpKo auf den Grund gegangen werden. Um diesen Vergleich durchführen zu können, ist allerdings die Erkenntnis von Groh und Kollegen notwendig, dass es sich bei den homozygoten Mutationen

hPLPW/PlpKo und hPLPG/PlpKo jeweils um Nullmutationen handelt und sie somit denselben Effekt haben [82]. Der Vergleich zwischen den homozygoten und heterozygoten Mosaik-Tieren legt nun die Vermutung nahe, dass zunächst die ODZ betroffen sind, da es trotz gleicher Anzahl der Entzündungszellen nicht zu demselben Ausmaß an Schaden kommt. Dieser Unterschied kann sich daraus erklären, dass zunächst nur die ODZ geschädigt werden, die das mutierte Gen tragen und nicht die gesunden ODZ, beziehungsweise das gesunde Neuron. Erst im Folgenden kommt es zu einer Schädigung des Axons und Neurons. Wie es zu einer gezielten Schädigung der mutierten ODZ kommt ist unklar. Allerdings konnte im peripheren Nervensystem in einem Connexin 32 heterozygot defizienten (Cx32+/-) X-chromosomalen Mausmodell tatsächlich gezeigt werden, dass es zu einer gezielten Schädigung mutierter Myelin-bildender Zellen kommen kann. So sammeln sich Makrophagen gezielt um die Schwann'schen Zellen, denen Cx32 fehlte. Interessanterweise konnte hier auch ein direkt schädigender Einfluss dieser Makrophagen auf das Myelin nachgewiesen werden. Diskutiert werden könnte hier eine Anziehung der Makrophagen durch von mutierten Schwann'schen Zellen gebildete Moleküle [163]. Für das adaptive Immunsystem wurde bereits die Möglichkeit einer Aktivierung über MHC-I Moleküle angesprochen. Diese könnten sich auf den betroffenen ODZ befinden und so eine gezielte Schädigung herbeiführen.

Der Mechanismus, wie es zur Schädigung der Neurone und Axone kommt ist zwar nicht geklärt, allerdings zeigt sich in dieser Arbeit, dass die Anzahl betroffener ODZ wohl einen Einfluss darauf hat. Auch hier ist der Vergleich zwischen heterozygoten und homozygoten Mäusen notwendig. Unter der Prämisse, dass es im Rahmen der zufälligen X-Inaktivierung zu einer ähnlichen Verteilung des hPLPW in den ODZ kommt, die bereits in PlpKo Mäusen beobachtet werden konnte, kann man je nach Studie von ungefähr 57-65% nicht mutiertes Plp tragender ODZ und 35-43% hPLPW/PlpKo tragender ODZ ausgehen [85]. So kommt es, im Rahmen der zufälligen X-Inaktivierung, zu ODZ, die das mutierte Gen tragen. Da ein ODZ mehrere Axone myelinisiert, liegt die Vermutung nahe, dass die meisten Axone nur zu einem Teil durch mutierte ODZ myelinisiert werden. Dadurch stellt sich allerdings die Frage, warum es nicht zu

einer ähnlichen Schädigung der Neurone kommt, wenn im Endeffekt sowohl bei hetero- als auch bei homozygoten Tieren die meisten Axone mutierte ODZ tragen. Dies lässt sich beispielweise so erklären, dass es nicht durch einzeln betroffene ODZ zu einer Schädigung kommt, sondern erst sobald eine gewisse Anzahl an ODZ geschädigt sind und somit ein Grenzwert überschritten wird. Damit ist allerdings auch noch nicht klar, ob es durch die Schädigung des ODZ oder die Demyelinisierung der Axone zur Neurodegeneration kommt. Allerdings konnte in dem bereits angesprochenen PLP-überexprimierenden Modell gezeigt werden, dass es zu einer stärkeren Demyelinisierung kommt, während der neuronale Schaden deutlich geringer ausgeprägt ist. Daraus könnte man eher schließen, dass es nicht durch die Demyelinisierung, sondern durch den geschädigten ODZ zu neuronalem Schaden kommt. Gegen die Hypothese, dass es durch Demyelinisierung zur Neurodegeneration kommt, spricht ebenfalls, dass die beobachteten Sphäroide hauptsächlich in myelinisierten Axonen zu beobachten sind. [152, 164].

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit und den aufgezeigten Schädigungsmechanismen, könnte es wie folgt zu der gezeigten diffusen Neurodegeneration und Demyelinisierung sowie einer PMS typischen Klinik in Anwesenheit von Entzündungszellen kommen. (Abbildung 13)

Durch die Mutation könnte es zu einer gestörten Integrität der Myelinscheide und Stressreaktionen in den Oligodendrozyten kommen. Beispielweise durch eine dadurch bedingte Chemokinexpression könnte es zu einer Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen führen, die in einen proinflammatorischen Zustand übergehen und daraufhin Sn exprimieren. Dadurch könnten einerseits direkt schädigende Zytokine ausgeschüttet werden, andererseits zytotoxische CD8+ T-Zellen, zum Beispiel durch proinflammatorische Zytokine oder Antigenpräsentation, aktiviert werden. Dies kann über zwei Wege geschehen, einerseits über die Sn-vermittelte Hemmung der regulatorischen CD8+ CD122+ T-Zellen und andererseits über direkte Aktivierung der T-Zellen. Diese so aktivierten CD8+ T-Zellen könnten nun die Oligodendrozyten schädigen, was wiederum zu vermehrter Aktivierung der Mikroglia/Makrophagen führen würde.

Eine gezielte Schädigung der ODZ könnte durch Hochregulierung von MHC-I erfolgen. Somit ergäbe sich ein Teufelskreis, der zu einer fortdauernden Aktivierung CD8+ T-Zellen und Mikroglia/Makrophagen führt. Der neuronale Schaden könnte einerseits Folge der Schädigung ihrer Myelinscheide, andererseits Folge des proinflammatorischen Milieus um die ODZ sein. Hierbei ist die Betrachtung der heterozygoten Mausmutanten von großem Interesse. Bei diesen kommt es zu einer ähnlichen Aktivierung der Entzündungszellen, aber nicht zur selben Ausbildung an Schaden von Myelin und Neuron. Dies verwundert insofern, da ein ODZ mehrere Neurone umfasst und somit die Myelinscheide der meisten Neurone durch die zufällige X-Inaktivierung auch einen Teil erkrankter ODZ trägt. Geht man nun davon aus, dass es aber durch eine direkte Einwirkung des Immunsystems am Neuron zu Schäden kommt, müsste durch die gleiche Anzahl an Entzündungszellen auch ein ähnlicher Schaden in allen Mutanten entstehen. Dies ist hier aber nicht der Fall. So kann man eher vermuten, dass sich die Schädigung durch das Immunsystem zu einem Großteil zunächst gegen die ODZ richtet und es erst bei der Überschreitung einer kritischen Schwelle geschädigter ODZ zu einem wahrnehmbaren neuronalen Schaden kommt. Wie es zu neuronalem Schaden durch den Angriff auf die Myelinscheide kommt, ist unklar. Es ist allerdings denkbar, dass der neuronale Schaden eher durch die Immunattacke gegen das Myelin und darauffolgenden Veränderungen und weniger durch die Abwesenheit von Myelin entsteht. Somit kommt es bei zunehmendem Schaden der ODZ zu einem Untergang der Neurone.

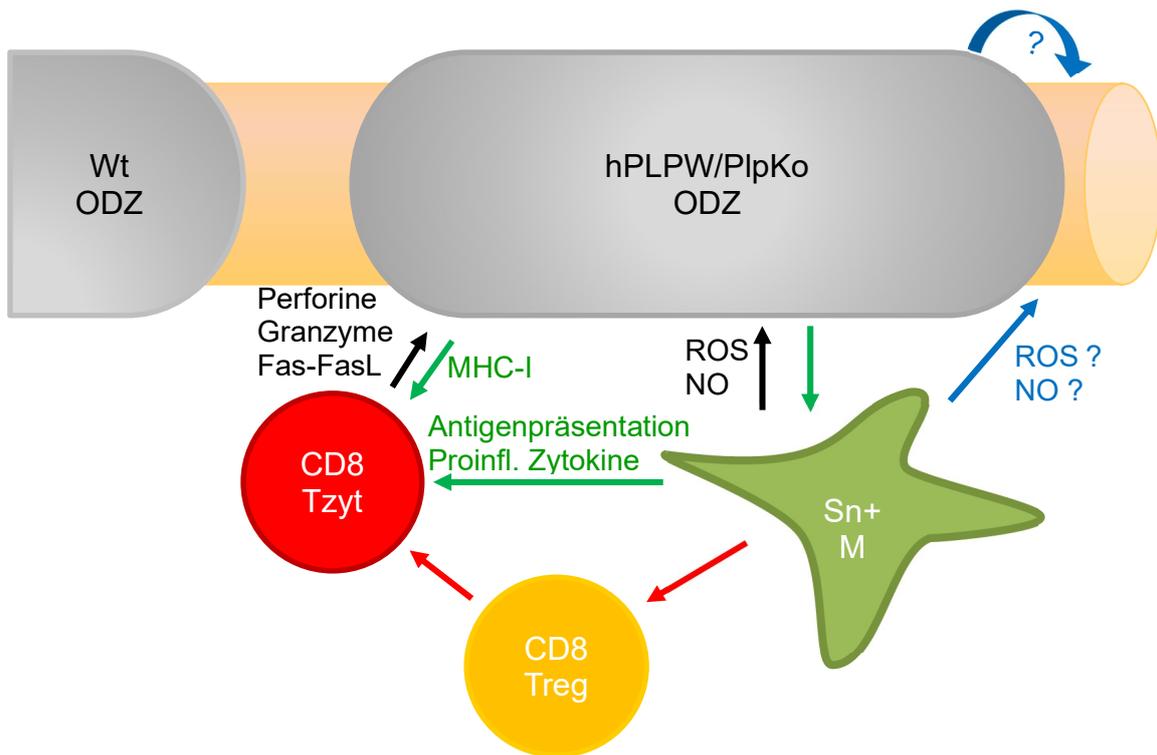


Abbildung 13: Möglicher Schädigungsmechanismus in diesem Mausmodell. Durch die Mutation in ODZs kommt es durch ungeklärte Signale, zum Beispiel Chemokinexpression, zu einer Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen (Sn+ M, grüner Pfeil). Dadurch werden zytotoxische T-Zellen (CD8 Tzyt) aktiviert (grüner Pfeil) und regulatorische T-Zellen (z.B. CD8 Treg, [134]), die zytotoxische T-Zellen hemmen würden (roter Pfeil), Sn-vermittelt herabreguliert (roter Pfeil) sowie diejenigen Oligodendrozyten (ODZ), die eine Mutation tragen, durch Sekretion zytotoxischer Substanzen, wie ROS und NO direkt geschädigt (schwarzer Pfeil). Durch die Aktivierung der CD8 positiven T-Zellen via Antigenpräsentation oder Sezernieren proinflammatorischer Zytokine kommt es möglicherweise durch Perforine, Granzyme oder den Fas-Liganden zur Schädigung des ODZ (schwarze Pfeile), möglicherweise gezielt durch Hochregulierung von MHC-I (grüner Pfeil). Eine Schädigung der Neurone könnte einerseits durch die Schädigung der ODZ oder direkt über Immunzellen vermittelt werden (blaue Pfeile). Durch die Schädigung kommt es zu einer weiteren Aktivierung der Immunzellen und so zur Aufrechterhaltung eines Teufelskreises.

5. Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, die zu motorischen, sensiblen und vegetativen Einschränkungen führt. Häufig beginnt die Erkrankung mit einem schubförmigen Verlauf, dem eine progrediente Verschlechterung folgt. Trotzdem leiden ca. 15% der Patienten bereits von Beginn an, an einer primär progressiven Variante der MS, die bereits mit der progredienten Phase beginnt. Bis jetzt ist die Pathophysiologie nicht vollständig verstanden. Lange Zeit dachte man, dass MS primär eine reine Autoimmun-Erkrankung darstellt, aber in den letzten Jahren ergab sich die Frage, ob es vor allem in den progressiven Formen, eine zytodegenerative Komponente gibt, auf die eine sekundäre Inflammation folgt. Eine mögliche Ursache stellen hier Mutationen des *PLP 1* Gens dar, die normalerweise mit leukodystrophischen Erkrankungen assoziiert sind. Es gab zwei Fallberichte, in denen von Patienten berichtet wurde, die unterschiedliche Mutationen in diesem Gen hatten und den klinischen Phänotyp einer MS zeigten. Diese Arbeit sollte nun die Auswirkungen der Mutationen, beziehungsweise einer Nullmutation des *PLP 1* Gens in 18- und zum Teil 12-Monate alten Mausmutanten untersuchen. Hier konnten Myelin-Veränderungen und axonaler Schaden in immunhistochemischen Untersuchungen sowie mittels Elektronenmikroskopie und optischer Kohärenztomographie gezeigt werden. Weiter konnte eine Neuroinflammation und damit einhergehend eine zunehmende Anzahl CD8+ T-Zellen sowie einer erhöhten Anzahl an Mikroglia/Makrophagen gefunden werden. Dies ging mit vergleichsweise reduzierten Leistungen der Mutanten bei der motorischen Rotarod-Analyse einher. Interessanterweise wurde weniger neuraler Schaden in den heterozygoten Varianten gefunden, obwohl das Ausmaß der Entzündung gleich blieb. Dies könnte für eine zielgerichtete immunvermittelte Schädigung der Oligodendrozyten sprechen, die zu neuronalem Schaden führt. So konnte gezeigt werden, dass es durch Punktmutationen in einem Myelinprotein-codierendem Gen zu einer sekundären Entzündung kommen kann, die mit dem klinischen Phänotyp einer progressiven MS einhergeht. Weiter sind diese Mausmodelle ein Beispiel für eine genetische Erkrankung des ZNS, in denen die

Klinik maßgeblich durch die begleitende Inflammation und nicht allein durch den genetischen Schaden verursacht wird.

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common neurological diseases, leading to motor, sensory and vegetative impairment. Frequently, the disease begins as a relapsing remitting form, which is followed by a progressive stage. Nevertheless about 15% of the patients suffer under a primary progressive multiple sclerosis, which starts with the progressive stage. Until now the pathophysiology is not completely understood. For a long time, multiple sclerosis was thought to be an autoimmune disease, but in the last years the question arose if the underlying cause, especially in the progressive forms (PMS), could be a cytodegenerative component, followed by secondary inflammation. A possible candidate here could be point mutations in the *PLP 1* gene, which are usually associated with leukodystrophic disorders. There were two case reports about patients carrying distinct point mutations in this gene, leading to the clinical phenotype of multiple sclerosis. This thesis examines 18- and in part 12-month-old mice, carrying these point mutations or having a *Plp 1* null mutation. Here myelin alterations and axonal damage in immunohistochemical stainings could be shown, as well as in the optical coherence tomography and electron microscopy. Furthermore, the occurrence of neuroinflammation comprising recruitment of microglia/macrophages and CD8 positive T-cells could be demonstrated. Also, typical clinical symptoms in the Rotarod test were found. Interestingly, there was less neural damage found in heterozygous females than in homozygous mutant mice, while the extent of inflammation was the same. This could indicate a targeted immune-mediated injury of oligodendrocytes leading to neuronal damage. In summary, this thesis shows that a point mutation of a gene coding for a myelin protein of oligodendrocytes can lead to secondary neuroinflammation and a neurological phenotype comparable to PMS. In addition, the generated mouse models are an example for genetic diseases of the CNS, in which the clinical outcome could be driven by inflammation and not only by the primary gene mutation.

6. Literaturverzeichnis

1. Trepel M (2012) Neuroanatomie. Struktur und Funktion ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch], 5. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München
2. Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen, 3. Aufl. Thieme, Stuttgart
3. Chung W-S, Allen NJ, Eroglu C (2015) Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(9):a020370. doi:10.1101/cshperspect.a020370
4. Vasile F, Dossi E, Rouach N (2017) Human astrocytes. Structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct* 222(5):2017–2029. doi:10.1007/s00429-017-1383-5
5. Sofroniew MV (2015) Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci* 16(5):249–263. doi:10.1038/nrn3898
6. Li Q, Barres BA (2018) Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 18(4):225. doi:10.1038/nri.2017.125
7. Prinz M, Jung S, Priller J (2019) Microglia Biology. One Century of Evolving Concepts. *Cell* 179(2):292–311. doi:10.1016/j.cell.2019.08.053
8. Simons M, Nave K-A (2015) Oligodendrocytes. Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(1):a020479. doi:10.1101/cshperspect.a020479
9. Nave K-A (2010) Myelination and the trophic support of long axons. *Nature Reviews Neuroscience* 11(4):275–283. doi:10.1038/nrn2797
10. Nave K-A, Werner HB (2014) Myelination of the nervous system. Mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:503–533. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101
11. Dupouey P, Jacque C, Bourre JM, Cesselin F, Privat A, Baumann N (1979) Immunochemical studies of myelin basic protein in shiverer mouse devoid of major dense line of myelin. *Neuroscience Letters* 12(1):113–118. doi:10.1016/0304-3940(79)91490-3

12. Privat A, Jacque C, Bourre JM, Dupouey P, Baumann N (1979) Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse 'shiverer'. *Neuroscience Letters* 12(1):107–112. doi:10.1016/0304-3940(79)91489-7
13. Siegel GJ (Hrsg) (2006) *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*, 7. Aufl. Elsevier, Amsterdam, Boston
14. Andreas G. Tzakos, Petri Kursula, Anastassios Troganis, Vassiliki Theodorou, Theodore Tselios, Christos Svarnas, John Matsoukas, Vasso Apostolopoulos and Ioannis P. Gerothanassis (2005) Structure and Function of the Myelin Proteins. Current Status and Perspectives in Relation to Multiple Sclerosis. *Current Medicinal Chemistry* 12(13):1569–1587
15. Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave K-A (1997) Assembly of CNS Myelin in the Absence of Proteolipid Protein. *Neuron* 18(1):59–70. doi:10.1016/S0896-6273(01)80046-5
16. Griffiths I (1998) Axonal Swellings and Degeneration in Mice Lacking the Major Proteolipid of Myelin. *Science* 280(5369):1610–1613. doi:10.1126/science.280.5369.1610
17. Podbielska M, Hogan EL (2009) Molecular and immunogenic features of myelin lipids. Incitants or modulators of multiple sclerosis? *Mult Scler* 15(9):1011–1029. doi:10.1177/1352458509106708
18. (2017) Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol* 16(11):877–897. doi:10.1016/S1474-4422(17)30299-5
19. Höer A, Schiffhorst G, Zimmermann A, Fischaleck J, Gehrmann L, Ahrens H, Carl G, Sigel K-O, Osowski U, Klein M, Bleß H-H (2014) Multiple sclerosis in Germany. Data analysis of administrative prevalence and healthcare delivery in the statutory health system. *BMC Health Serv Res* 14:381. doi:10.1186/1472-6963-14-381
20. Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Zettl UK, Rieckmann P (2008) Multiple sclerosis registry in

- Germany. Results of the extension phase 2005/2006. *Dtsch Arztebl Int* 105(7):113–119. doi:10.3238/arztebl.2008.0113
21. Kornek B, Lassmann H (1999) Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note. *Brain Pathol* 9(4):651–656
 22. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L (1998) Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 338(5):278–285. doi:10.1056/NEJM199801293380502
 23. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA (2018) Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 378(2):169–180. doi:10.1056/NEJMra1401483
 24. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000) Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 343(20):1430–1438. doi:10.1056/NEJM200011163432001
 25. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA et al (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis. The 2013 revisions. *Neurology* 83(3):278–286. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
 26. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis. 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69(2):292–302. doi:10.1002/ana.22366
 27. Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF (2015) Multiple sclerosis—a quiet revolution. *Nature Reviews Neurology* 11(3):134. doi:10.1038/nrneurol.2015.14
 28. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D (2012) Progressive multiple sclerosis. Pathology and pathogenesis. *Nature Reviews Neurology* 8(11):647. doi:10.1038/nrneurol.2012.168
 29. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15(9):545–558. doi:10.1038/nri3871

30. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH (2017) Diagnosis of multiple sclerosis. Progress and challenges. *Lancet* 389(10076):1336–1346. doi:10.1016/S0140-6736(16)30959-X
31. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372(9648):1502–1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7
32. Harrison DM (2014) Multiple Sclerosis. *Ann Intern Med* 160(7):ITC4-1-1. doi:10.7326/0003-4819-160-7-201404010-01004
33. Marrie RA, Reingold S, Cohen J, Stuve O, Trojano M, Sorensen PS, Cutter G, Reider N (2015) The incidence and prevalence of psychiatric disorders in multiple sclerosis. A systematic review. *Mult Scler* 21(3):305–317. doi:10.1177/1352458514564487
34. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA (2017) Diagnosis of multiple sclerosis. 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
35. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, Seze J de, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, Lublin F, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Sauter A, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Garren H, Mairon N, Chin P, Wolinsky JS (2016) Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 376(3):209–220. doi:10.1056/NEJMoa1606468
36. Vercellino M, Masera S, Lorenzatti M, Condello C, Merola A, Mattioda A, Tribolo A, Capello E, Mancardi GL, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P (2009) Demyelination, Inflammation, and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis Deep Gray Matter. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(5):489–502. doi:10.1097/NEN.0b013e3181a19a5a

37. Lassmann H (2014) Multiple sclerosis. Lessons from molecular neuropathology. *Experimental Neurology* 262 Pt A:2–7. doi:10.1016/j.expneurol.2013.12.003
38. Calabrese M, Magliozzi R, Ciccarelli O, Geurts JJG, Reynolds R, Martin R (2015) Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience* 16(3):147–158. doi:10.1038/nrn3900
39. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128(Pt 11):2705–2712. doi:10.1093/brain/awh641
40. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions. Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47(6):707–717
41. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007) The immunopathology of multiple sclerosis. An overview. *Brain Pathol* 17(2):210–218. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x
42. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H (2017) An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathologica* 133(1):13–24. doi:10.1007/s00401-016-1653-y
43. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis. Implications for diagnosis and therapy. *Trends in Molecular Medicine* 7(3):115–121. doi:10.1016/S1471-4914(00)01909-2
44. Popescu BFG, Lucchinetti CF (2012) Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol* 7:185–217. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132443
45. Holley JE, Gveric D, Newcombe J, Cuzner ML, Gutowski NJ (2003) Astrocyte characterization in the multiple sclerosis glial scar. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29(5):434–444. doi:10.1046/j.1365-2990.2003.00491.x
46. Correale J, Farez MF (2015) The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Front. Neurol.* 6:180. doi:10.3389/fneur.2015.00180
47. Williams A, Piaton G, Lubetzki C (2007) Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis? *Glia* 55(13):1300–1312. doi:10.1002/glia.20546

48. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES (1993) Multiple sclerosis. Remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33(2):137–151. doi:10.1002/ana.410330203
49. Prineas JW, Connell F (1979) Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5(1):22–31. doi:10.1002/ana.410050105
50. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129(Pt 12):3165–3172. doi:10.1093/brain/awl217
51. Podbielska M, Banik NL, Kurowska E, Hogan EL (2013) Myelin recovery in multiple sclerosis. The challenge of remyelination. *Brain Sciences* 3(3):1282–1324. doi:10.3390/brainsci3031282
52. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009) The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132(Pt 5):1175–1189. doi:10.1093/brain/awp070
53. Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis. Pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*. 55(4):458–468. doi:10.1002/ana.20016
54. Antel J, Antel S, Caramanos Z, Arnold DL, Kuhlmann T (2012) Primary progressive multiple sclerosis. Part of the MS disease spectrum or separate disease entity? *Acta Neuropathologica* 123(5):627–638. doi:10.1007/s00401-012-0953-0
55. Bradl M, Lassmann H (2009) Progressive multiple sclerosis. *Seminars in Immunopathology* 31(4):455–465. doi:10.1007/s00281-009-0182-3
56. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJG (2012) Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nature Reviews Neuroscience* 13(7):507. doi:10.1038/nrn3275
57. Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001) Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50(3):389–400. doi:10.1002/ana.1123

58. Kawachi I, Lassmann H (2017) Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88(2):137–145. doi:10.1136/jnnp-2016-313300
59. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3):393–399
60. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123(6):1174–1183. doi:10.1093/brain/123.6.1174
61. Bjartmar C, Kidd G, Mrk S, Rudick R, Trapp BD (2000) Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 48(6):893–901. doi:10.1002/1531-8249(200012)48:6<893::AID-ANA10>3.0.CO;2-B
62. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM (2006) The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain* 129(Pt 6):1507–1516. doi:10.1093/brain/awl074
63. Herrero R, Garcia-Martin E, Almarcegui C, Ara JR, Rodriguez-Mena D, Martin J, Otin S, Satue M, Pablo LE, Fernandez FJ (2012) Progressive degeneration of the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(13):8344–8349. doi:10.1167/iovs.12-10362
64. Miller DH, Leary SM (2007) Primary-progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 6(10):903–912. doi:10.1016/S1474-4422(07)70243-0
65. Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO, McDonald WI (1994) A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 117(4):759–765. doi:10.1093/brain/117.4.759
66. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H (2015) Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 14(2):183–193. doi:10.1016/S1474-4422(14)70256-X
67. Rodriguez M, Scheithauer B (1994) Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 18(1-2):3–13

68. Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW (2009) Multiple sclerosis. Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 66(6):739–753. doi:10.1002/ana.21800
69. JOFFE S, RAPPORT MM, GRAF L (1963) Identification of an organ specific lipid hapten in brain. *Nature* 197:60–62
70. Sobel RA, Greer JM, Kuchroo VK (1994) Minireview. Autoimmune responses to myelin proteolipid protein. *Neurochem Res* 19(8):915–921
71. Vercellino M, Plano F, Votta B, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P (2005) Grey Matter Pathology in Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(12):1101–1107. doi:10.1097/01.jnen.0000190067.20935.42
72. Seewann A, Vrenken H, van der Valk P, Blezer ELA, Knol DL, Castelijns JA, Polman CH, Pouwels PJW, Barkhof F, Geurts JGG (2009) Diffusely Abnormal White Matter in Chronic Multiple Sclerosis. Imaging and Histopathologic Analysis. *Arch Neurol* 66(5):601–609. doi:10.1001/archneurol.2009.57
73. Abdelhak A, Weber MS, Tumani H (2017) Primary Progressive Multiple Sclerosis. Putting Together the Puzzle. *Front. Neurol.* 8:234. doi:10.3389/fneur.2017.00234
74. Nandoskar A, Raffel J, Scalfari AS, Friede T, Nicholas RS (2017) Pharmacological Approaches to the Management of Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Drugs* 77(8):885–910. doi:10.1007/s40265-017-0726-0
75. Fox RJ, Coffey CS, Conwit R et al (2018) Phase 2 Trial of Ibudilast in Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 379(9):846–855. doi:10.1056/NEJMoa1803583
76. Ciotti JR, Cross AH (2018) Disease-Modifying Treatment in Progressive Multiple Sclerosis. *Current Treatment Options in Neurology* 20(5):12. doi:10.1007/s11940-018-0496-3
77. Warshawsky I, Rudick RA, Staugaitis SM, Natowicz MR (2005) Primary progressive multiple sclerosis as a phenotype of a PLP1 gene mutation. *Ann Neurol* 58(3):470–473. doi:10.1002/ana.20601

78. Gorman MP, Golomb MR, Walsh LE, Hobson GM, Garbern JY, Kinkel RP, Darras BT, Urion DK, Eksioglu YZ (2007) Steroid-responsive neurologic relapses in a child with a proteolipid protein-1 mutation. *Neurology* 68(16):1305–1307. doi:10.1212/01.wnl.0000259522.49388.53
79. Cloake NC, Yan J, Aminian A, Pender MP, Greer JM (2018) PLP1 Mutations in Patients with Multiple Sclerosis. Identification of a New Mutation and Potential Pathogenicity of the Mutations. *Journal of Clinical Medicine* 7(10):342. doi:10.3390/jcm7100342
80. Inoue K (2005) PLP1-related inherited dysmyelinating disorders. Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6(1):1–16. doi:10.1007/s10048-004-0207-y
81. Torii T, Miyamoto Y, Yamauchi J, Tanoue A (2014) Pelizaeus–Merzbacher disease. Cellular pathogenesis and pharmacologic therapy. *Pediatrics International* 56(5):659–666. doi:10.1111/ped.12450
82. Groh J, Friedman HC, Orel N, Ip CW, Fischer S, Spahn I, Schäffner E, Hörner M, Stadler D, Buttmann M, Varallyay C, Solymosi L, Sendtner M, Peterson AC, Martini R (2016) Pathogenic inflammation in the CNS of mice carrying human PLP1 mutations. *Hum Mol Genet* 25(21):4686–4702. doi:10.1093/hmg/ddw296
83. Tuason MC, Rastikerdar A, Kuhlmann T, Goujet-Zalc C, Zalc B, Dib S, Friedman H, Peterson A (2008) Separate proteolipid protein/DM20 enhancers serve different lineages and stages of development. *J Neurosci* 28(27):6895–6903. doi:10.1523/JNEUROSCI.4579-07.2008
84. Tan S-S, Williams EA, Tam PPL (1993) X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo. *Nature Genetics* 3(2):170. doi:10.1038/ng0293-170
85. Yool DA, Klugmann M, McLaughlin M, Vouyiouklis DA, Dimou L, Barrie JA, McCulloch MC, Nave K-A, Griffiths IR (2001) Myelin proteolipid proteins promote the interaction of oligodendrocytes and axons. *Journal of Neuroscience Research* 63(2):151–164. doi:10.1002/1097-4547(20010115)63:2<151::AID-JNR1007>3.0.CO;2-Y

86. Groh J, Stadler D, Buttmann M, Martini R (2014) Non-invasive assessment of retinal alterations in mouse models of infantile and juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis by spectral domain optical coherence tomography. *Acta Neuropathologica Communications* 2(1):54. doi:10.1186/2051-5960-2-54
87. Das Sarma J, Kenyon LC, Hingley ST, Shindler KS (2009) Mechanisms of primary axonal damage in a viral model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 29(33):10272–10280. doi:10.1523/JNEUROSCI.1975-09.2009
88. Nave K-A (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468(7321):244–252. doi:10.1038/nature09614
89. Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen IV, Lyness R (2010) Ocular pathology in multiple sclerosis. Retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain* 133(Pt 6):1591–1601. doi:10.1093/brain/awq080
90. Petzold A, Balcer LJ, Calabresi PA, Costello F, Frohman TC, Frohman EM, Martinez-Lapiscina EH, Green AJ, Kardon R, Outteryck O, Paul F, Schippling S, Vermersch P, Villoslada P, Balk LJ (2017) Retinal layer segmentation in multiple sclerosis. A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 16(10):797–812. doi:10.1016/S1474-4422(17)30278-8
91. Austyn JM, Gordon S (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European Journal of Immunology* 11(10):805–815. doi:10.1002/eji.1830111013
92. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39(1):151–170
93. Lin H-H, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, Kerley M, Mucenski ML, Gordon S, Stein-Streilein J (2005) The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med* 201(10):1615–1625. doi:10.1084/jem.20042307

94. Constantinescu CS, Gran B (2014) The essential role of T cells in multiple sclerosis. A reappraisal. *Biomed J* 37(2):34–40. doi:10.4103/2319-4170.128746
95. Jones AP, Kermode AG, Lucas RM, Carroll WM, Nolan D, Hart PH (2017) Circulating immune cells in multiple sclerosis. *Clinical & Experimental Immunology* 187(2):193–203. doi:10.1111/cei.12878
96. van den Berg R, Laman JD, van Meurs M, Hintzen RQ, Hoogenraad CC (2016) Rotarod motor performance and advanced spinal cord lesion image analysis refine assessment of neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Methods* 262:66–76. doi:10.1016/j.jneumeth.2016.01.013
97. Terashima M, Kaneda H, Suzuki T (2012) The role of optical coherence tomography in coronary intervention. *Korean J Intern Med* 27(1):1–12. doi:10.3904/kjim.2012.27.1.1
98. Ibne Mokbul M (2017) Optical Coherence Tomography. Basic Concepts and Applications in Neuroscience Research. *J Med Eng* 2017:3409327. doi:10.1155/2017/3409327
99. Ryan SJ (Hrsg) (2013) *Retina*, 5. Aufl. Saunders, S.I.
100. Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC (1994) Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J Neurobiol* 25(4):431–438. doi:10.1002/neu.480250408
101. Meyer R, Weissert R, Diem R, Storch MK, Graaf KLd, Kramer B, Bähr M (2001) Acute Neuronal Apoptosis in a Rat Model of Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.* 21(16):6214–6220
102. Hobom M, Storch MK, Weissert R, Maier K, Radhakrishnan A, Kramer B, Bähr M, Diem R (2004) Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Pathol* 14(2):148–157
103. Khanifar AA, Parlitsis GJ, Ehrlich JR, Aaker GD, D'Amico DJ, Gauthier SA, Kiss S (2010) Retinal nerve fiber layer evaluation in multiple sclerosis with spectral domain optical coherence tomography. *Clin Ophthalmol* 4:1007–1013

104. Abalo-Lojo JM, Treus A, Arias M, Gómez-Ulla F, Gonzalez F (2017) Longitudinal study of retinal nerve fiber layer thickness changes in a multiple sclerosis patients cohort. A long term 5 year follow-up. *Mult Scler Relat Disord* 19:124–128. doi:10.1016/j.msard.2017.11.017
105. Zaveri MS, Conger A, Salter A, Frohman TC, Galetta SL, Markowitz CE, Jacobs DA, Cutter GR, Ying G-S, Maguire MG, Calabresi PA, Balcer LJ, Frohman EM (2008) Retinal imaging by laser polarimetry and optical coherence tomography evidence of axonal degeneration in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 65(7):924–928. doi:10.1001/archneur.65.7.924
106. Feng L, Shen J, Jin X, Li J, Li Y (2013) The evaluation of the retinal nerve fiber layer in multiple sclerosis with special-domain optical coherence tomography. *Ophthalmologica* 230(3):116–120. doi:10.1159/000351862
107. Henderson APD, Trip SA, Schlottmann PG, Altmann DR, Garway-Heath DF, Plant GT, Miller DH (2008) An investigation of the retinal nerve fibre layer in progressive multiple sclerosis using optical coherence tomography. *Brain* 131(Pt 1):277–287. doi:10.1093/brain/awm285
108. Trip SA, Schlottmann PG, Jones SJ, Altmann DR, Garway-Heath DF, Thompson AJ, Plant GT, Miller DH (2005) Retinal nerve fiber layer axonal loss and visual dysfunction in optic neuritis. *Ann Neurol* 58(3):383–391. doi:10.1002/ana.20575
109. Saidha S, Syc SB, Durbin MK, Eckstein C, Oakley JD, Meyer SA, Conger A, Frohman TC, Newsome S, Ratchford JN, Frohman EM, Calabresi PA (2011) Visual dysfunction in multiple sclerosis correlates better with optical coherence tomography derived estimates of macular ganglion cell layer thickness than peripapillary retinal nerve fiber layer thickness. *Mult Scler* 17(12):1449–1463. doi:10.1177/1352458511418630
110. Birkeldh U, Manouchehrinia A, Hietala MA, Hillert J, Olsson T, Piehl F, Kockum IS, Brundin L, Zahavi O, Wahlberg-Ramsay M, Brautaset R, Nilsson M (2017) The Temporal Retinal Nerve Fiber Layer Thickness Is the Most Important Optical Coherence Tomography Estimate in Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 8:675. doi:10.3389/fneur.2017.00675

111. Britze J, Pihl-Jensen G, Frederiksen JL (2017) Retinal ganglion cell analysis in multiple sclerosis and optic neuritis. A systematic review and meta-analysis. *J Neurol* 264(9):1837–1853. doi:10.1007/s00415-017-8531-y
112. Ratchford JN, Saidha S, Sotirchos ES, Oh JA, Seigo MA, Eckstein C, Durbin MK, Oakley JD, Meyer SA, Conger A, Frohman TC, Newsome SD, Balcer LJ, Frohman EM, Calabresi PA (2013) Active MS is associated with accelerated retinal ganglion cell/inner plexiform layer thinning. *Neurology* 80(1):47–54. doi:10.1212/WNL.0b013e31827b1a1c
113. Petzold A, Boer JF de, Schippling S, Vermersch P, Kardon R, Green A, Calabresi PA, Polman C (2010) Optical coherence tomography in multiple sclerosis. A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 9(9):921–932. doi:10.1016/S1474-4422(10)70168-X
114. Sergott RC (2005) Optical coherence tomography. Measuring in-vivo axonal survival and neuroprotection in multiple sclerosis and optic neuritis. *Curr Opin Ophthalmol* 16(6):346–350
115. Pulicken M, Gordon-Lipkin E, Balcer LJ, Frohman E, Cutter G, Calabresi PA (2007) Optical coherence tomography and disease subtype in multiple sclerosis. *Neurology* 69(22):2085–2092. doi:10.1212/01.wnl.0000294876.49861.dc
116. Rodriguez M, Scheithauer B (1994) Ultrastructure of Multiple Sclerosis. *Ultrastruct Pathol* 18(1-2):3–13. doi:10.3109/01913129409016267
117. Beirowski B, Nógrádi A, Babetto E, Garcia-Alias G, Coleman MP (2010) Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(5):455–472. doi:10.1097/NEN.0b013e3181da84db
118. Benarroch EE (2013) Microglia. Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* 81(12):1079–1088. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a4a577
119. Heneka MT, Kummer MP, Latz E (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology* 14(7):463. doi:10.1038/nri3705

120. O'Loughlin E, Madore C, Lassmann H, Butovsky O (2018) Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(2):a028993. doi:10.1101/cshperspect.a028993
121. Chastain EML, Duncan D'AS, Rodgers JM, Miller SD (2011) The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1812(2):265–274. doi:10.1016/j.bbadis.2010.07.008
122. Peferoen L, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S (2014) Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology* 141(3):302–313. doi:10.1111/imm.12163
123. Friese MA, Schattling B, Fugger L (2014) Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* 10(4):225–238. doi:10.1038/nrneurol.2014.37
124. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung W-S, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541(7638):481. doi:10.1038/nature21029
125. Bogie JFJ, Stinissen P, Hendriks JJA (2014) Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica* 128(2):191–213. doi:10.1007/s00401-014-1310-2
126. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L (1998) Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 338(5):278–285. doi:10.1056/NEJM199801293380502
127. Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, Hoffman B, Morgan BP (2001) Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 50(5):646–657
128. Boven LA, van Meurs M, van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD (2006) Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain* 129(2):517–526. doi:10.1093/brain/awh707

129. Huizinga R, van der Star, Baukje J., Kipp M, Jong R, Gerritsen W, Clarner T, Puentes F, Dijkstra CD, van der Valk P, Amor S (2012) Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis. *Glia* 60(3):422–431. doi:10.1002/glia.22276
130. Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL (2012) The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev* 248(1):170–187. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01135.x
131. Groh J, Klein D, Berve K, West BL, Martini R (2019) Targeting microglia attenuates neuroinflammation-related neural damage in mice carrying human PLP1 mutations. *Glia* 67(2):277–290. doi:10.1002/glia.23539
132. O'Neill ASG, van den Berg TK, Mullen GED (2013) Sialoadhesin - a macrophage-restricted marker of immunoregulation and inflammation. *Immunology* 138(3):198–207. doi:10.1111/imm.12042
133. Ip CW, Kroner A, Crocker PR, Nave KA, Martini R (2007) Sialoadhesin deficiency ameliorates myelin degeneration and axonopathic changes in the CNS of PLP overexpressing mice. *Neurobiol Dis* 25(1):105–111. doi:10.1016/j.nbd.2006.08.023
134. Groh J, Ribechini E, Stadler D, Schilling T, Lutz MB, Martini R (2016) Sialoadhesin promotes neuroinflammation-related disease progression in two mouse models of CLN disease. *Glia* 64(5):792–809. doi:10.1002/glia.22962
135. Mürköster S, Rocha M, Crocker PR, Schirmacher V, Umansky V, Lee K-H, Hacker H-J, Benner A (1997) Sialoadhesin-Positive Host Macrophages Play an Essential Role in Graft-Versus-Leukemia Reactivity in Mice. *Blood* 89(6):2189–2202
136. Remington LT, Babcock AA, Zehntner SP, Owens T (2007) Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. *Am J Pathol* 170(5):1713–1724. doi:10.2353/ajpath.2007.060783
137. Wlodarczyk A, Løbner M, Cédile O, Owens T (2014) Comparison of microglia and infiltrating CD11c⁺ cells as antigen presenting cells for T cell

- proliferation and cytokine response. *Journal of Neuroinflammation* 11:57.
doi:10.1186/1742-2094-11-57
138. Wu C, Rauch U, Korpos E, Song J, Loser K, Crocker PR, Sorokin LM (2009) Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression. *The Journal of Immunology* 182(10):6508–6516.
doi:10.4049/jimmunol.0804247
139. Schryver M de, Cappoen D, Elewaut D, Nauwynck HJ, Maes L, Caljon G, Cos P, Delputte PL (2017) Monoclonal antibody binding to the macrophage-specific receptor sialoadhesin alters the phagocytic properties of human and mouse macrophages. *Cell Immunol* 312:51–60.
doi:10.1016/j.cellimm.2016.11.009
140. Baere MI de, van Gorp H, Nauwynck HJ, Delputte PL (2011) Antibody binding to porcine sialoadhesin reduces phagocytic capacity without affecting other macrophage effector functions. *Cell Immunol* 271(2):462–473. doi:10.1016/j.cellimm.2011.08.016
141. Legroux L, Arbour N (2015) Multiple Sclerosis and T Lymphocytes. An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol* 10(4):528–546.
doi:10.1007/s11481-015-9614-0
142. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6(1):15–25. doi:10.1038/cmi.2009.3
143. Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS (2011) Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585(23):3758–3763. doi:10.1016/j.febslet.2011.08.047
144. Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H (2004) Expression of Major Histocompatibility Complex class I Molecules on the Different Cell Types in Multiple Sclerosis Lesions. *Brain Pathology* 14(1):43–50.
doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00496.x

145. Denic A, Wootla B, Rodriguez M (2013) CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 17(9):1053–1066. doi:10.1517/14728222.2013.815726
146. Lassmann H (2013) Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 333(1-2):1–4. doi:10.1016/j.jns.2013.05.010
147. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68(5):869–877
148. Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP (1998) MHC Class I-Restricted Lysis of Human Oligodendrocytes by Myelin Basic Protein Peptide-Specific CD8 T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 160(6):3056–3059
149. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H (2001) Transection of Major Histocompatibility Complex Class I-Induced Neurites by Cytotoxic T Lymphocytes. *Am J Pathol* 159(3):809–815. doi:10.1016/S0002-9440(10)61755-5
150. Göbel K, Melzer N, Herrmann AM, Schuhmann MK, Bittner S, Ip CW, Hünig T, Meuth SG, Wiendl H (2010) Collateral neuronal apoptosis in CNS gray matter during an oligodendrocyte-directed CD8+ T cell attack. *Glia* 58(4):469–480. doi:10.1002/glia.20938
151. Sobottka B, Harrer MD, Ziegler U, Fischer K, Wiendl H, Hünig T, Becher B, Goebels N (2009) Collateral Bystander Damage by Myelin-Directed CD8+ T Cells Causes Axonal Loss. *Am J Pathol* 175(3):1160–1166. doi:10.2353/ajpath.2009.090340
152. Ip CW, Kroner A, Bendszus M, Leder C, Kobsar I, Fischer S, Wiendl H, Nave K-A, Martini R (2006) Immune Cells Contribute to Myelin Degeneration and Axonopathic Changes in Mice Overexpressing Proteolipid Protein in Oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 26(31):8206–8216. doi:10.1523/JNEUROSCI.1921-06.2006
153. Groh J, Kühl TG, Ip CW, Nelvagal HR, Sri S, Duckett S, Mirza M, Langmann T, Cooper JD, Martini R (2013) Immune cells perturb axons

- and impair neuronal survival in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain* 136(4):1083–1101. doi:10.1093/brain/awt020
154. Jones A, Hawiger D (2017) Peripherally Induced Regulatory T Cells. Recruited Protectors of the Central Nervous System against Autoimmune Neuroinflammation. *Front. Immunol.* 8:532. doi:10.3389/fimmu.2017.00532
155. Dombrowski Y, O'Hagan T, Dittmer M, Penalva R, Mayoral SR, Bankhead P, Fleville S, Eleftheriadis G, Zhao C, Naughton M, Hassan R, Moffat J, Falconer J, Boyd A, Hamilton P, Allen IV, Kissenpfennig A, Moynagh PN, Evergren E, Perbal B, Williams AC, Ingram RJ, Chan JR, Franklin RJM, Fitzgerald DC (2017) Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat Neurosci* 20(5):674–680. doi:10.1038/nn.4528
156. Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave K-A (2012) Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485(7399):517–521. doi:10.1038/nature11007
157. Saxena A, Bauer J, Scheikl T, Zappulla J, Audebert M, Desbois S, Waisman A, Lassmann H, Liblau RS, Mars LT (2008) Cutting Edge. Multiple Sclerosis-Like Lesions Induced by Effector CD8 T Cells Recognizing a Sequestered Antigen on Oligodendrocytes. *The Journal of Immunology* 181(3):1617–1621. doi:10.4049/jimmunol.181.3.1617
158. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, Mahad D, Bradl M, van Horssen J, Lassmann H (2012) NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 135(Pt 3):886–899. doi:10.1093/brain/aws012
159. Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, Lax N, White K, Hanson PS, Lassmann H, Turnbull DM (2009) Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* 132(Pt 5):1161–1174. doi:10.1093/brain/awp046

160. Smith KJ, Lassmann H (2002) The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 1(4):232–241. doi:10.1016/S1474-4422(02)00102-3
161. Trapp BD, Stys PK (2009) Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 8(3):280–291. doi:10.1016/S1474-4422(09)70043-2
162. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H (2011) Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 134(Pt 7):1914–1924. doi:10.1093/brain/awr128
163. Groh J, Klein I, Hollmann C, Wettmarshausen J, Klein D, Martini R (2015) CSF-1-activated macrophages are target-directed and essential mediators of Schwann cell dedifferentiation and dysfunction in Cx32-deficient mice. *Glia* 63(6):977–986. doi:10.1002/glia.22796
164. Ip CW, Kroner A, Groh J, Huber M, Klein D, Spahn I, Diem R, Williams SK, Nave K-A, Edgar JM, Martini R (2012) Neuroinflammation by Cytotoxic T-Lymphocytes Impairs Retrograde Axonal Transport in an Oligodendrocyte Mutant Mouse. *PLOS ONE* 7(8):e42554. doi:10.1371/journal.pone.0042554

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Myelinscheide modifiziert nach Podbielska et al. 2009	4
Abbildung 2: Übergang der RRMS in SPMS nach Stys et al. 2012.....	8
Abbildung 3: ‚Inside-out‘ Modell nach Stys et al. 2012	11
Abbildung 4: Darstellung und Quantifizierung von dünn- und demyelinisierten Axonen.....	25
Abbildung 5: Darstellung und Quantifizierung von Vakuolen und Sphäroiden.	26
Abbildung 6: Darstellung und Quantifizierung SMI-32 positiver Sphäroide.	28
Abbildung 7: Darstellung und Quantifizierung Nissl positiver RGC.	30
Abbildung 8: Auswertung der Schichten der Retina im OCT.....	32
Abbildung 9: Darstellung und Quantifizierung F4/80 positiver Profile.....	34
Abbildung 10: Darstellung und Quantifizierung CD8 positiver T-Zellen.....	36
Abbildung 11: Darstellung und Quantifizierung CD4 positiver T-Zellen.....	37
Abbildung 12: Auswertung der Rotarod-Analyse.....	40
Abbildung 13: Möglicher Schädigungsmechanismus in diesem Mausmodell...	57

8. Anhang

8.1. Technische Geräte

CCD-Kamera	Visitron Systems (Puchheim, Deutschland)
Deckgläschen	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Gefrierschrank	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Heizplatte Medax	(Neumünster, Deutschland)
Kontaktlinse Cantor&Nissel	(Brackley, Großbritannien)
Kryostat CM 3050S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Linse (+25 Dioptrien)	Heidelberg Engineering (Heidelberg, Deutschland)
Mikroskope	
Axiophot 2	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
FluoView FV 1000	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Leo 906 E	Zeiss (Oberkochen, Bayern)
Objektträger Superfrost	Langenbrick (Teningen, Deutschland)
PapPen	(SCI München, Deutschland)
Perfusionspumpe Reglo	Ismatec (Glattbrugg, Schweiz)
Pipetten	Abimed (Berlin, Deutschland)
	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Gilson (Bad Camberg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)

ProScan Slow Scan CCD camera	Pro Scan (Lagerlechfeld, Deutschland)
ReagiergefäÙe	Sarstedt (Nürnbergrecht, Deutschland)
RotaRod	TSE systems (Bad Homburg, Deutschland)
Schneidegerät Ultracut	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Spectralis OCT	Heidelberg Engineering (Heidelberg, Deutschland)
Vibratom VT1000S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Vortex L46	Labinco BV (Breda, Niederlande)
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)

8.2. Software

Adobe Photoshop CS3	Adobe (San Jose, USA)
FluoView	Olympus (Hamburg, Deutschland)
HEYEX (Heidelberg Eye Explorer, v.1.7.1)	Heidelberg Engineering (Heidelberg, Deutschland)
iTEM	Olympus (Hamburg, Deutschland)
ImageJ	NIH (Bethesda, USA)
Office 365	Microsoft (Redmond, USA)
PASW Statistics 18 SPSS	IBM (Ehningen, Deutschland)

8.3. Reagenzien

Aceton	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
--------	-------------------------------------

Aqua-Poly/Mount	Polysciences (Eppelheim, Deutschland)
Aquatex	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Corneregel Fluid	Bausch & Lomb
DAB (Diaminobenzidin)	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, Dänemark)
DAPI	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
DER 736	Serva (Heidelberg, Deutschland)
DMAE (Dimethylaminoethanol)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
GA (Glutaraldehyd)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Heparin	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
KCl (Kaliumchlorid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ketamin	Pfizer (Berlin, Deutschland)
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Methylbutan	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaCl (Natriumchlorid)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
NGS (Normales Ziegenserum)	Dako (Hamburg, Deutschland)

NSA (Non-Enyl-Bernsteinsäureanhydrid)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
O.C.T Medium	Sakura (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
PFA (Paraformaldehyd)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Stickstoff	
Tropicamid Augentropfen 0,5 % (Mydrum)	Bausch & Lomb
Vinyl/ERL	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Vitroclud	Langenbrick (Emmendingen, Deutschland)
Xylavet	CP-Pharma (Burgdorf, Deutschland)

8.4. Puffer und Lösungen

Anästhetika	1,2 % Ketamin
	0,08 % Xylavet
	0,9 % NaCl
Cresyl Violet Lösung	0,1 % Cresyl Violet
	1 % Essigsäure
DABCO	25 % PBS
	75 % Glycerol
	25 mg/ml 1,4-Diazabicyclo[2.2.2.]octan

Aufbewahrt bei 4°C

1x PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

8,1 mM Na₂HPO₄

pH 7,4

Spurr's Medium

10 g Vinyl/ERL

6 g DER 736

26 g NSA 26g

0,4 g DMAE

Es wurde destilliertes Wasser zur Lösung verwendet und die daraus entstandenen Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt, falls nicht anders beschrieben.

8.5. Antikörper

Primärantikörper	Wirt	Firma	Klon	Verdünnung	Post-Fixierung
CD4	Ratte	Serotec	YTS191.1	1:1000	Aceton
CD8	Ratte	Serotec	KT15	1:500	Aceton
F4/80	Ratte	Serotec	MCA497	1:300	Aceton
SMI-32	Maus	Covance	SMI-32	1:2000	4 % PFA

Sekundärantikörper	Firma	Wirt	Verdünnung	Konjugation
Anti-Ratte IgG	Dianova	Ziege	1:300	Cy3
Anti-Maus IgG	Vector	Ziege	1:100	Biotin

9. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Arg137Trp	Die Aminosäure 137 wird durch Mutation von Arginin zu Tryptophan
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
CCD	Charge-Coupled Device (Ladungsgekoppeltes Bauteil)
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleid acid (Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanin
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDSS	Expanded Disability Status Scale
GA	Glutaraldehyd

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Het	Heterozygot
hPLPG	humanes Proteolipid Protein mit Mutation nach Gorman
hPLPG/PlpKo	humanes Proteolipid Protein mit Mutation nach Gorman mit Knock-out Hintergrund
hPLPW	humanes Proteolipid Protein mit Mutation nach Warshawsky
hPLPW/PlpKo	humanes Proteolipid Protein mit Mutation nach Gorman mit Knock-out Hintergrund
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
Leu30Arg	Die Aminosäure 30 wird durch Mutation von Leucin zu Arginin
M	Mittelwert
MBP	Myelin Basis Protein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NCL	Neuronale Ceroid Lipofuszinose
NGS	Normal Goat Serum (Normales Ziegenserum)

OCT	Optic Coherence Tomography (Optische Kohärenztomographie)
ODZ	Oligodendrozyt
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid Protein (human)
Plp	Proteolipid Protein (murin)
PlpKo	Proteolipid Protein Defizienz
PMD	Pelizaeus-Merzbacher disease (Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit)
PMS	Progressive Multiple Sklerose
PPMS	Primär progressive Multiple Sklerose
RGC	Retinal Ganglion Cells (Retinale Ganglienzellen)
Rpm	Rounds per minute (Runden pro Minute)
RRMS	Relapsing Remitting Multiple Sclerosis (Schubförmige Multiple Sklerose)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDMT	Symbol Digit Modalities Test

SD-OCT	Spectral Domain Optical Coherence Tomography (Optische Kohärenztomographie)
HSP	Hereditäre Spastische Paraplegie
SPMS	Sekundäre progressive Multiple Sklerose
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Danksagung

Zuvorderst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Martini bedanken, dass er es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Des Weiteren möchte ich ihm für seine langjährige Betreuung und Unterstützung sowie seine Geduld herzlich danken. Sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft in allen Belangen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit und meinem beruflichen Werdegang beigetragen.

Weiter möchte ich mich ganz besonders bei meinem Betreuer PD Dr. Janos Groh für seine hervorragende Unterstützung bedanken, der mir durch die Einarbeitung in die verschiedenen Methodiken, mit konstruktiven Ideen und Lösungsvorschlägen sowie der dauerhaften Bereitschaft mit Rat zur Seite zu stehen, sehr zur Erstellung dieser Dissertation beigetragen hat.

Zudem möchte ich mich bei meinen weiteren Betreuern, Frau Prof. Dr. Anna-Leena Sirén und Herr Prof. Dr. Manfred Lutz, bedanken, die mir in meinem Promotionskomitee der GSLS ebenfalls mit hilfreichen Ratschlägen und neuen Ideen zur Seite standen. Weiterhin möchte ich mich zusätzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kastenmüller für die Übernahme des Vorsitzes im Promotionskomitee bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Heinrich Blazyca, Silke Loserth und Bettina Meyer für die exzellente technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente bedanken.

Auch danke ich meinen Kollegen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Dennis Klein, Dr. David Schreiber, Kristina Heintl, Dr. Susanne Kerscher, Michaela Baier und Michaela Hörner für die immer angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die hervorragende Pflege und Organisation der Tiere danke ich Helga Brünner, Anja Weidner, Jaqueline Schreiber und Jennifer Bauer.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere Cäcilia Kopp, meinen Eltern und meiner Schwester, für ihre stete Hilfsbereitschaft und die dauerhafte Unterstützung bedanken.

Publikationen

Pathogenic inflammation in the CNS of mice carrying human PLP1 mutations. Groh J, Friedman HC, Orel N, Ip CW, Fischer S, Spahn I, Schäffner E, Hörner M, **Stadler D**, Buttman M, Varallyay C, Solymosi L, Sendtner M, Peterson AC, Martini R. Hum Mol Genet. 2016 Nov

Sialoadhesin promotes neuroinflammation-related disease progression in two mouse models of CLN disease. Groh J, Ribechini E, **Stadler D**, Schilling T, Lutz MB, Martini R. Glia. 2016 May

Non-invasive assessment of retinal alterations in mouse models of infantile and juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis by spectral domain optical coherence tomography. Groh J, **Stadler D**, Buttman M, Martini R. Acta Neuropathol Commun. 2014 May

