

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Identifizierung von Schlüsselgenen, die an der Bildung von tertiär
lymphatischen Organen im zentralen Nervensystem in einem
B-Zell-abhängigen Mausmodell der Multiplen Sklerose
beteiligt sind**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Jörn Rohde
aus Flensburg

Würzburg, Mai 2021



Referentin:

Univ.-Prof. Dr. med. Stefanie Kürten

Korreferent/ Korreferentin:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Friebe

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

07. April 2022

Der Promovend ist Arzt

Meinem Großvater

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Klinischer Verlauf	5
1.1.3 Pathogenese	6
1.1.4 Die Rolle der B-Zelle	8
1.2 Tertiär lymphatische Organe	10
1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	13
1.3.1 MOG	15
1.3.2 MP4	16
1.4 Zusammenfassung	16
1.5 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte/Software	20
2.1.2 Reagenzien/Kits	20
2.1.3 Antikörper	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Hygiene	23
2.2.2 Mäuse	24
2.2.3 Induktion und klinische Bewertung der EAE	25
2.2.3.1 Scoring	26
2.2.4 Gewebeentnahme	26
2.2.5 Gewebefixierung	27
2.2.5.1 PFA (Paraformaldehyd)	27
2.2.5.2 Methacarn	27
2.2.5.3 HOPE	27
2.2.5.4 Kryofixierung	28
2.2.6 Mikrotomie	28
2.2.6.1 Schneiden am Mikrotom	28
2.2.6.2 Schneiden am Gefriermikrotom	30
2.2.7 Cresyl Violett Färbung	31
2.2.8 Immunhistochemische Färbung	31
2.2.8.1 IHC-Färbung an Paraffinschnitten	32
2.2.8.1.1 Kombinierte B- und T-Zellfärbung	32
2.2.8.2 IHC-Färbung an Kryoschnitten	34
2.2.8.2.1 B-Zell-Färbung	34
2.2.8.2.2 T-Zell-Färbung	34
2.2.9 Etablierung IHC	35
2.2.9.1 Fixierung	35
2.2.9.2 Antikörperkonzentrationen	35
2.2.10 Laser Capture Microdissection	36
2.2.11 RNA-Isolation	37
2.2.12 Gensequenzierung	38

3 Ergebnisse	40
3.1 Etablierung der RNA-Isolation	40
3.2 Klinischer Verlauf der EAE	41
3.3 Immunhistochemische Färbung	43
3.4 Qualität und Quantität der RNA-Isolation	44
3.5 Grafische Auswertung der Genexpressionsanalyse	45
3.5.1 Hauptkomponentenanalyse	45
3.5.2 Heatmap	47
3.5.2.1 Heatmap „Übersicht“	47
3.5.2.2 Heatmaps der relevanten Gene	48
3.5.2.2.1 Heatmap B-Zell-Infiltrate	49
3.5.2.2.2 Heatmap B-Zell-Aggregate	49
3.5.2.2.3 Heatmap „Gemeinsam exprimierte Gene“	50
4 Diskussion	54
4.1. Einleitung	54
4.2. Etablierung der RNA-Isolation	54
4.2.1 Fixierung und Einbettung	54
4.2.1.1 Potentielle Fehlerquellen	55
4.2.2 Färbungen und LCM	56
4.3 Einordnung der relevanten Gene	59
4.3.1 Einleitung	59
4.3.2 B-Zell-Infiltrate	59
4.3.3 B-Zell-Aggregate	69
4.3.4 Gemeinsam exprimierte Gene	75
5 Fazit/ Ausblick	78
6 Zusammenfassung/ Abstract	81
7 Literaturverzeichnis	83
Appendix	
I Abkürzungsverzeichnis	
II Tabellenverzeichnis	
III Abbildungsverzeichnis	
IV Danksagung	
VI Veröffentlichungen	

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit progredienter Demyelinisierung von Nervenfasern und axonaler Schädigung. Makroskopisches Korrelat sind herdförmige Läsionen, die disseminiert im gesamten ZNS auftreten können.

Häufige Erstsymptome der MS sind Sehstörungen im Rahmen einer Optikusneuritis sowie unspezifische Sensibilitätsstörungen. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es meist zu einer Zunahme der neurologischen Ausfälle und chronischer Behinderung.

Bisher konnte für die MS keine genaue Ursache ausgemacht werden, es handelt sich am ehesten um ein multifaktoriell bedingtes Krankheitsgeschehen, bei dem viele Faktoren wie z. B. Sonnenlicht, EBV-Infektion, Rauchen, Ernährung und genetische Faktoren eine entscheidende Rolle spielen [1]. Eine kurative Therapie steht zum heutigen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung.

In Deutschland leben circa 200.000 Personen mit der Diagnose MS. Frauen sind hierbei deutlich häufiger betroffen als Männer. Die mittlere Prävalenz für Frauen beträgt 382/100.000, für Männer hingegen nur 167/100.000 [2]. Das war jedoch nicht immer so. Eine kanadische Studie konnte zeigen, dass das Geschlechtergefälle seit 50 Jahren stetig zunimmt [3]. Beobachtungen im frühen 19. Jahrhundert zeigten sogar ein nahezu gleiches Geschlechterverhältnis [4]. Unter anderem wird hierfür der rapide Anstieg von weiblichen Rauchern seit den 50er-Jahren verantwortlich gemacht, aber auch der verstärkte Einsatz von oralen Kontrazeptiva oder eine geringere Parität, werden als Einflussfaktoren diskutiert [5].

Die meisten Patienten erkranken zwischen ihrem 20. und 40. Lebensjahr an MS, das mittlere Alter bei Erkrankungsbeginn liegt bei 30,2 Jahren. Nach 13-jähriger

Krankheitsdauer sind etwa ein Drittel (32,7%) aller Patienten aus der Erwerbstätigkeit ausgeschieden. Berufliche Umschulungen werden bisher nur bei sehr wenigen Patienten vorgenommen [6]. Neben den lebensverändernden Einzelschicksalen wirkt sich MS auch auf die sozioökonomischen Verhältnisse aus. Rechnet man zu den allgemeinen, durch MS entstehenden Krankheitskosten, die Belastung durch Erwerbsunfähigkeit, vorzeitige Berentung etc. hinzu, werden die jährlichen Kosten auf über 30.000 Euro pro Patient geschätzt [6].

Ein einzelner kausaler Auslöser für die MS konnte bis heute nicht gefunden werden. Die Aussage, die Ursache der MS sei gänzlich unbekannt, ist jedoch auch nicht richtig. Es konnten in der Vergangenheit viele Faktoren ermittelt werden, die an der Entstehung, Progression und Aufrechterhaltung der MS beteiligt sind.

Eine maßgebliche Rolle nimmt hierbei eine genetische Prädisposition ein. Dafür sprechen Zwillingsstudien, welche für monozygote Zwillinge eine Konkordanzrate von 25,3 % ermitteln konnten. Bei Verwandten ersten Grades liegt die Konkordanzrate immerhin noch bei etwa 6 % [7, 8]. Tiefere Einblicke in die Genetik bieten genomweite Assoziationsstudien. Hier konnten bisher weit über 100 genetische Risikovarianten außerhalb des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) gefunden werden. Circa 22 % dieser Varianten konnten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise rheumatoider Arthritis (RA), Morbus Crohn oder Zöliakie, gefunden werden [9]. Den größten Einfluss auf die Suszeptibilität für MS haben nach aktuellem Kenntnisstand jedoch die Gene des humanen Leukozytenantigen-Komplexes (HLA). Bis zu 10,5 % des gesamten genetischen Risikos wird der Klasse II Region des HLA zugesprochen. Hierbei hat HLA-DRB1*15:01 den größten Effekt. Ein weiterer interessanter immunogenetischer Aspekt ist auf dem Chromosom 19q13.4 codiert. Hier liegen die Allele der *killer-immunoglobulin-like receptors* (KIR). Bei den KIR handelt es sich um Rezeptoren, die von den natürlichen Killerzellen (NK) und in kleiner Anzahl auch von CD8⁺ T-Zellen exprimiert werden [10, 11]. Als primärer Ligand

für die meisten KIR dienen HLA Klasse-I-Moleküle. Ein Bezug zwischen HLA und KIR liegt also nahe. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter KIR-Varianten die Anfälligkeit für MS erhöhen bzw. erniedrigen kann [12].

Eine gängige Hypothese bezüglich der MS besagt, dass sich die MS auf dem Boden einer genetischen Prädisposition durch den Einfluss der Umwelt entwickelt. Tatsächlich gibt es zahlreiche Umwelteinflüsse, die mit der MS in Zusammenhang gebracht werden konnten. Migrationsstudien konnten zeigen, dass die Herkunft eine wichtige Rolle in der Entstehung der MS spielt. Generell kann man sagen, dass die MS in Ländern in der Äquatorialzone eher selten ist und die Inzidenz mit Nähe zu den Polen zunimmt. Doch auch hier gibt es einige Ausnahmen. In Japan ist MS beispielsweise eine eher seltene Erkrankung [13, 14].

Dänemark ist ein Land mit einer hohen MS-Inzidenz. Dänische Forscher konnten nun zeigen, dass Migranten aus einem Land mit einer niedrigen MS-Inzidenz, die vor ihrem 15. Lebensjahr nach Dänemark kamen, im Gegensatz zu ihrem Geburtsland zwar ein höheres Erkrankungsrisiko aufwiesen, jedoch ein weitaus niedrigeres als das der ethnischen Dänen. Migranten, die nach ihrem 15. Lebensjahr nach Dänemark auswanderten, hatten hingegen eine Anfälligkeit für MS, die ihrem Geburtsland entsprach. Dieser Effekt war jedoch nicht über einen Generationenwechsel hinaus stabil. Kinder von Immigranten aus Ländern mit einer geringen MS-Wahrscheinlichkeit hatten im Gegensatz zu gebürtigen Dänen ein um 28% höheres Erkrankungsrisiko [15]. Es scheint, als würden Umweltfaktoren, die ihren Effekt im Kindes- und Jugendalter entfalten, von ätiologischer Relevanz sein.

Bei einem dieser Faktoren könnte es sich um die vermehrte Sonneneinstrahlung am Äquator handeln. Vermehrte Sonneneinstrahlung und somit auch erhöhte Ultraviolettstrahlung B (UVB)-Exposition führt zu einem höheren Vitamin D-Spiegel. Vitamin D hat in Bezug auf die MS einen protektiven Effekt. Der Haupteffekt des Vitamins D scheint hierbei immunmodulatorisch zu sein [16]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Vitamin D Auswirkungen auf die Regulation von T- und B-Lymphozyten hat, sowie auf die Sekretion

verschiedener Zytokine, beispielsweise IL-17 und IFN- γ [17-19]. Darüber hinaus scheint Vitamin D einen Einfluss auf den genetischen Hauptrisikofaktor zu haben, das Allel *HLA - DRB1 * 15: 01* (siehe oben). Eine Studie von 2009 konnte zeigen, dass Vitamin D spezifisch mit *DRB1 * 15: 01* interagiert und dessen Expression beeinflusst [20].

Bei der Diskussion um die Ätiologie spielen auch humanpathogene Viren eine Rolle. Hierbei steht besonders das Epstein-Barr Virus (EBV) im Fokus. Die Seropositivität für EBV ist mit über 90% der Weltbevölkerung sehr hoch. Jedoch beträgt die Seropositivität bei erwachsenen MS-Patienten nahezu 100% [21]. Die Erklärungsansätze für den Einfluss von EBV auf MS sind sehr heterogen. In der Vergangenheit wurde molekulares Mimikry in Zusammenhang mit EBV gebracht. Eine Studie zeigte, dass ein T-Zell-Rezeptor eines MS-Patienten sowohl ein MBP-(85-99)-Epitop als auch ein EBV-DNA-Polymerasepeptid erkannte [22]. In jüngerer Zeit ist auch die B-Zelle mehr in den Mittelpunkt gerückt. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass mit EBV infizierte B-Zellen rekombinantes humanes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (rhMOG) verarbeiten, präsentieren und eine anschließende Erkennung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen ermöglichen [23].

Während die bisher genannten Umwelteinflüsse schwer durch ein Individuum selbst beeinflusst werden können, gibt es auch bestimmte Lebensstile, die das Risiko an MS zu erkranken signifikant steigern. Beispielsweise erhöht Rauchen das MS-Risiko, es gibt jedoch nur geringe Hinweise, dass Tabakkonsum sich auch negativ auf die Progression der Erkrankung auswirkt [24]. Interessanterweise führt lediglich der inhalative Tabakkonsum zu einem erhöhten Risiko, der Konsum von Schnupftabak wirkt sich in Bezug auf MS nicht negativ aus [25]. Nikotin scheint also nicht der ausschlaggebende Faktor zu sein. Die genauen molekularen Mechanismen zwischen inhalativem Tabakkonsum und MS sind weiterhin unklar [25].

Neben dem Rauchen scheint auch die Ernährung einen Einfluss auf die MS zu haben. Die Ernährung kann sich auf die Progression der MS auswirken und sollte in einem multimodalen Behandlungskonzept berücksichtigt werden [26, 27].

Insgesamt wurde dem gastrointestinalen Trakt und dem enterischen Nervensystem bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der *Plexus myentericus* von MS-Patienten Schäden an Nervenfasern und eine Aktivierung von Gliazellen aufweist [28].

Insgesamt ist die Ätiologie der MS noch nicht ausreichend verstanden. Es gibt unzählige Ansätze, um diese Erkrankung zu erklären. Es handelt sich allerdings am ehesten um eine Erkrankung, die sich durch verschiedene Umwelteinflüsse auf dem Boden einer genetischen Prädisposition entwickelt. Ob jemals ein einzelner kausaler Auslöser für die MS gefunden werden kann, bleibt offen. Es scheint jedoch eher, als würde sich die Ätiologie der MS als buntes Mosaik abbilden lassen, bei dem nach wie vor viele Steine zum umfassenden Verständnis fehlen.

1.1.2 Klinischer Verlauf

So vielfältig wie die Ätiologie ist auch der Verlauf und die Klinik der MS. Es gibt nicht das eine pathognomonische Krankheitszeichen. Die MS kann das gesamte ZNS befallen und ähnlich vielfältig wie dessen Funktionen, sind auch die Symptome, die aus dessen Erkrankung resultieren können. Es sind allerdings einige Muster erkennbar. So gibt es bestimmte Symptome, bei denen man hellhörig werden sollte. Hierzu zählt beispielsweise die Optikusneuritis, welche mit einer schmerzhaften Augenbewegung und einer Sehstörung einhergehen kann und häufig als erstes Krankheitszeichen bemerkt wird. Weitere neurologische Symptome sind Paresen, Sensibilitätsstörungen, Ataxie, Sexualstörungen, Blasen- und Mastdarmstörungen. Hinzu kommen im Verlauf häufig noch kognitive Einschränkungen, Fatigue und psychiatrische Auffälligkeiten [29, 30].

Die Symptome manifestieren sich meist als schubartige Verschlechterung. Als Schub wird per Definition eine sich entwickelnde neurologische Symptomatik bezeichnet, die für mindestens 24 Stunden persistiert und sich komplett oder zumindest partiell zurückbildet. Zwischen zwei Schüben muss ein Mindestabstand von 30 Tagen liegen. Echte Schübe müssen von

Pseudoexazerbationen abgegrenzt werden, welche durch eine Erhöhung der Körpertemperatur, dem sogenannten Uhthoff-Phänomen, ausgelöst werden können. Typische Auslöser hierfür sind beispielsweise heiße Bäder, Saunabesuche oder systemische fieberhafte Infekte [31].

Die Ausprägung der MS-bedingten Behinderung wird klinisch häufig anhand der Gehfähigkeit mit Hilfe der Kurtzke-Skala bzw. *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) erfasst. Der numerische Wert erstreckt sich von 0 = normaler neurologischer Befund bis 10 = Tod in Folge von MS. Ab einem EDSS von 6 ist das Gehen ohne Hilfsmittel wie beispielsweise Stock oder Krücken nicht mehr möglich [30, 32].

Bei der MS lassen sich im Wesentlichen drei verschiedene Verlaufsformen unterscheiden. Zu Beginn der Erkrankung besteht meist ein schubförmig remittierender Verlauf (relapsierend-remittierende Multiple Sklerose). Hier kommt es zu einem Wechsel zwischen schubförmiger Verschlechterung, Remission und Phasen der klinischen Stabilität. Die RRMS wird im Krankheitsverlauf häufig von einer sekundär chronisch progredienten MS (SPMS) abgelöst, bei der es zu einer kontinuierlichen Verschlechterung des klinischen Zustandes kommt. Als dritte Verlaufsform der MS bleibt die primär progrediente MS (PPMS) zu nennen. Die 10-15% der MS-Patienten, die eine PPMS Erkrankung haben, leiden von Erkrankungsbeginn an unter einer sich stetig verschlechternden neurologischen Symptomatik. Eine schwedische Studie konnte zwischen 1946 und 2014 einen signifikanten Rückgang der Inzidenz für die PPMS nachweise, was jedoch auch an einem Mangel an lizenzierten Therapien für die PPMS liegen kann [33]. Der Verdacht liegt nahe, dass PPMS-Patienten als RRMS eingestuft werden, um eine entsprechende Behandlung zu erhalten [3, 30, 33].

1.1.3 Pathogenese

Im Jahr 1867 stellte Charcot der medizinischen Fachgesellschaft eine Erkrankung vor, die er als *Sclérose en plaques* bezeichnete. Bei den *Sclérose en plaques* Patienten kam es, laut Charcot, in den periventrikulären Bereichen des Gehirns, im Pons und im Rückenmark zur Bildung von sklerosierenden

Plaques. Charcot beschrieb im Verlauf weiterhin aufwändig die Symptomatik und differenzierte zwischen unterschiedlichen Befallsmustern. Er lieferte damit nicht nur den ersten umfassenden Bericht zur MS, sondern erkannte durch seine Beobachtungen auch das pathologisch spezifische Merkmal für die MS: entzündliche Läsionen, die zu demyelinisierenden Plaques führen [29, 34]. Die Demyelinisierung ist ein selektiver Prozess, der zunächst nur die Myelinscheiden und Oligodendrozyten betrifft. Das Axongerüst bleibt im frühen Stadium der Erkrankung jedenfalls teilweise erhalten. Mit der Ausbreitung der Läsionen kommt es jedoch zu einer massiven axonalen Schädigung, welche als pathologische Korrelat mit dem Grad der neurologischen Beeinträchtigung zusammenhängt [35, 36]. Die entzündlichen Läsionen bzw. Infiltrate enthalten hauptsächlich T-Lymphozyten, wobei der Anteil der CD8⁺ T-Zellen überwiegt. Außerdem vorhanden, wenn auch in deutlich geringerer Anzahl, sind B-Lymphozyten und Plasmazellen [29, 37].

Die genaue Immunpathogenese der MS ist noch nicht abschließend geklärt. Der Großteil der aktuellen Erkenntnisse basiert auf der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell, bei dem es zu einer entzündlich demyelinisierenden Erkrankung des ZNS kommt, welche viele histologische Gemeinsamkeiten zur humanen MS aufweist [38].

Es wird vermutet, dass es bei genetisch prädisponierten Personen in der Peripherie (Blut o. Lymphknoten) zu einer Bildung von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen kommt. Die aktivierten T-Zellen haben die Fähigkeit, im weiteren Verlauf über die BHS zu transmigrieren [39]. Für den Mechanismus der Aktivierung und des Toleranzverlustes der autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen werden im Wesentlichen zwei Thesen diskutiert. Zum einen kann eine Aktivierung durch molekulare Mimikry erfolgen. Hierbei besteht eine Ähnlichkeit zwischen den Antigenen eines externen Erregers (beispielsweise eines viralen Proteins) und körpereigenen Antigenen. Eine Infektion mit einem Erreger, der eine entsprechende Homologie zu einem körpereigenen Protein aufweist, kann zu einer Aktivierung von autoreaktiven Zellen führen [40, 41]. Als zweite These wird die Bystander-Aktivierung diskutiert. Hierbei kommt es innerhalb eines entzündlichen Milieus, insbesondere durch die Einwirkung von Zytokinen, zu einer Aktivierung von

autoreaktiven T-Zellen [40]. Eine intrathekale Zytokinproduktion unterstützt die Migration von autoreaktiven T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auch ein direktes Zusammenwirken von molekulare Mimikry und Bystander-Aktivierung ist denkbar. So können bereits durch molekulare Mimikry geprimte autoreaktive T-Zellen im Zuge einer zweiten unspezifische virale Infektion durch eine Bystander-Aktivierung reaktiviert werden [42, 43].

Nach dem Eindringen ins ZNS werden die T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) reaktiviert, indem diese den T-Zellen ZNS-Autoantigene auf HLA-Molekülen präsentieren [39]. Hierfür kommen dendritische Zellen (DZ), Makrophagen, Mikroglia oder B-Zellen in Frage [44].

CD4⁺ T-Zellen können über ein spezifisches Interleukin-Milieu zu Effektorzellen polarisiert werden. Sobald die Polarisierung zu Th1-, Th2-, Th9-, oder Th17-Zellen stattgefunden hat, produzieren diese Zellen Effektormoleküle [44, 45]. Th1-Zellen produzieren proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interferon- γ . Th17-Zellen produzieren IL-17, IL-21, IL-22 und IL-26, auch hier besteht ein proinflammatorischer Effekt. Im Gegensatz dazu stehen die Th2-Zellen, die durch die Sezernierung von IL-4 und IL-13 eher eine entzündungshemmende Wirkung entfalten [44].

Die T-Zelle scheint mit ihren komplexen Regelabläufen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der MS einzunehmen. Doch in den letzten Jahren hat auch die B-Zelle vermehrt an Relevanz in der MS-Forschung gewonnen und auch Behandlungsansätze, welche die B-Zell-abhängige Immunpathologie in den Fokus stellen, konnten große Erfolge erzielen.

1.1.4 Die Rolle der B-Zelle

Wie auch die immunpathologischen Prozesse der T-Zellen im Rahmen der MS sind auch die Funktionen der B-Zellen sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Maßgebliche Prozesse, die zur Krankheitsentwicklung und Progression führen, sind die Produktion von Antikörpern durch Plasmazellen, die Funktion als APZ und die Bildung von B-Zell-Infiltraten bzw. Aggregaten.

Eine der Hauptfunktionen von B-Lymphozyten ist die Differenzierung zu Plasmazellen und die Produktion von Antikörpern. Eben diese Antikörper sind ein charakteristischer immundiagnostischer Marker in der MS. Nachweisbar ist die Antikörperproduktion über oligoklonale Banden (OKBs) im *Liquor cerebrospinalis*. Normalerweise sind im Liquor keine Antikörper vorhanden, bei der MS kann es jedoch zu einer intrathekalen Antikörperproduktion kommen. OKBs, als Korrelat für die intrathekale Antikörperbildung, sind jedoch nicht spezifisch für die MS und können auch bei einigen anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie beispielsweise Neuroborreliose, Lues und viralen Enzephalitiden auftreten [46]. Wenn mittels isoelektrischer Fokussierung eine zeitgleiche Analyse von Serum und Liquor durchgeführt wird und in der Liquorprobe im Vergleich zur Serumprobe vermehrt Banden auftreten, spricht das für eine isoliert intrathekale Antikörperbildung [47]. Bei MS-Patienten die OKBs aufweisen, bilden die Banden für den jeweiligen Patienten charakteristische Muster. Interessanterweise können diese Muster über Jahre stabil bleiben [48]. Diese Stabilität legt nahe, dass das ZNS ein für B-Zellen freundliches Milieu schaffen kann [48, 49]. Es bleibt jedoch die Frage nach der Spezifität der Antikörper. Als mögliche Antigene wurden das basische Myelinprotein (MBP - *myelin basic protein*), Proteolipid Protein (PLP), Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) und das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) beschrieben [46]. Die meisten Antikörper, die bei MS-Patienten nachgewiesen werden können, richten sich jedoch nicht gegen Myelinbestandteile, sondern häufig gegen infektiöse Erreger wie beispielsweise Masern, Röteln oder Varizellen [40, 50]. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass eine Plasmapherese bei steroidrefraktären Exazerbationen der MS zu einer klinischen Besserung bei einigen Patienten führte [51]. Besonders gut sprechen MS-Patienten mit einem histopathologischen Subtypen II (nach Lucchinetti und Bück) auf eine Plasmapherese an. Der Subtyp II ist dominiert durch ZNS-Läsionen, die eine ausgeprägte antikörper- und komplementvermittelte Schädigung zeigen. Die Vermutung liegt nahe, dass solche humoralen Einflüsse besonders gut durch die Plasmapherese beseitigt werden können [52-54].

Neben der Antikörperproduktion sind B-Lymphozyten auch in der Lage als APZ zu fungieren. In dem Zusammenhang sind die beiden monoklonalen Antikörper Rituximab und Ocrelizumab zu nennen. Beide führen zu einer selektiven Depletion von CD20⁺ B-Zellen. Ocrelizumab hat zudem den entscheidenden Vorteil, auch für die PPMS als erstes krankheitsbeeinflussendes Medikament zugelassen zu sein.

Interessanterweise führen Rituximab und Ocrelizumab nicht zu einer Depletion der langlebigen CD138⁺ Plasmazellen. Sie haben also keinen direkten Einfluss auf die Antikörperproduktion. Dennoch wirkt sich eine Antikörpertherapie positiv auf den Krankheitsverlauf von MS-Patienten aus, was wohl am ehesten auf die Zerstörung von CD20⁺ positiven B-Lymphozyten zurückzuführen ist [46, 55]. Neuere Studien zeigen einen direkten Effekt von CD20⁺ depletierenden Therapien auf T-Zellen. CD20⁺ wird auch auf einer Untergruppe von CD3⁺ T-Zellen exprimiert. Diese Zellen zeichnen sich durch eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Interleukinen aus. Auch wenn der genaue Wirkmechanismus von CD20⁺ depletierenden Therapien noch nicht abschließend geklärt ist, konnten sowohl Rituximab als auch Ocrelizumab in klinischen Studien der RRMS zu einer verringerten Krankheitsaktivität und Progression führen [56, 57]. Darüber hinaus zeigte Ocrelizumab in der randomisierten, placebo-kontrollierten ORATORIO-Studie, in der 732 PPMS Patienten eingeschlossen wurden, eine verminderte klinische Progression der MS und einen Rückgang der ZNS Läsionen [58].

1.2 Tertiär lymphatische Organe

Das lymphatische System setzt sich im Wesentlichen aus den lymphatischen Organen und den Lymphgefäßen zusammen. Die lymphatischen Organe lassen sich wiederum in primäre und sekundär lymphatische Organe unterteilen. Zu den primär lymphatischen Organen (PLO) zählt man das Knochenmark und den Thymus. Hier finden die Bildung und Reifung der B- und T-Lymphozyten statt. In den sekundär lymphatischen Organen (SLO), wozu man Milz, Lymphknoten und Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT) zählt, findet über

Antigenkontakte die Differenzierung zu Effektorzellen statt [59]. Die Liste der lymphatischen Organe muss jedoch noch um den Begriff der tertiär lymphatischen Organe (TLO) erweitert werden. 1992 prägten Picker et al. den Begriff „tertiär Lymphatisches Gewebe“, um extralymphatische Strukturen zu beschreiben, in denen Lymphozyten über Antigenpräsentation restimuliert werden können [60, 61].

TLOs kommen häufig in Zielorganen von Autoimmunerkrankungen vor. So wurden TLOs beispielsweise bei der RA, dem Sjögren-Syndrom und der Hashimoto Thyreoiditis beschrieben [62]. TLOs weisen einige morphologische und funktionale Gemeinsamkeiten zu den SLOs auf. TLOs haben beispielsweise getrennte B- und T-Zellzonen, hochendotheliale Venolen (HEV) sowie DZ. In TLOs kann es, wie auch in SLOs, zur klonalen Expansion, somatischen Hypermutation, Affinitätsreifung, Immunglobulinklassenwechsel sowie zu einer direkten terminalen Effektorreaktion kommen [60, 62].

Im Jahr 2004 konnten Magliozzi et al. erstmals lymphoide follikelähnliche Strukturen in den Meningen von Mäusen mit einer EAE feststellen [63]. Im selben Jahr konnten Serafini et al. den ersten immunhistochemischen Beweis für das Vorhandensein von TLOs bei MS-Patienten aufstellen. Dafür untersuchten sie *post mortem* ZNS-Gewebeschnitten von MS Patienten. Bei zwei von drei Patienten, die an einer SPMS erkrankt waren, konnten in den Meningen B-Zellen, T-Zellen, Plasmazellen und FDCs, die das lymphoide Chemokin CXCL13 exprimieren, nachgewiesen werden [64].

In den Jahren 2010 und 2011 führten Howell et al. und Magliozzi et al. zu dem Thema ektoper B-Zell-Follikel ähnlicher Strukturen im ZNS umfangreiche Studien mit humanem Gewebe durch. Hierfür untersuchten Howell et al. ZNS Gewebe von 123 und Magliozzi et al. von 37 SPMS-Patienten [65, 66]. Ziel war es zum einen, das Vorhandensein von Follikel-ähnlichen Strukturen zu belegen, denn einige andere Studien konnten die Existenz dieser Strukturen nicht nachweisen, und zum anderen, deren Einfluss auf die subpiale Pathologie der MS näher zu betrachten [65, 67].

Die Forschungsgruppen führten bei ihren Gewebeproben mittels Serienschnitten ein strukturiertes Screening durch. Howell et al. konnten in 40 % der Fälle Follikel-

ähnliche Strukturen nachweisen, bei Magliozzi et al. waren es sogar 57 % der Fälle.

Magliozzi et al. beschrieben bei den Proben der SPMS-Patienten mit nachgewiesenen Follikel-ähnlichen Strukturen (F+ SPMS) einen diffusen Verlust von Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten [65, 66]. Der Verlust folgte einem Gradienten, die stärkste Schädigung war in den äußeren Hirnschichten (subpial) zu finden, in den tieferen Schichten nahm der Verlust zunehmend ab. Es scheint also plausibel, dass die neuronale Schädigung direkt oder indirekt auf eine meningeale Entzündung zurückzuführen ist. Zudem wird erwartet, dass die Follikel-ähnlichen Strukturen, insbesondere die T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen molekulare Mediatoren wie beispielsweise Zytokine produzieren und diese in den Subarachnoidalraum diffundieren. Hierdurch kann ein generalisiertes entzündliches Milieu entstehen, welches den neuronalen Verlust begünstigt und die geringere neuronale Schädigung in den tieferen Hirnschichten erklärt [66]. Howell et al. fanden heraus, dass die Follikel-ähnlichen Strukturen besonders häufig in tiefen kortikalen Sulci zu finden waren. Das kann unter anderem mit dem verminderten Liquorfluss in den Sulci zusammenhängen [65]. Hierdurch könnte es zu einer Proteinakkumulation mit vermehrter Antigenpräsentation und Stimulation reaktiver Zellen kommen, was wiederum die Bildung lymphoidartiger Strukturen begünstigen würde [62].

Von besonderer klinischer Relevanz sind die Follikel-ähnlichen Strukturen aufgrund der Tatsache, dass das Vorhandensein dieser Strukturen mit einem jüngeren Erkrankungsalter und einem schwerem Krankheitsverlauf assoziiert sind [68]. Zudem konnten Howell et al. nachweisen, dass diese Strukturen auch in zwei Patienten mit sehr kurzer Krankheitsdauer (5-6 Jahre) vorhanden waren, was für einen Einfluss im frühen Krankheitsverlauf spricht [65].

Auffällig ist, dass weder Howell et al. noch Magliozzi et al. in ihren Arbeiten explizit von TLOs sprechen. Tatsächlich ist der Begriff TLOs nicht genau definiert. Als Picker et al. den Begriff 1992 prägten, bezeichneten sie es als jedes lymphoide Gewebe außerhalb von PLOs und SLOs. Genauer sollten es Orte sein, an denen Gedächtnis- und Effektorzellen durch Antigene restimuliert

werden können, oder an denen terminale Funktionen von T- und B-Lymphozyten ausgeführt werden können, wie beispielsweise Immunglobulinsekretion oder zytotoxische Funktionen [60].

Magliozzi et al. definierten ihre Follikel-ähnlichen Strukturen als B-Zell-Aggregate, die follikuläre DZ, proliferierende B-Zellen, Plasmazellen und T-Zellen enthielten. Howell et al. definierten die Strukturen in ähnlicher Weise, wobei sie auf die Präsenz von T-Zellen als Auswahlkriterium verzichteten [65, 66]. Die Einschlusskriterien von Magliozzi et al. und Howell et al. decken sich also weitestgehend mit den definitorischen Vorgaben für TLOs von Picker et al. [60].

Zusammenfassend kann man feststellen, dass TLOs einen maßgeblichen Beitrag zur Aufrechterhaltung und Aggravation der immunpathologischen Prozesse in der MS haben. TLOs unterstreichen durch ihre Bereitstellung eines geeigneten Milieus zur Lymphozytendifferenzierung und Reifung zusätzlich die Rolle der B-Zelle in der MS.

1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Um die Genexpressionsprofile der MS genauer zu verstehen, verwendeten wir in dieser Studie das Tiermodell der EAE. Bei der EAE handelt es sich wohl um das bekannteste und prägendste Tiermodell in der MS-Forschung. Die Wurzeln der EAE reichen über 90 Jahre zurück. In den 1920er Jahren beimpften Koritschoner, Schweinburg et al. Kaninchen mit humanem ZNS-Gewebe und lösten damit eine Rückenmarksentzündung aus [69]. Wenig später, in den 1930er Jahren, führten Rivers et al. bei Rhesusaffen intramuskuläre Injektionen mit „Gehirnemulsionen“ durch. Von acht Affen erkrankten zwei an einer demyelinisierenden Pathologie des Rückenmarks. Eine Schlussfolgerung, warum die Injektionen zu einer Erkrankung des Nervensystems geführt haben, konnte jedoch nicht gezogen werden [70]. Nach der Erstbeschreibung wurde die EAE bei vielen weiteren Spezies ausgelöst. Es stellte sich allerdings als sehr aufwendig dar, denn die Injektionen mit ZNS-Extrakten mussten repetitiv über einen langen Zeitraum erfolgen, um eine Immunreaktion auszulösen. Abhilfe

schaffte die eher zufällige Entdeckung eines potenten Adjuvans. Jules Freund erkannte, dass Meerschweinchen, die mit in Paraffinöl gelösten Mykobakterien immunisiert wurden, einen hohen Antikörper-Titer aufwiesen [71]. Kombiniert man Paraffinöl mit inaktivierten *Mycobacteria tuberculosis* erhält man Komplettes Freund-Adjuvans (KFA). Kabat et al. zeigten, dass Rhesusaffen bereits nach einer einzigen Injektion von KFA und Hirnextrakten an einer akuten disseminierten Enzephalomyelitis erkrankten [72]. Trotz der Kombination mit KFA war es nach wie vor schwierig, eine EAE bei Mäusen zu induzieren. Erst der Einsatz von Pertussistoxin brachte den erwünschten Durchbruch im murinen EAE-Modell. Durch die Kombination der Immunisierung mit einer oder mehreren Pertussistoxin-Injektionen wurde die Krankheitsinduktion gesteigert und für die EAE anfällige Mausstämme konnten leichter detektiert werden [69, 73].

Bis in die 80er Jahre hinein stand zur Debatte, ob das „A“ in EAE für „allergisch“ oder „autoimmun“ stehen sollte. Ein direkter Beweis für eine autoimmune Kausalität der Enzephalomyelitis war bis dato nicht erbracht. Schuesener et al. vermehrten 1985 T-Zellen von Ratten *in vitro* und präsentierten den Zellen MBP als Antigen. Entsprechend geprimte T-Zellen wurden gesunden Ratten injiziert. Die auf diese Weise behandelten Ratten entwickelten im zeitlichen Verlauf eine EAE. Diese Daten lieferten den Beweis, dass autoreaktive T-Zell Klone im normalen Immunsystem potentiell vorhanden sind. Damit war die Grundlage für die Annahme einer autoimmunen Genese gegeben [69, 74].

Seit Erstbeschreibung der EAE sind diverse EAE-Modelle etabliert worden. Mit der EAE lassen sich viele neuropathologische und immunologische Aspekte der MS im Tiermodell abbilden. Die anfängliche Euphorie und Hoffnung wurden allerdings ein wenig gedämpft. Die MS ist eine komplexe Erkrankung und eine klassische EAE wird nicht alle Bereiche dieser Erkrankung abbilden können. Hinzu kommt, dass der Auslöser, insbesondere das induzierende Antigen, für die MS nicht bekannt ist.

Auch wenn das Forschen an einer EAE gewisse Grenzen aufweist, sollten einige Vorteile nicht unerwähnt bleiben. So ist es beispielsweise kaum möglich, parallel zum Krankheitsverlauf humane Gewebeschnitte von MS-Patienten zu gewinnen

[75]. Ein weiterer unbestreitbarer Vorteil ist, dass anders als bei spontanen Autoimmunprozessen bei der EAE das Antigen, der Zeitpunkt sowie der Ort der Reaktion bekannt sind. Diese Parameter kontrollieren zu können, macht die EAE nicht nur für die Ursachenforschung interessant, sondern auch, um therapeutische Mechanismen besser zu verstehen [76].

1.3.1 MOG

MOG ist ein ZNS-spezifisches Glykoprotein, welches in geringer Konzentration in der äußersten Schicht der Myelinscheiden exprimiert wird [77]. Trotz seiner sehr geringen Konzentration ist es durch seine Lokalisation direkt zugänglich für Autoantikörper und hat ein hohes immunogenes Potential. Die MOG-abhängige EAE löst eine T-Zell abhängige Immunantwort aus. Eine Ausnahme hiervon bildet die Verwendung von humanem MOG (hMOG) bei C57BL/6-Mäusen (B6-Mäuse), nur bei dieser MOG-EAE kommt es zu einer B-Zell abhängigen Immunantwort [78].

Für unser Projekt benötigten wir als Kontroll- bzw. Vergleichsgruppe ein B-Zell unabhängiges EAE Modell. Deshalb entschieden wir uns bewusst für eine MOG Peptid 35-55-induzierte EAE bei B6-Mäusen. Die während der EAE auftretenden ZNS-Läsionen sind geprägt durch Infiltration von CD4⁺ T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten. B-Zellen sind nur selten zu finden [79].

Als weiteres EAE-Modell verwendeten wir in unserer Studie die MP4-induzierte EAE. Als fundamentales Unterscheidungsmerkmal zu der MOG:35-55-induzierten EAE, weist die MP4-EAE eine B-Zell abhängige Immunkomponente und einen komplexeren Krankheitsverlauf auf [79].

1.3.2 MP4

Bei MP4 handelt es sich um ein Fusionsprotein aus MBP und PLP. MBP macht ungefähr 30-40% aller Myelinscheidenproteine aus, PLP hat mit 50% sogar einen noch größeren Anteil [40]. MP4 wurde 1996 von Elliott et al. ursprünglich als potentiell MS-Therapeutikum entwickelt. Hierfür wurde die 21,5-kD-Isoform von MBP (MBP21.5) mit einer gentechnisch veränderten Form von PLP (deltaPLP4) zu einem chimären Fusionsprotein kombiniert. Tatsächlich konnten Elliott et al. zeigen, dass die intravenöse Verabreichung von MP4 bei SJL/J-Mäusen eine von MBP- und PLP-spezifischen T-Zellen induzierte EAE unterdrücken konnte. Allerdings wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass MP4 eine EAE bei SJL/J-Mäusen induzieren kann [80]. Zehn Jahre später konnten Kuerten et al. eine MP4- induzierte EAE bei B6-Mäusen auslösen. Die MP4-abhängige EAE führte bei den Mäusen zu einem frühen Krankheitsbeginn, zu einem dynamischen Krankheitsverlauf und zu einer CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zell-abhängigen Immunreaktion. Des Weiteren konnten in den ZNS-Infiltraten Makrophagen, DZ und Granulozyten nachgewiesen werden. Entscheidend war jedoch, dass dieses Modell auch eine B-Zell-abhängige Komponente aufwies. B-Zellen bildeten Aggregate und organisierten sich im chronischen Stadium der Erkrankung zu lymphfollikelartigen Strukturen, die der Definition von TLOs entsprechen (siehe Kapitel 1.2 Tertiär lymphatische Organe) [76, 79, 81].

1.4 Zusammenfassung

Bereits im Jahre 2012 konnten Kuerten et al. TLOs im ZNS von MP4-immunisierten Mäusen nachweisen. B-Zell-Infiltrate sowie Aggregate konnten bereits im frühen Stadium der EAE nachgewiesen werden, TLOs traten typischerweise erst später, bei der chronischen Form der EAE auf [82]. Die Entwicklung von TLOs in der MS ist ein dynamischer und bisher wenig verstandener Prozess. Zunächst kommt es zu einer diffusen Infiltration von B-Zellen, später zu einfachen Clustern von B- und T-Zellen und abschließend entstehen hoch organisierte Strukturen, die in ihrem Zellrepertoire und dessen

Anordnung SLOs ähneln [65, 66, 82]. Während die ektopen lymphatischen Strukturen (ELS) im MP4-Modell hauptsächlich im Cerebellum zu finden sind, konnten ähnliche Strukturen auch bei Patienten mit SPMS nachgewiesen werden. Hier waren die Strukturen jedoch eher in den Meningen zu finden. Die Präsenz dieser Strukturen war mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert [64, 68]. Die Vermutung liegt also nahe, dass ELS einen aktiven Einfluss auf die Symptomatik und Schwere der MS hat.

Das MP4-Modell sollte also eine geeignete Grundlage bilden, um Schlüsselmechanismen zu detektieren, die an der Bildung und Aufrechterhaltung von B-Zellaggregaten und schließlich auch TLOs beteiligt sind.

Verschieden Moleküle und Zelltypen stehen aktuell in Verdacht, einen Einfluss auf die Bildung von TLOs zu haben. Zu diesen Zelltypen gehören beispielsweise IL-17 sezernierende CD4⁺ T-Helferzellen. Diese Zellen werden von diversen Chemokinen, wie beispielsweise CXCL13 und CCL21, angezogen und akkumulieren in Entzündungsherden, wo es unter anderem durch entzündungsfördernde Mediatoren wie IL-7 und Lymphotoxinen zu einer topografischen Organisation und weiteren Rekrutierung von T- und B-Lymphozyten kommt [62, 83].

Trotz intensiver Forschung sind die genauen Mechanismen, die zur Entwicklung von TLOs führen, noch nicht umfassend bekannt. Eben solche Schlüsselmechanismen sollen im Fokus dieser Arbeit stehen. Hierfür führten wir bei MP4-immunisierten Mäusen eine *Laser Capture Microdissection (LCM)* mit anschließender Gensequenzierung von B-Zell-Aggregaten und Infiltraten durch. Der Vergleich von Infiltraten und Aggregaten gab uns die Möglichkeit, Schlüsselgene zu bestimmen, die in den Entwicklungsprozess von TLOs involviert sind. Um die Rolle der B-Zelle in den Fokus zu setzen und für die TLOs spezifische Mechanismen aufzudecken, verglichen wir die Daten mit ZNS-Infiltraten von MOG:35-55-immunisierten Mäusen. Um etwaige Unterschiede zwischen TLOs und SLOs zu finden, führten wir zusätzlich eine Gensequenzierung von Lymphfollikeln aus Lymphknoten von MP4- und MOG:35-55-immunisierten Mäusen durch und verglichen die Expressionsprofile.

1.5 Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit zwei Themen. Einerseits steht die Methodik im Fokus. Wir versuchten eine Methode zu etablieren, welche es uns ermöglicht, aus Paraffin eingebettetem Gewebe stabile RNA zu isolieren.

Andererseits geht es in dieser Arbeit um Schlüsselgene, die in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von TLOs im MP4-Mausmodell involviert sind. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Entwicklungsstufen von TLOs im MP4-Mausmodell untersucht. Zum einen die diffusen B-Zell-Infiltrate und zum anderen die höher organisierten B-Zell-Aggregate. Als Kontrollgruppe dienten uns ZNS-Infiltrate aus dem B-Zell-unabhängigen MOG:35-55-Modell, außerdem verglichen wir die Expressionsdaten der B-Zell-Infiltrate und -Aggregate mit denen von SLOs, um die für die Entwicklung von TLOs spezifischen Gene herauszufiltern.

Die Fragen dieser Arbeit lassen sich also wie folgt zusammenfassen:

- 1. Ist es möglich, ausreichend stabile und intakte RNA für eine anschließende Gensequenzierung aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE) zu isolieren?**
- 2. Welche Gene waren im Vergleich zu den Kontrollgruppen ausschließlich in B-Zell-Infiltraten hochreguliert?**
- 3. Welche Gene waren im Vergleich zu den Kontrollgruppen ausschließlich in B-Zell-Agregaten hochreguliert?**
- 4. Gibt es Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in den Expressionsprofilen von B-Zell-Agregaten und -Infiltraten?**

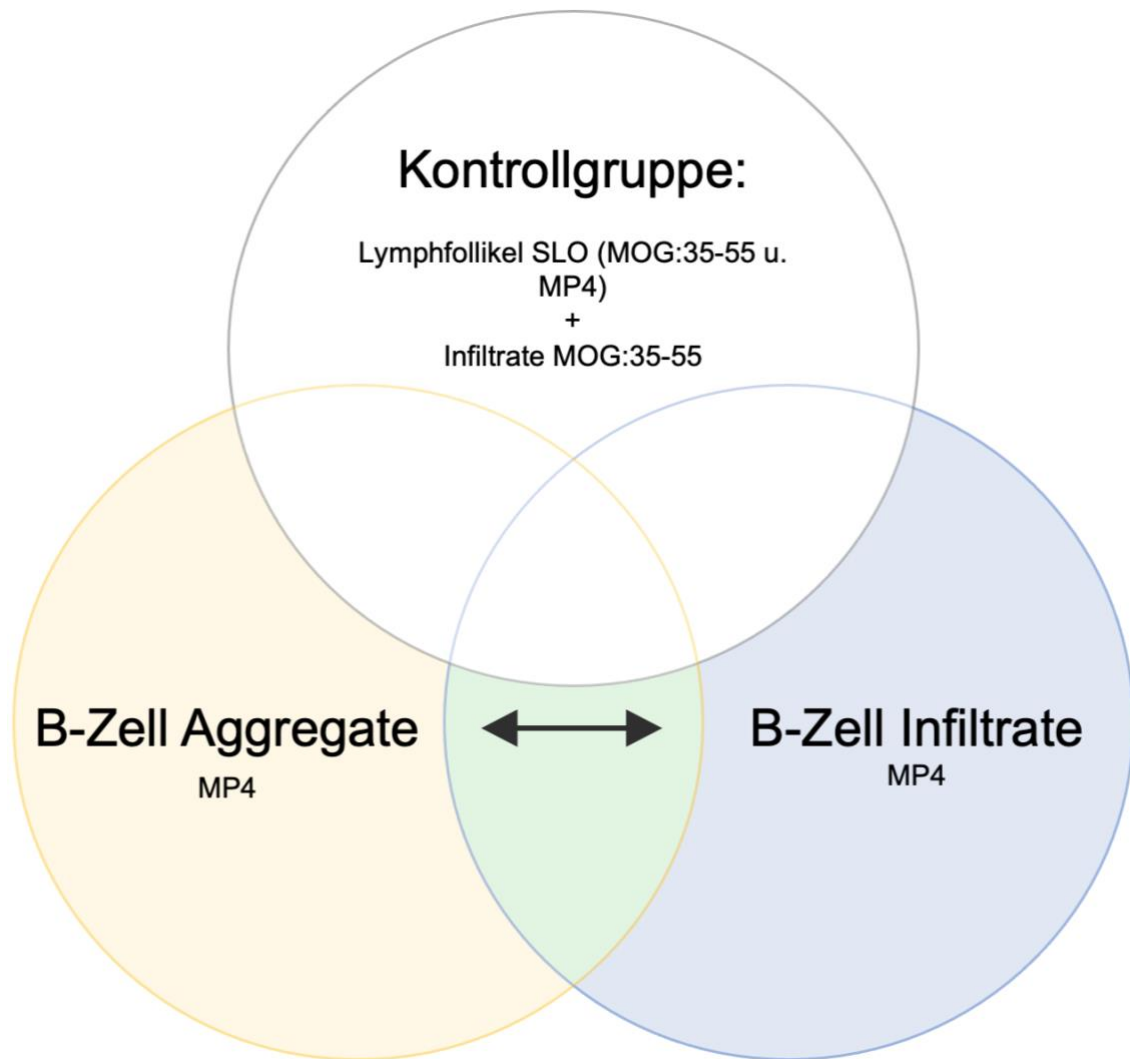


Abbildung 1 Schema – Studiendesign: Die Expressionsprofile der B-Zell-Aggregate (gelb) und -Infiltrate (blau) werden mit denen der Kontrollgruppen (weiß: Lymphfollikel SLO und Infiltrate MOG:35-55) verglichen. Relevant sind die Gene, die ausschließlich in den B-Zell-Aggregaten bzw. Infiltraten hochreguliert sind. Zusätzlich wurden B-Zell-Aggregate und -Infiltrate untereinander verglichen, um gemeinsam exprimierte Gene (grün) zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte/Software

Tabelle 1: Geräte/Software

Geräte/Software	Beschreibung/Hersteller
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator Typ 300/400/500 EP
Gefriermikrotom	Leica CM3050 S Kryostat
ImageJ	Freeware, Version 2.0.0.-rc-54/1.51h
<i>Laser Microdissection LMD</i>	LCM Software (Leica, Version 7.3.1.4552)
<i>LCM Control and Trigger Box</i>	Leica CTR6000
LCM Kamera	Leica DFC310 FX
LCM Mikroskop	Leica LMD6500
<i>LCM Touchscreen</i>	Wacom, LCD Tablet, Model: DTF-720C
Lichtmikroskop	Zeiss Primo Star
Mikrotom	Leica SM 2010R
Sterilisationsschrank	Heraeus, Typ ST 6200

2.1.2 Reagenzien/Kits

Tabelle 2: Reagenzien/Kits

Reagenzien/ Kits	Beschreibung/ Hersteller
Aluminiumsulfate-18-hydrate 5%	Sigma-Aldrich; Kat. # 11044
Aqua Poly/Mount	Polysciences, Inc., Kat. # 18606
Avidin-Biotinkomplex	Vectastain® ABC Kit, Peroxidase Standard, Vector Laboratories; Kat. # PK-4000

Chloroform	AppliChem, Kat. # A1585,2500
Cresylviolett-Acetat	Sigma-Aldrich; Kat. # C5042
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories; Kat. # SK-4100
DEPC (Diethyldicarbonat)	Carl Roth GmbH, Kat. # K028.2
DePex	Serva, Heidelberg, Germany, Kat. #18243.02
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH, Kat. # 3738.4
Ethanol	Carl Roth GmbH, Kat. # 9065.4
<i>FrameSlides</i> Objektträger	Leica; MicroDissect GmbH, Herborn, Deutschland; Kat. Nr. 11505190
<i>High Pure FFPE RNA Micro Kit</i>	Roche, REF # 04823125001
<i>Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect</i>	<i>HOPE Starter Kit</i> , DCS LabLine, Hamburg, Deutschland, Kat. # HL007R010
Kernechtrot	Merck, Darmstadt, Germany; Kat. # 5189
Mannitol Monooleat	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA; Kat. # M8819
Methanol	PanReac, AppliChem, Kat. # 131091.1212
MOG:35-55	AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA; Kat. # AS-60130-1
MP4	Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT, USA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37 Ra	Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA; Cat # 231141
Normales Ziegenserum	NGS; Sigma-Aldrich; Kat. # G9023
NucleoSpin® totalRNA FFPE XS	MACHEREY-NAGEL, REF # 740969.10
Paraffin	Histosec® Pastillen, MERCK
Paraffinöl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Kat. # 18512
Paraffin (niedrigschmelzend)	DCS LabLine, Hamburg, Deutschland, Kat. # PL003S200
<i>Phosphate buffered saline</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Pertussitoxin	ListBiological Laboratories, Hornby, ONT, Kanada; Cat # 181
Paraformaldehyd	AppliChem, St. Louis, MO, USA
<i>RNeasy® Micro Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland; Kat. # 74004
Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex	Vector Laboratories
SuperFrost® Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific; Kat # J1810AMNT
Tissue-Tek®	Sakura, Torrance, CA, USA; Kat. # 4583
<i>Vector Blue Substrat Kit</i>	Vector Laboratories

2.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

Antikörper	Beschreibung/Hersteller
B220 Ratte Anti-Maus	Thermo Fisher Scientific; Cat # 14-0452-81
CD3 Kaninchen Anti-Maus	abcam, Cambridge, UK; Kat. # ab21703
Ziege Anti-Kaninchen biot	Vector Laboratories; Maraval LifeSciences, Burlingame, CA, USA
Ziege Anti-Ratte IgG	Vector Laboratories; Maraval LifeSciences, Burlingame, CA, USA; Cat # BA-9400

2.2 Methoden

Das Ziel der im Folgenden beschriebenen Methoden war die Isolation von stabiler RNA. Während im Rahmen der Etablierung einzelne Parameter in den Schritten von der immunisierten Maus bis zur fertig isolierten RNA angepasst wurden, änderte sich das grundlegende Arbeitsschema nicht (siehe unten: Abbildung 2).

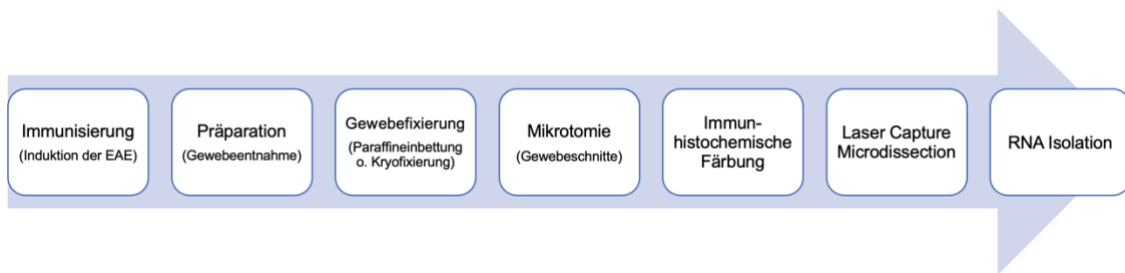


Abbildung 2 Arbeitsschema: RNA-Isolation

2.2.1 Hygiene

Um während des Prozesses, von der Präparation bis zur fertig isolierten RNA, Schäden an der RNA möglichst gering zu halten und insbesondere die Kontamination mit RNasen zu vermeiden, waren besonders hohe hygienische Anforderungen von Nöten. Grundsätzlich kommen für die Kontamination vier verschiedene Ursachen in Betracht.

1. Gewebeeigene RNasen

Um die Aktivität der gewebeeigenen RNasen möglichst gering zu halten, wurden alle Proben direkt nach der Präparation bei -80°C gelagert. Eine ausreichende Kühlung der Proben musste auch während der Verarbeitung (wie z. B. bei der Mikrotomie oder LCM) gewährleistet werden. Hierfür wurde das Gewebe zwischen den Arbeitsschritten auf Trockeneis gelagert.

2. Kontamination durch den Arbeitsplatz

Alle Flächen und Gerätschaften wurden vor der Benutzung zweimalig mit 1M NaOH gereinigt. Bei Geräten oder Flächen, die gegenüber NaOH nicht resistent waren, wurde auf ein Gemisch von 70% Ethanol (Carl Roth GmbH, Kat. # 9065.4) und 30% DEPC-Wasser zurückgegriffen. Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde ein Liter destilliertes Wasser mit 1 ml Diethyldicarbonat (DEPC, Carl Roth GmbH, Kat. # K028.2) versetzt und anschließend autoklaviert (Varioklav Dampfsterilisator Typ 300/400/500 EP).

3. Kontamination durch Werkzeuge und Aufbewahrungsbehältnisse

Um die RNasen auf Werkzeugen und Aufbewahrungsbehältnissen zu beseitigen, standen zwei Verfahren zur Verfügung. Hitzestabile Gegenstände, wie z.B. Präparationsbesteck, Kryotomklingen oder Glasküvetten, wurden im Sterilisationsschrank (Heraeus, Typ ST 6200) für mindestens drei Stunden einer Temperatur von über 300 °C ausgesetzt. Hitzesensible Gegenstände, wie beispielsweise Kunststoffboxen oder Probengefäße, wurden in ein Gemisch aus 1 L Wasser und 1 ml DEPC eingelegt und anschließend autoklaviert.

4. Kontamination durch Personen

Um Kontaminationen zu verringern, mussten alle Personen, die an der Verarbeitung der Proben beteiligt waren, zusätzlich zur obligaten Laborausstattung (Kittel, Handschutz etc.), einen Mundschutz tragen. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass während der Versuche Fenster und Türen geschlossen gehalten wurden und die Kommunikation sich auf das Nötigste beschränkte.

2.2.2 Mäuse

Für die Versuche wurden weibliche B6-Mäuse von Janvier Labs (Frankreich) erworben. Die Mäuse wurden im Tierstall des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kiefergesundheit der Universität Würzburg unter spezifisch-pathogenfreien Kautelen in separat ventilierten Käfigen gehalten.

Ein künstlicher Tag-Nachtrhythmus wurde durch jeweils 12-stündige Hell- und Dunkelphasen simuliert. Die Ernährung erfolgte mit pathogenfreiem Standardnagetierfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und autoklaviertem Wasser. Bei Mäusen, bei denen aufgrund der induzierten EAE Lähmungserscheinungen auftraten, wurde die Nahrung sowie das Wasser am Boden bereitgestellt. Insgesamt wurden 38 Mäuse in der Studie verwendet.

Die Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt (Genehmigungsnummer 55.2-2532.01-91/14). Sie wurden unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und entsprachen den „*Principles of laboratory animal care*“ (NIH Publikation Nummer 86–23, überarbeitete Version von 1985) sowie den ARRIVE-Richtlinien (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*).

2.2.3 Induktion und klinische Bewertung der EAE

Für die Versuche wurden die Mäuse mit MP4 (Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT, USA) immunisiert. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus MBP und PLP. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit MOG:35-55 (AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA; Kat. # AS-60130-1) immunisiert.

Für die Immunisierung mit MP4 wurde zunächst inkomplettes Freund-Adjuvans hergestellt. Hierfür wurden Paraffinöl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Kat. # 18512) und Mannitol Monooleat (Sigma-Aldrich; Kat. # M8819) im Verhältnis 9:1 gemischt. Anschließend wurde das inkomplette Freund-Adjuvans durch Zugabe von 5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA; Cat # 231141) zu KFA vervollständigt. 200 µg MP4 wurden in 200 µl KFA emulgiert. Daraufhin wurden die Mäuse immunisiert, indem ihnen subkutan, seitlich in beide Flanken, eine Gesamtdosis von 200 µg MP4 appliziert wurde. Zusätzlich wurde den Tieren am Tag nach der Immunisierung, sowie 48 Stunden später, jeweils 200 ng Pertussistoxin (List Biological Laboratories, Hornby, ONT, Canada; Cat # 181) intraperitoneal injiziert.

Für die Immunisierung mit MOG:35-55 wurde MOG:35-55 (AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA; Kat. # AS-60130-1) in KFA emulgiert und die Mäuse mit einer Gesamtdosis von 100 µg MOG:35-55 pro Maus immunisiert.

2.2.3.1 Scoring

Zur klinischen Beurteilung wurden die Tiere täglich nach dem standardisierten EAE-Score beurteilt: (0) keine Krankheitszeichen, (1) Parese des Schwanzes, (2) Parese der Hinterläufe, (3) Plegie der Hinterläufe, (4) Tetraplegie, (5) Tod. Mäuse, die zwischen der definierten numerischen Klassifikation lagen, wurden mit einer Abstufung von 0,25 präziser bewertet. Nach unseren Vorgaben mussten Mäuse, welche ein Scoring von mehr als 3 aufwiesen, euthanasiert werden.

2.2.4 Gewebeentnahme

Zunächst wurden die Mäuse mittels CO₂ euthanasiert, anschließend erfolgte die Präparation. Hierfür wurde die Kopfhaut mit einer feinen Schere und Pinzette in der medianen Sagittalebene von occipital her durchtrennt. Die Kopfhaut wurde stumpf von der Schädeldecke abgelöst. Daraufhin wurde die Kalotte an der hinteren Schädelgrube mit einer spitzen Schere und einer Pinzette aufgebrochen und das Kleinhirn freipräpariert. Sobald das Kleinhirn komplett einsehbar war, konnten die *Pedunculi cerebellaris* durchtrennt werden und das Kleinhirn wurde entnommen.

Für die Präparation der Lymphknoten wurde das Abdomen zunächst von ventral medial eröffnet. Diese Schnittführung ermöglichte auch die Entnahme von weiteren Organen (wie z.B. Milz, Leber etc.). Von der medialen Laparotomie aus konnte nach kaudal inguinal weiterpräpariert werden, bis die inguinalen Lymphknoten in der Leistenregion auffindig gemacht wurden. Die Lymphknoten beider Seiten wurden mittels Schere herausgetrennt und anschließend von umgebendem Fett- sowie Bindegewebe befreit.

2.2.5 Gewebefixierung

2.2.5.1 PFA (*Paraformaldehyd*)

Nach der Euthanasie wurden die Mäuse zunächst transkardial mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, Sigma-Aldrich) und anschließend mit 4% PFA (AppliChem, St. Louis, MO, USA) perfundiert. Daraufhin konnten die gewünschten Organe nach oben beschriebenem Schema entnommen werden. Die Organe wurden über Nacht in 4% PFA immersionsfixiert. Am Folgetag wurden die Proben für drei Stunden in PBS überführt, um anschließend in einer, in der Konzentration aufsteigenden, Ethanol- und Xylol-Reihe dehydriert zu werden. Für weitere dreieinhalb Stunden wurde das Gewebe in 58 °C warmem Paraffin (Histosec® Pastillen, MERCK) gelagert, um abschließend in Paraffinblöcke gegossen zu werden.

2.2.5.2 *Methacarn*

Bei Methacarn handelt es sich um ein Gemisch aus 60% Methanol (PanReac, AppliChem Kat. # 131091.1212), 30% Chloroform (AppliChem, Kat. # A1585,2500) und 10% Essigsäure (Carl Roth GmbH, Kat. # 3738.4). Nach der erfolgten Euthanasie der Maus und der Entnahme der Organe, wurden diese umgehend für zwei Stunden in 4 °C kaltem Methacarn immersionsfixiert. Anschließend erfolgte eine Lagerung bei gleicher Temperatur in 99,5% Ethanol für weitere drei Stunden. Für die Einbettung wurden die Organe für vier Stunden in 60 °C warmes Paraffin überführt, um abschließend in Blöcke gegossen zu werden.

2.2.5.3 *HOPE*

Die Fixierung in *Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect* (HOPE, HOPE Starter Kit, DCS Labline, Hamburg, Deutschland, Kat. # HL007R010) erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Die zuvor präparierten und

entnommenen Organe wurden zunächst für 12-72 Stunden in HOPE I Fixierlösung immersionsfixiert und für weitere zwei Stunden in HOPE II Lösungsansatz gelagert. Anschließend wurde das Gewebe bei 54,5 °C über Nacht in niedrigschmelzendes Paraffin (DCS LabLine, Hamburg, Germany, Kat. # PL003S200) überführt und abschließend in normalschmelzendem Paraffin in Blöcke gegossen.

2.2.5.4 Kryofixierung

Nach der Präparation des Gewebes konnten die Lymphknoten sowie das Kleinhirn separat in Polyethylen Probenbehälter überführt werden, welche zuvor mit Tissue-Tek® (Sakura, Torrance, CA, USA; Kat. # 4583) befüllt wurden. Hierbei war darauf zu achten, dass das Gewebe vollständig von Tissue-Tek® umgeben war. Anschließend wurden die gefüllten Probengefäße für circa 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.6 Mikrotomie

2.2.6.1 Schneiden am Mikrotom

Zunächst wurden die Paraffinblöcke in das Mikrotom (Leica SM 2010R) eingespannt. Überschüssiges Paraffin wurde in groben Schnitten abgetragen. Sobald es zum Anschnitt des Gewebes kam, konnte eine Schnittdicke von 10 µm eingestellt werden. Nun wurde circa alle 100 µm, also nach jedem zehnten Schnitt, eine Kontrollfärbung mittels 1%iger Cresylviolett-Acetatlösung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.7 Cresyl Violett Färbung) und sofort unter dem Mikroskop betrachtet. Konnte eine gewünschte Struktur ausgemacht werden (B-Zell- Aggregate oder Infiltrate bei Cerebellum sowie Follikel bei Lymphknoten), wurden die folgenden zwei Schnitte in einer Schnittstärke von 4 µm abgetragen und für eine anschließende immunhistochemische (IHC) Kontroll- sowie Parallelfärbung auf einen SuperFrost® Plus Objektträger (Thermo Fisher

Scientific; Cat # J1810AMNT) aufgezo-gen. Die darauf folgenden vier bis fünf Schnitte à 10 µm wurden auf FrameSlides (Leica; MicroDissect GmbH, Herborn, Deutschland; Kat. Nr. 11505190) platziert. Dafür wurden die Gewebeschnitte zunächst in ein warmes Wasserbad überführt. Die an der Oberfläche schwimmenden Schnitte konnten auf die FrameSlides bzw. auf den Superfrost® Objektträger (OT) aufgezo-gen werden. Abschließend wurden die OTs bis zur weiteren LCM bzw. IHC-Färbung bei -80 °C gelagert.



Abbildung 3 Anordnung der Gewebeschnitte auf den OTs: Zunächst wurde für die IHC-Färbung ein Kontrollschnitt auf den Super Frost OT aufgezo-gen. Der Schnitt 1 wurde einer IHC Färbung unterzo-gen. Dieser diente als Orientierungshilfe für die Parallelschnitte (2-5) die im Verlauf einer LCM zugeführt wurden. Nach vier bis fünf Parallelschnitten wurde wieder ein Schnitt für die IHC verwendet (6) gefolgt von weiteren Parallelschnitten (7-10). Nach diesem Schema wurden die Kleinhirne systematisch nach Infiltraten durchsucht.

2.2.6.2 Schneiden am Gefriermikrotom

Zu Beginn wurde auf den Probenhalter des Gefriermikrotoms (Leica CM3050 S Kryostaten) eine geringe Menge flüssiges Tissue-Tek® gegeben, anschließend wurde das in Tissue-Tek® eingebettete und zu schneidende Gewebe aus dem Probenbehälter entnommen und auf dem Probenhalter platziert. Das Gefrieren des flüssigen Tissue-Tek® durch die gefrorene Probe führte zu einem sofortigen und stabilen Anhaften der Probe an dem Probenhalter. Daraufhin wurde der Probenhalter in den Leica CM3050 S Kryostaten eingespannt. Zunächst konnte in groben Schnitten bis auf das Gewebe hinuntergeschnitten werden. Sobald es zum Anschnitt des Gewebes kam, wurde eine Schnittdicke von 10 µm eingestellt. Das anschließende Übertragen der Schnitte erfolgte nach dem gleichen Schema wie unter „2.2.6.1 Schneiden am Mikrotom“ beschrieben. Auf das zwischenzeitliche Übertragen der Schnitte in ein Wasserbad konnte jedoch verzichtet werden. Die Kryoschnitte ließen sich mittels eines feinen Pinsels direkt auf die OTs aufziehen. Abschließend wurden die OTs bis zur weiteren LCM bzw. IHC-Färbung bei -80 °C gelagert.

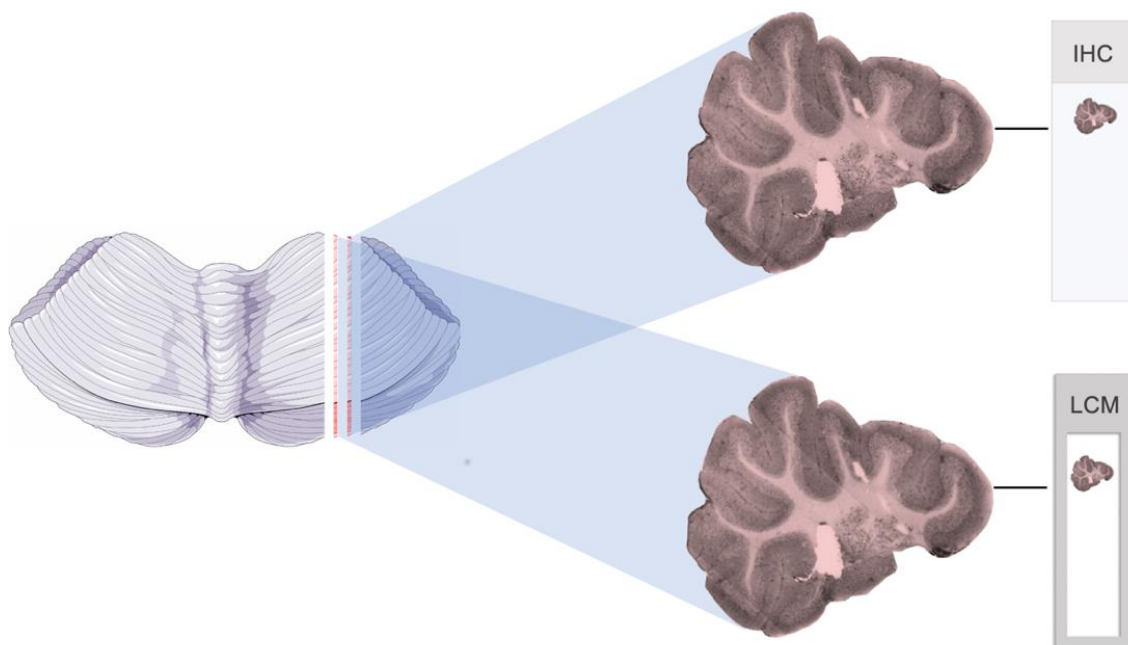


Abbildung 4 Schnittführung: Hier wird das System der Parallelschnitte verdeutlicht. Die Schnitte für die IHC und LCM liegen topografisch exakt nebeneinander. Dies war essenziell, um ELs die in der IHC auftauchten, den ELs in der späteren LCM zuordnen zu können und eine Kategorisierung in B-Zell-Infiltrat bzw. -Aggregat möglich zu machen.

2.2.7 Cresyl Violet Färbung

Die Cresyl Violet Färbung zeichnet sich durch ein sehr schnelles Färbeergebnis und gute Kontrastierung des Gewebes aus. Deshalb kam sie während des Schneidens am Mikrotom bzw. Kryostat zum Einsatz, um potenzielle Strukturen mit B- bzw. T-Zellansammlungen auffindig zu machen. Außerdem wurde jeder Schnitt vor der LCM einer Cresyl Violet Färbung unterzogen, um die Übersicht im Gewebe zu erleichtern und vor allem, um einen Abgleich mit den Parallelschnitten aus der IHC zu erleichtern.

Für die Cresyl Violet Färbung musste zunächst eine Färbelösung hergestellt werden. Hierfür wurden mit DEPC behandeltes Wasser und Ethanol in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und anschließend 1 g Cresylviolet-Acetat (Sigma-Aldrich; Kat. # C5042) in 100 ml des Wasser-Ethanolgemisches unter Rühren über Nacht gelöst. Am Folgetag konnte die Lösung über einen Papierfilter von größeren, nicht löslichen Partikeln befreit werden.

Für die Färbung von Paraffin-eingebettetem Gewebe mussten die Schnitte zunächst in einer absteigenden Xylol- und Ethanolreihe entparaffiniert werden.

Der anschließende Ablauf war für Paraffin- und Kryoschnitte identisch:

Die OTs wurden für zwei Minuten in 70% Ethanol platziert. Nachdem die OTs anschließend für 30 Sekunden in der Cresylviolettlösung gefärbt wurden, wurden die Schnitte kurzzeitig in 70% Ethanol und abschließend in 100% Ethanol getaucht. Vor der Betrachtung unter dem Mikroskop mussten die Schnitte noch circa zwei Minuten bei Raumtemperatur trocknen.

2.2.8 Immunhistochemische Färbung

Für die Paraffinschnitte wurde eine kombinierte B- und T-Zellfärbung angewendet.

Bei den Kryoschnitten wurde zwischen Gewebe aus MOG:35-55 immunisierten Mäusen und Gewebe aus MP4-immunisierten Mäusen unterschieden. Das

MOG:35-55-Gewebe wurde einer CD3 T-Zell Färbung unterzogen, das MP4 Gewebe wurde mit einer B220 B-Zellfärbung gefärbt.

Die auf SuperFrost® Plus OTs aufgezogenen Schnitte lagen räumlich direkt vor den Folgeschnitten, welche, wie im Kapitel „2.2.6 Mikrotomie“ beschrieben, auf FrameSlides aufgezogen wurden. Die IHC-Färbung ermöglichte es uns somit, nicht nur zwischen B-Zell-Infiltraten und Aggregaten sowie T-Zell Infiltraten zu differenzieren, sondern auch auf deren ungefähre Lokalisierung in den darauffolgenden Schnitten zu schließen. Dies war als räumliche Orientierungshilfe für die spätere LCM unabdingbar.

Auf jedem OT befanden sich insgesamt drei Gewebeschnitte, wobei der erste Schnitt als Negativkontrolle diente.

Während der gesamten IHC-Färbung wurden Waschschriffe in PBS-Puffer zwischen den einzelnen Arbeitsschritten durchgeführt.

2.2.8.1 IHC-Färbung an Paraffinschnitten

2.2.8.1.1 Kombinierte B- und T-Zellfärbung

Zu Beginn wurden die Schnitte in einer absteigenden Xylol- und Ethanolreihe entparaffiniert. Daraufhin wurde das Gewebe unter Abdunkelung für 10 Minuten einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2) ausgesetzt, um die endogene Peroxidase zu hemmen. Es folgte eine saure Demaskierung der Oberflächenepitope. Hierfür wurden die OTs in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) platziert und mehrmals aufgeköcht. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, wurde normales Ziegenserum (NGS; Sigma-Aldrich; Kat. # G9023) in einer Konzentration von 5% in PBS gelöst und auf den Schnitt pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der Inkubation konnte der Primärantikörper aufgetragen werden. Hierfür wurde zunächst NGS in einer Konzentration von 1% in PBS gelöst und daraufhin Ratte Anti-Maus B220 Antikörper (Thermo Fisher Scientific; Cat # 14-0452-81) in einer Verdünnung von 1:500 hinzugegeben. Die

Schnitte wurden mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, wobei darauf zu achten war, dass der Kontrollschnitt lediglich mit 1% NGS/PBS inkubiert wurde. Am darauffolgenden Tag konnte der Sekundärantikörper aufgetragen werden. Hierbei handelte es sich um einen Ziege Anti-Ratten IgG Antikörper (Vector Laboratories; Maraval LifeSciences, Burlingame, CA, USA; Cat # BA-9400), welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist und in einer Konzentration von 1:250 aufgetragen wurde. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten, ebenfalls bei Raumtemperatur im Dunkeln, dem Avidin-Biotinkomplex (Vectastain® ABC Kit, Peroxidase Standard, Vector Laboratories; Cat # PK-4000) ausgesetzt. Die abschließende Färbeentwicklung erfolgte mittels Diaminobenzidin (DAB) Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories; Cat # SK-4100), welches direkt auf die Schnitte pipettiert wurde. Die Färbereaktion wurde laufend unter einem Zeiss Primo Star Lichtmikroskop kontrolliert. Bei gewünschtem Ergebnis konnte die Färbereaktion durch Eintauchen der OTs in PBS gestoppt werden.

Daraufhin konnte die Zweitfärbung für CD3 durchgeführt werden. Hierfür wurde als Primärantikörper ein Kaninchen Anti-Maus CD3 Antikörper (abcam, Cambridge, UK; Kat. # ab21703) in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Als Sekundärantikörper verwendeten wir Ziege Anti-Kaninchen biot. Antikörper (Vector Laboratories; Maraval LifeSciences, Burlingame, CA, USA) in einer Konzentration von 1:250. Die Entwicklung erfolgte mit einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Vector Laboratories) in einer Konzentration von 1:500 und dem Vector Blue Substrat Kit (Vector Laboratories). Vor der abschließenden Eindeckung der Proben in Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc., Kat. # 18606) wurde das Gewebe mit 0,1% Kernechtrot (Merck, Darmstadt, Germany; Cat # 5189) gelöst in 5% Aluminiumsulfate-18-Hydrat (Sigma-Aldrich; Cat # 11044) gegengefärbt.

2.2.8.2 IHC-Färbung an Kryoschnitten

2.2.8.2.1 B-Zell-Färbung

Die IHC der Kryoschnitte folgte einem ähnlichen Protokoll wie die der Paraffinschnitte. Zunächst wurden die Schnitte zwei Stunden lang bei Raumtemperatur getrocknet, um anschließend unter lichtgeschützten Bedingungen in 4% PFA fixiert zu werden. Auf eine Entparaffinierung sowie eine saure Demaskierung konnte verzichtet werden. Es folgte ein endogener Peroxidase-Block und anschließend eine Blockierung unspezifischer Bindungen mittels 5%igem Ziegen Serum. Als Erstantikörper wurde Ratte Anti-Maus B220 Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 verwendet, die Gegenreaktion erfolgte über den Ziege Anti-Ratte IgG Antikörper in einer Konzentration von 1:500. Für die Entwicklung der Färbung wurde ebenfalls der Avidin-Biotinkomplex und das DAB Peroxidase Substrate Kit verwendet. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanol- und Xylolreihe dehydriert, mit 0,1% Kernechtrot gegengefärbt und abschließend in DePex (Serva, Heidelberg, Germany; Cat # 18243.02) eingedeckt.

2.2.8.2.2 T-Zell-Färbung

Für die CD3 T-Zellfärbung wurde als Primärantikörper ein Kaninchen Anti-Maus CD3 Antikörper in einer Konzentration von 1:400 verwendet. Als Sekundärantikörper verwendeten wir Ziege Anti-Kaninchen biot. Antikörper in einer Konzentration von 1:500.

Die Entwicklung erfolgte mit einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex in einer Konzentration von 1:500 und dem Vector Blue Substrat Kit. Ebenfalls wurde eine Gegenfärbung mit 0,1% Kernechtrot durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte mit Aqua Poly/Mount eingedeckt.

2.2.9 Etablierung IHC

Da die IHC-Färbung an Paraffin eingebettetem Gewebe ein gängiges Verfahren in unserer Arbeitsgruppe ist, konnten die Färbeprotokolle übernommen werden. Die Qualität und Aussagekraft waren von vornherein ausreichend. Bei den Färbungen an den Kryoschnitten mussten die Protokolle aufgrund von schlechten Ergebnissen, wie z.B. starker Hintergrundfärbung oder unspezifischen Färbungen, angepasst werden.

2.2.9.1 Fixierung

Zunächst betrachteten wir die Fixiermethode des Gewebes näher. Hierfür wurde Gewebe in einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton (Carl Roth GmbH, Kat. # 5025.5) bei -20°C für 10 Minuten fixiert. Als Kontrolle wurde nach dem bisherigen Verfahren mit 4% PFA fixiert. Die anschließende Färbung erfolgte nach gängigem Protokoll. Aufgrund des besseren Endergebnisses hat sich die konventionelle Fixiermethode mit PFA durchgesetzt.

2.2.9.2 Antikörperkonzentrationen

Ebenfalls musste die richtige Antikörperkonzentration etabliert werden. Hierfür haben wir bei der B- und T-Zellfärbung verschiedene Konzentrationen von Erst- und Zweitantikörpern getestet. Bei der B-Zellfärbung stellten sich die besten Färbeergebnisse bei einer Konzentration von 1:1000 beim Erstantikörper und 1:500 beim Zweitantikörper ein (siehe Tabelle 4: Etablierung der B-Zell Färbung - Antikörperkonzentrationen). Bei der T-Zellfärbung zeigten sich zunächst gute Ergebnisse bei einer Konzentration von 1:400 beim Erstantikörper und 1:1000 beim Zweitantikörper (siehe Tabelle 5: Etablierung der T-Zell Färbung - Antikörperkonzentrationen). Später musste die Konzentration des Zweitantikörpers jedoch auf 1:500 angepasst werden, da wir eine neue Charge des Antikörpers mit veränderten Eigenschaften erhielten.

Tabelle 4: Etablierung der B-Zell Färbung - Antikörperkonzentrationen

Objektträger	Konz. 1 AK B220	Konz. 2 AK gart biot
1	1:500	1:250
2	1:500	1:500
3	1:500	1:1000
4	1:1000	1:250
5	1:1000	1:500
6	1:1000	1:1000

Gelb markiert: Konzentration mit dem besten Färberesultat

Tabelle 5: Etablierung der T-Zell Färbung - Antikörperkonzentrationen

Objektträger	Konz. 1 AK CD3	Konz. 2 AK garb biot
1	1:400	1:500
2	1:200	1:500
3	1:100	1:500
4	1:400	1:1000
5	1:200	1:1000
6	1:100	1:1000

Gelb markiert: Konzentration mit dem besten Färberesultat

2.2.10 Laser Capture Microdissection

Insgesamt wurden drei LCM *Sessions* durchgeführt. Die erste galt der RNA-Sequenzierung mit abschließender Erstellung einer *Heatmap*, dabei handelt es sich um eine Visualisierung, welche die Genexpressionsdaten in übersichtlicher Form wiedergibt (siehe Kapitel 3.5.2 Heatmap). Die zweite *Session* diente ebenfalls der Erstellung einer *Heatmap* zur Bestätigung der ersten *Session*. Die RNA der dritten *Session* wurde für eine qPCR verwendet, um die in *Session* eins und zwei detektierten Gene zu bestätigen.

Vor Beginn der LCM wurden die auf FrameSlides gezogenen Gewebeschnitte zunächst einer Cresyl Violett Färbung unterzogen (siehe Kapitel 2.2.7 Cresyl Violett Färbung). Die gefärbten Objektträger wurden anschließend in das LCM-Mikroskop- und Lasersystem eingelegt. Hierbei handelte es sich um eine funktionelle Einheit, bestehend aus dem Mikroskop (Leica LMD6500), einer Kamera (Leica DFC310 FX) und einer externen *Control and Trigger Box* (Leica CTR6000). Am Computer konnte das LCM System über die Software *Laser*

Microdissection LMD (Leica, Version 7.3.1.4552) konfiguriert und gesteuert werden. Vor Beginn der eigentlichen Dissektion war es von Nöten, den Laser zu kalibrieren, sowie dessen Breite und Intensität einzustellen. Sobald der Laser den Anforderungen entsprechend angepasst war, konnte mit der Dissektion begonnen werden. Das Bild der Mikroskopkamera (Leica DFC310 FX) wurde auf einen *Touchscreen* (Wacom, LCD Tablet, Model: DTF-720C) übertragen. Hier konnten die Zielstrukturen, also B-Zell-Aggregate und Infiltrate der Kleinhirne sowie B-Zell Follikel der Lymphknoten, mittels *Touchpen* (Wacom) zirkulär eingezeichnet werden. Die anschließende LCM wurde nach einem Startbefehl automatisch vom Mikroskop- und Lasersystem durchgeführt. Die ausgeschnittenen Proben fielen daraufhin in ein dafür vorgesehenes Auffangbehältnis und konnten anschließend auf Trockeneis zwischengelagert werden. Um für jede Probe vergleichbare Mengen Gewebe zu sammeln, wurden für jede Probe circa $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ Fläche ausgeschnitten und deren RNA anschließend separat isoliert.

Während der LCM dienten die zuvor angefertigten IHC-Färbungen der Parallelschnitte als Orientierungshilfe. Hierfür wurden die Schnitte zunächst in zehnfacher Vergrößerung fotografiert. Bei Schnitten, die bei einer zehnfachen Vergrößerung nicht komplett abgelichtet werden konnten, wurden mehrere Einzelfotos aufgenommen und diese dann später mit dem Programm ImageJ (Version 2.0.0.-rc-54/1.51h) und dem Unterbefehl MosaicJ zu einem zusammenhängenden Bild fusioniert.

2.2.11 RNA-Isolation

Für die RNA Isolation aus Paraffin eingebettetem Gewebe verglichen wir zunächst zwei verschiedene Kits. Zum einen das NucleoSpin® totalRNA FFPE XS (MACHEREY-NAGEL, REF # 740969.10) und zum anderen das High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche, REF # 04823125001). Aufgrund der höheren RNA-Ausbeute entschieden wir uns letztlich für das Kit der Firma Roche.

Für die Isolation des Kryogewebes verwendeten wir das RNeasy® Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland; Kat. # 74004).

Bei allen Kits wurde die RNA nach einem ähnlichen Schema gewonnen. Bei den RNA-Isolationen aus Paraffin-eingebettetem Gewebe erfolgte zuerst eine Entparaffinierung der Proben. Dieser Schritt entfiel bei der Isolation des Kryogewebes.

Anschließend wurden die Proben lysiert und homogenisiert. Die Proben wurden dann auf eine spezielle, mit einer Membran versehene, Säule pipettiert. Die Membran führte zu einer Anhaftung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA), die ungewünschte DNA wurde über eine DNase fragmentiert und mittels Pufferlösung ausgewaschen. Abschließend konnte die RNA mittels RNase freiem Wasser eluiert und abzentrifugiert werden. Das RNA haltige Zentrifugat wurde in Eppendorfgefäßen aufgefangen und umgehend bei -80°C gelagert.

2.2.12 Gensequenzierung

Die Gensequenzierung bzw. Genexpressionsanalyse wurde durch die *Core Unit Systems Medicine* (CU SysMed) an der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg durchgeführt.

Zunächst konnte die Qualität und Quantität der RNA Proben mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) bestimmt werden. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proben und die Umschreibung der hierdurch isolierten Poly-A-RNA in cDNA. Unter Verwendung des TruSeq stranded mRNA Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) konnten die cDNA Stränge mit Illumina Adaptern verknüpft werden. Die hierdurch ermöglichte Sequenzierung erfolgte auf einem NextSeq 500 (Illumina) in einer 75-nt Single-End-Einstellung mit einem *High-Output Run Mode*. Die ermittelten *Reads* konnten mit FastQC 0.11.6 auf ihre Anzahl der Duplikate, Qualität sowie Adaptersequenzen überprüft werden. Ebendiese Adaptersequenzen konnten unter Zuhilfenahme von cutadapt (Version 1.16) ermittelt und abgespalten werden. Mit Hilfe der *Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) software* (Version-2.5.2b) konnten die Sequenzen auf dem Mausgenom abgebildet werden, wobei die Übereinstimmung zwischen 81% und 83% lag. Die

hierfür benötigten Genom- und Annotationsdateien wurden aus GENCODE (Juli 2017, GRCm38.p5, M16) entnommen. Sequenzen, die auf bestimmte Gene ausgerichtet waren, konnten mit dem Unterbefehl `intersect` (Version 2.15.0) von `bedtools` quantifiziert werden. Die Identifizierung differentiell exprimierter Gene erfolgte mittels DESeq2 (Version 1.16.1). Zum Vergleich der einzelnen Gruppen (B-Zell-Infiltrate, Aggregate usw.) wurden jeweils *Heatmaps* erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der RNA-Isolation

Das Ziel der Etablierung war es, eine möglichst intakte RNA zu isolieren. Des Weiteren sollte das Verfahren unempfindlich gegenüber Fehlern sein und gleichbleibend stabile Ergebnisse liefern.

Die qualitative Einordnung der verschiedenen Verfahren erfolgte in Abhängigkeit von der RNA Integritätsnummer (RIN). Hierbei handelt es sich um einen numerischen Wert, welcher über einen standardisierten Algorithmus ermittelt wird. Der Wert kann zwischen 1 und 10 liegen. Eine RIN von 1 steht für eine maximal degradierte und fragmentierte RNA, eine RIN von 10 steht hingegen für eine intakte nicht fragmentierte RNA [84]. Die Analyse der RNA wurde von der Core Unit Systemmedizin der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg mittels Bioanalyzer 2100 durchgeführt.

Insgesamt wurden fünf Versuchsreihen mit SLOs aus immunisierten B6-Mäusen durchgeführt. Bei der ersten Versuchsreihe sollte aus FFPE nach dem gängigen Schema (siehe Abbildung 2: Arbeitsschema: RNA-Isolation) RNA isoliert werden. Hierbei lag die RIN zunächst zwischen 2,1 und 2,6. Aufgrund der stark fragmentierten RNA entschieden wir uns dafür, in den Folgeversuchen alternative Fixativa zu verwenden. Das FFPE diene weiterhin als Kontrollgruppe. Außerdem wurde vermehrt auf RNase freie Bedingungen geachtet (siehe Kapitel 2.2.1 Hygiene). Hierunter erzielten wir lediglich eine maximale RIN von 2,7 bei HOPE eingebettetem Gewebe. Um die LCM als mögliche Fehlerquelle auszuschließen, führten wir das gängige Schema (siehe Abbildung 2: Arbeitsschema: RNA-Isolation) ohne die LCM durch. Die Mikrotom- bzw. Kryoschnitte wurden also direkt einer RNA Isolierung unterzogen. Hierbei konnte die RIN auf 3,8 bei HOPE eingebettetem Gewebe gesteigert werden. Parallel isolierten wir mittels RNeasy® Micro Kit RNA aus kryofixiertem Mausgewebe. Hierbei erzielten wir eine RIN von 6,8.

Abschließend verglichen wir die Fixiermethoden mit den besten RIN. Hierbei handelte es sich um HOPE, Methacarn und Kryofixierung. Wir führten das

komplette Schema aus, also inklusive LCM. Hierunter erreichten wir, mit der HOPE-Fixierung, eine maximale RIN von 4,2 bei den in Paraffin-eingebetteten Proben. Als deutlich überlegen zeigte sich jedoch die Kryofixierung mit einer RIN von 8,2.

Tabelle 6: Übersicht: Versuche zur Etablierung der RNA Isolation

Versuch	Aufbau/ Anpassung	Fixierung	Maximale RIN
1	Isolierung aus FFPE	PFA	2,6
2	Alternative Fixativa	HOPE	2,7
		Methacarn	1,0
		PFA	1,3
3	Schema ohne LCM	HOPE	3,3
		Methacarn	3,8
		PFA	2,3
4	Alternatives Verfahren: Kryofixierung	Kryo	6,8
5	Vergleich zwischen Kryofixierung, Methacarn und HOPE mit komplettem Schema (inklusive LCM)	HOPE	4,8
		Methacarn	1,4
		Kryo	8,2

3.2 Klinischer Verlauf der EAE

Insgesamt wurden für diese Studie 38 Mäuse immunisiert, wobei in die Genexpressionsanalysen lediglich Gewebe von zehn MP4- und fünf MOG:35-55-immunisierten Mäusen einfluss. Die MP4-Mäuse zeigten $22,8 \pm 4,08$ Tage nach Immunisierung einen Symptombeginn und wurden $59 \pm 5,27$ Tage nach der Immunisierung im chronischen Krankheitsstadium euthanasiert. Hierbei zeigten sie einen durchschnittlichen Krankheitsscore von $2,1 \pm 0,73$ auf. MOG:35-55-immunisierte Mäuse wurden am Tag 13 nach der Immunisierung im akuten Krankheitsstadium euthanasiert.

Das MOG:35-55 Modell ist gekennzeichnet durch eine statische CD4⁺-T-Zell und Makrophagen vermittelten Immunpathologie. Die MP4-induzierte EAE hingegen zeigt charakteristischerweise einen dynamischen Krankheitsverlauf mit einer ZNS-Infiltration von T-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen [79]. Aus

diesem Grund wurden die MP4-immunisierten Mäuse bis zum chronischen Stadium gehalten, um sicherzugehen, dass die *Cerebella* B-Zell-Aggregate aufwiesen. Die MOG:35-55-Kontrollgruppe hingegen konnte im akuten Stadium euthanasiert werden.

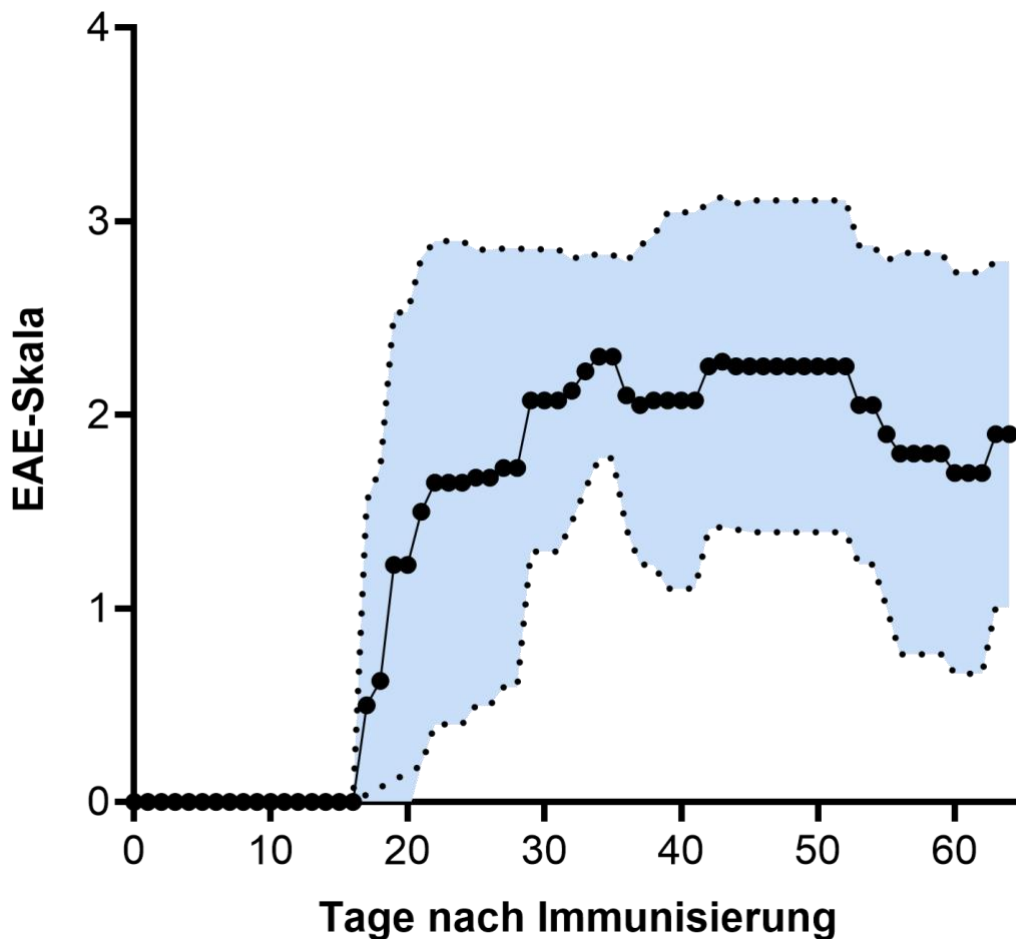


Abbildung 5 Krankheitsverlauf der MP4-Mäuse: Die Grafik zeigt den klinischen Krankheitsverlauf von zehn B6-Mäusen mit MP4-induzierter EAE. Die Immunisierung erfolgte an Tag 0, am Tag 1 und 2 wurde den Mäusen Pertussistoxin injiziert (siehe Kapitel 2.2 Methoden). Den Mäusen wurde entsprechend ihres Krankheitszustandes täglich ein Punktwert auf der EAE-Skala zugeschrieben (siehe Kapitel 2.2.3.1 Scoring). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung (blauer Bereich) sind für jeden Tag angegeben. Die Mäuse zeigten nach $22,8 \pm 4,08$ Tagen einen Symptombeginn. Die Tötung und anschließende Präparation erfolgte $59 \pm 5,27$ Tage nach der Immunisierung im chronischen Stadium der Erkrankung.

3.3 Immunhistochemische Färbung

Um die B-Zell Aggregate und Infiltrate der MP4 immunisierten Mäuse und T-Zell-Infiltrate der MOG:35-55 immunisierten Mäuse während der LCM identifizieren zu können, führten wir eine IHC-Färbung von Parallelschnitten durch (siehe Abbildung 4: Schnittführung). In der IHC Färbung konnten wir eine definitive Kategorisierung in B-Zell Aggregat und Infiltrat sowie T-Zell-Infiltrate vornehmen, diese Zuordnung diente uns während der LCM als Orientierungshilfe.

Als B-Zell-Infiltrat definierten wir eine lockere perivaskuläre Ansammlung von B220⁺-B-Zellen (siehe unten Abbildung 6, B). Dichte perivaskuläre Cluster von B220⁺-B-Zellen definierten wir als B-Zell-Aggregate (siehe unten Abbildung 6, A). Die T-Zell-Infiltrate bei MOG:35-55 immunisierten Mäuse imponierten als lockere Ansammlungen von CD3⁺-T-Zellen. Zusätzlich führten wir auch bei Lymphknoten eine B220 B-Zell-Färbung durch, um Lymphfollikel bei MP4 immunisierten Mäusen eindeutig identifizieren zu können.

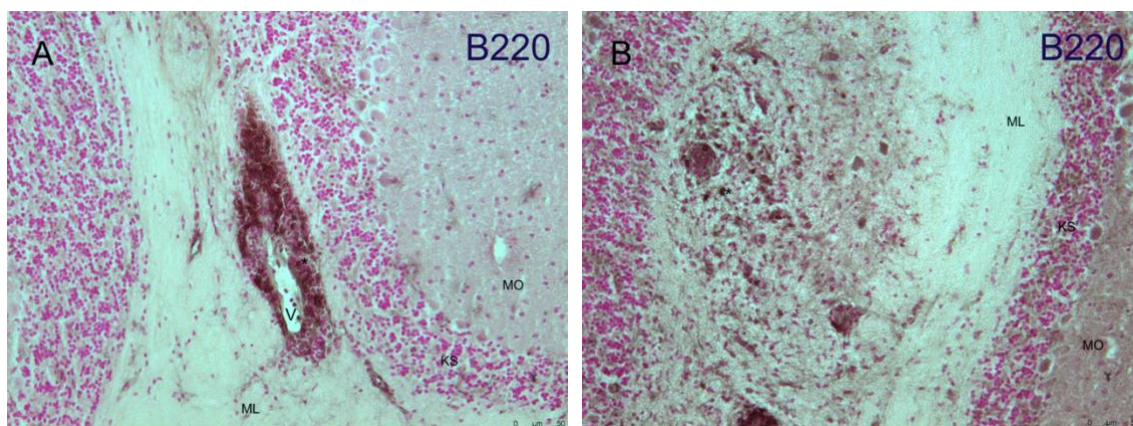


Abbildung 6 Immunhistochemische Färbung von B220⁺ B-Zellen: Markregion in Kleinhirnen von MP4 immunisierten Mäusen. **A)** B-Zell-Aggregat: B220⁺ B-Zellen (*) stellen sich eng um ein Blutgefäß (V) geclustert dar. Durch die Färbung erscheinen die B-Zellen braun. **B)** B-Zell-Infiltrat: Die B220⁺ B-Zellen liegen hier als diffuse Infiltration im Marklager (ML) vor.

ML, Marklager; KS, Körnerschicht; MO, Molekularschicht

3.4 Qualität und Quantität der RNA-Isolation

Mit Hilfe von LCM konnten Immunzellansammlungen aus den *Cerebella*, sowie B-Zellfollikel aus den Lymphknoten beider Gruppen isoliert werden. Die Immunzellansammlungen der MP4-Gruppe wurden während der LCM in die Untergruppen „B-Zell-Aggregate“ und „B-Zell-Infiltrate“ unterteilt.

Insgesamt fertigten wir Genexpressionsprofile von insgesamt 27 Samples an. Die Qualität der Proben wurde vorher mittels Bioanalyzer 2100 durch die Core Unit überprüft. Wir konnten eine durchschnittliche RNA-Konzentration von $1219,4 \pm 594$ pg/ μ l und eine durchschnittliche RIN von $7,98 \pm 0,63$ erreichen (siehe unten Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht RNA-Isolation

Gruppe	Anzahl der Samples	Durchschnittliche Konzentration in pg/ μ l	Gesamt-RNA in ng	Durchschnittliche RIN
B-Zell- Infiltrate MP4 (<i>Cerebellum</i>)	7	$703,9 \pm 162,3$	82,9	$8,3 \pm 0,65$
B-Zell- Aggregate MP4 (<i>Cerebellum</i>)	3	$1070 \pm 325,1$	36,3	$7,7 \pm 0,23$
Infiltrate MOG:35-55 (<i>Cerebellum</i>)	5	$1188 \pm 370,6$	62,4	$7,6 \pm 0,43$
Lymphfollikel MP4 (SLO)	8	$1489,1 \pm 796,8$	158	$8,0 \pm 0,81$
Lymphfollikel MOG:35-55 (SLO)	4	$1733,3 \pm 282,8$	72,8	$8,0 \pm 0,18$

Übersicht über die jeweilige Anzahl der Samples, sowie RNA Quantität (Gesamt RNA) und Qualität (Durchschnittliche RIN)

Die Genexpressionsprofile der Infiltrate sowie Aggregate der MP4-Gruppe wurden anschließend mit den Expressionsprofilen der Lymphfollikel sowie den Infiltraten der MOG:35-55 Gruppe verglichen (siehe Abbildung 1: Schema - Studiendesign). Gene, die im Gegensatz zu den Kontrollgruppen einen *log₂ fold change* von größer 2, einen p-adjust Wert von unter 0,05 und einen *base mean* von über 50 zeigten, stuften wir als besonders relevant ein. Eine Übersicht über die relevanten Gene bieten die Heatmaps im Teil „3.5.2 Heatmap“, eine Erläuterung der Gene im Detail findet im Teil „4.3 Einordnung der relevanten Gene“ statt.

Um zunächst einen ersten Überblick über die Expressionsdaten zu erhalten, ließen wir von der Core Unit eine Hauptkomponentenanalyse (PCA - *Principal Component Analysis*) erstellen. Als weitere grafische Darstellungsmöglichkeit nutzten wir *Heatmaps*.

3.5 Grafische Auswertung der Genexpressionsanalyse

3.5.1 Hauptkomponentenanalyse

In dieser Arbeit wurden 27 verschiedene Proben auf nahezu 22.000 Gene analysiert. Dabei entstand ein enormer und vor allem unübersichtlicher Datensatz. Im Detail und speziell für unsere Fragestellung ließen sich die Daten schnell filtern und auf wenige relevante Gene reduzieren. Trotzdem bleibt vorab die Frage, wie aussagekräftig unsere Daten sind und ob die Ergebnisse überhaupt plausibel sind. Ein valides Mittel, um Dimensionen zu minimieren und die Daten übersichtlicher wiederzugeben, stellt hierbei die PCA dar. Die PCA ermöglicht es, einen multidimensionalen Datensatz auf wenige Schlüsselvariablen zu reduzieren und diese in vereinfachter visueller Form darzustellen. Hierbei erfasst die erste Hauptkomponente (*Principal Component*, PC) so viele Variablen wie möglich in der Analyse, in unserem Fall 84%. Alle weiteren Hauptkomponenten (PC2, PC3, usw.) versuchen möglichst viele aller verbleibenden Variablen in der Analyse abzudecken. In unserer PCA deckt die

zweitstärkste PC noch 3% ab, wir können also insgesamt 87% (PC1 84% + PC2 3%) aller Variablen der Analyse in unserer PCA darstellen [85, 86].

Grundsätzlich kann man sagen, dass alle Gruppen in der PCA jeweils geclustert vorliegen. Ohne sich die Gene also im Detail angesehen zu haben, kann man davon ausgehen, dass ein Unterschied zwischen den einzelnen Proben vorliegt. Besonders eindrucksvoll ist der Abstand von der Gruppe der Lymphfollikel zu den restlichen Samples in der ersten Hauptkomponente. Die starke Trennung ist plausibel, da die Lymphfollikel aus peripheren SLOs entnommen wurden. Alle restlichen Proben stammen aus dem ZNS, also aus einem anderen Organsystem, und haben somit ein stark unterschiedliches Expressionsprofil. Interessanterweise unterscheiden sich die Lymphfollikel in der zweiten PC kaum noch von den Aggregaten. Man kann also schlussfolgern, dass von allen ZNS-Proben die Aggregate den Lymphfollikeln am ähnlichsten sind, bzw. die meisten Gemeinsamkeiten in der Genexpression aufweisen.

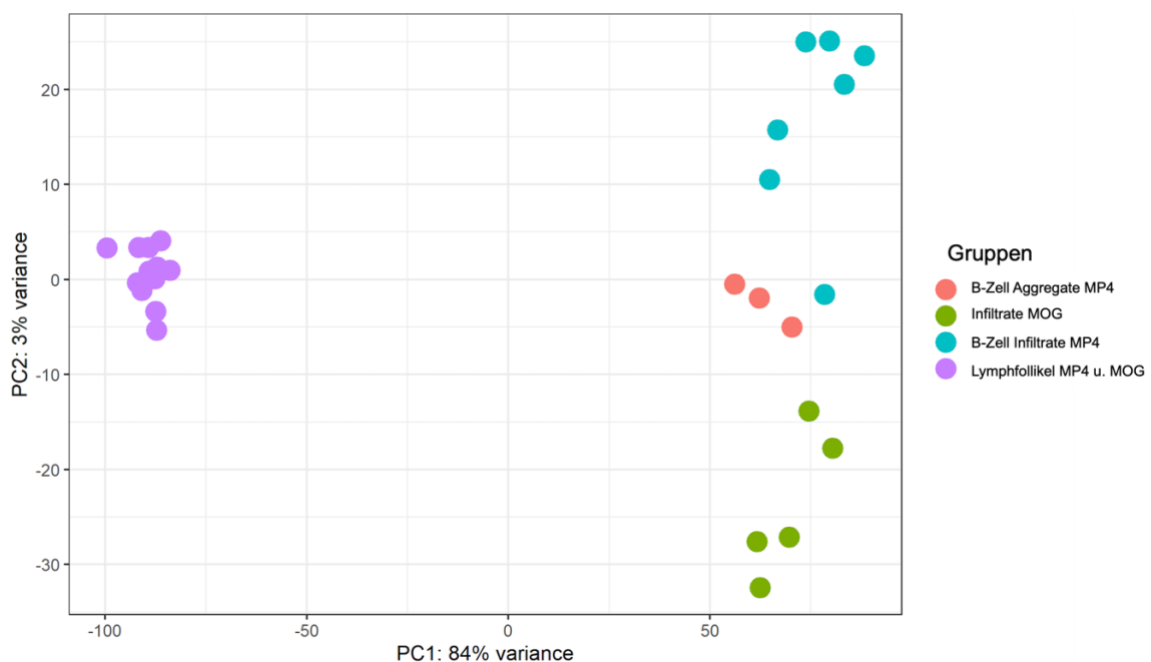


Abbildung 7 PCA: Die PCA reduziert einen multidimensionalen Datensatz auf wenige Schlüsselvariablen und gibt diese in vereinfachter visueller Form wieder. Die erste PC erfasst hierbei 84% der Variablen, die PC2 erfasst 3%. Die einzelnen Gruppen liegen geclustert vor, sie zeigen also innerhalb ihrer Gruppe ein ähnliches Expressionsmuster. Zwischen den einzelnen Gruppen tritt ein unterschiedliches Expressionsmuster auf. In der ersten PC zeigen die Lymphfollikel (violett) einen besonders großen Abstand zu den anderen Gruppen.

Trotz der simplen Darstellung der PCA kann man viele Rückschlüsse auf den Datensatz schließen. Eine weitere Möglichkeit der übersichtlichen grafischen Darstellung und Reduzierung von Dimensionen bietet die *Heatmap*.

3.5.2 Heatmap

Eine *Heatmap* bietet die Möglichkeit Matrixdaten grafisch darzustellen, indem einzelne Werte in unterschiedlichen Farbtönen abgebildet werden [87]. In unserem speziellen Fall besteht die Matrix aus den Samples und den entsprechenden Sequenzierungsdaten der einzelnen Gene. Da die einzelnen Proben aufgrund unterschiedlicher Sequenzierungstiefe nicht direkt miteinander vergleichbar sind, müssen die Daten zuvor transformiert werden. Hierfür wurde die regularisierte Log-Transformation (rlog) durchgeführt. Insbesondere Gene mit einem niedrigen Expressionsniveau neigen zu einer hohen Varianz. Der rlog kann den Trend der Varianz über den berechneten Mittelwert beseitigen und somit zu einer Vergleichbarkeit der einzelnen Expressionsdaten beitragen [88].

3.5.2.1 *Heatmap* „Übersicht“

Wir erstellten zunächst eine *Heatmap*, die alle Samples und alle Gene berücksichtigte. In einer so komplexen *Heatmap* lassen sich keine Rückschlüsse auf die einzelnen Gene ziehen. Sie dient einzig und allein der grafischen Übersicht und um etwaige Cluster bzw. Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Samples zu detektieren. Hier war erkennbar, dass die Lymphfollikel im Gegensatz zu den anderen Proben ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster aufwiesen. Eine Erkenntnis, die sich auch mit der Interpretation der PCA deckt.

Die *Heatmaps* bieten, neben der farblichen Codierung, zusätzlich die Möglichkeit, über das abgebildete Dendrogramm Ähnlichkeiten im Expressionsmuster der Samples bzw. Ähnlichkeiten der Gene abzubilden. Auch hier fiel auf, dass der größte Unterschied zwischen Lymphfollikeln und den Proben aus dem ZNS lag.

Außerdem bildeten die B-Zell Aggregate einen eigenen Cluster. Die Infiltrate aus MOG:35-55- und MP4-immunisierten Mäusen zeigten ein ähnliches Expressionsmuster auf.

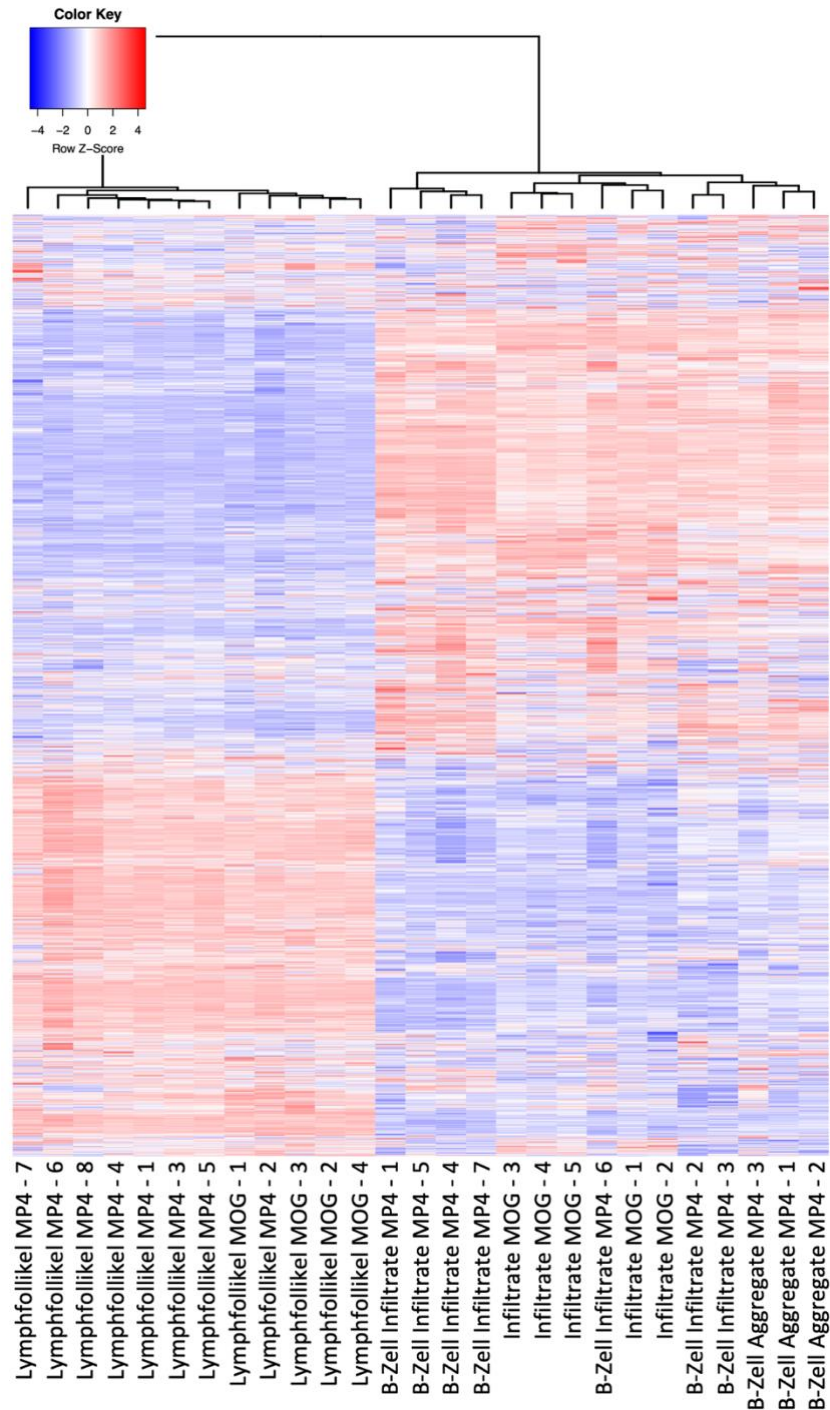


Abbildung 8 Heatmap – Übersicht: Die farbliche Kodierung (blau, rot) sowie das am oberen Rand der Grafik abgebildete Dendrogramm zeigen zwei große Cluster. Zum einen das periphere Gewebe (Lymphfollikel) und zum anderen das ZNS-Gewebe (Aggregate MP4, Infiltrate MP4 u. Infiltrate MOG). Im ZNS-Gewebe liegen die B-Zell Aggregate als Cluster vor. Die B-Zell-Infiltrate und Infiltrate MOG liegen nicht streng getrennt vor und scheinen einige Überschneidungen in ihren Expressionsmustern zu haben.

3.5.2.2 Heatmaps der relevanten Gene

Neben der hier verwendeten Übersichtsdarstellung besteht auch die Möglichkeit, einzelne relevante Gene in einer *Heatmap* gesondert darzustellen.

Hierfür verwendeten wir die Gene, die nach oben genannten Vorgaben gefiltert wurden und erstellten *Heatmaps* für die für uns interessanten Gruppen der B-Zell-Infiltrate, B-Zell-Aggregate, sowie für die gemeinsam hochexprimierten Gene beider Gruppen (siehe Abbildung 1: Schema - Studiendesign).

3.5.2.2.1 Heatmap B-Zell-Infiltrate

Für die Infiltrate konnten wir insgesamt 32 hochregulierte Gene finden, die unseren statistischen Anforderungen entsprachen. Die Gene sind in Abbildung 9: „Heatmap B-Zell-Infiltrate“ (siehe unten) dargestellt. Eine Erläuterung im Detail erfolgt im Kapitel „4.3.2 B-Zell-Infiltrate“.

Durch die farbliche Darstellung und das Dendrogramm ist gut erkennbar, dass die Gene lediglich in den Infiltraten signifikant hochreguliert waren. Eine scharfe Trennung zwischen den Gruppen „Lymphfollikel“, „Infiltrate MOG:35-55“ und „B-Zellinfiltrate“ ist möglich. Insgesamt gibt es eine höhere Übereinstimmung der Infiltratgruppen („Infiltrate MOG:35-55“ und „B-Zell Infiltrate“) untereinander als gegenüber der Gruppe der Lymphfollikel. Diese Beobachtung liegt nahe, da die Infiltrate aus dem ZNS entnommen wurden, die Lymphfollikel hingegen aus peripheren SLOs und somit einer gänzlich anderen Organentität entstammen.

3.5.2.2.2 Heatmap B-Zell-Aggregate

Für die Gruppe der Aggregate konnten wir insgesamt 17 hochregulierte Gene bestimmen (siehe Abbildung 10: Heatmap B-Zell-Aggregate). Eine genaue Erläuterung der einzelnen Gene erfolgt im Teil „4.3.3 B-Zell-Aggregate“. Wie schon bei den Infiltraten erkennbar, besteht auch hier eine starke Trennung zu der Gruppe der „Lymphfollikel“ und eine schwächere Trennung gegenüber den „Infiltraten MOG:35-55“.

Bei den Genen der Hämoglobin Gruppe (Hbb.a1, a2, b1, b2) ist eine geringe Trennung zwischen Infiltraten des Modells MOG:35-55 und B-Zell-Aggregaten der MP4-Mäuse sichtbar. Diesen Effekt erklärten wir uns aufgrund der Tatsache, dass sowohl die B-Zell-Aggregate als auch die Infiltrate im MOG:35-55-Modell maßgeblich als perivaskuläre Cluster auftreten (siehe Abbildung 6 A: Immunhistochemische Färbung von B220⁺ B-Zellen). Während der LCM wurden die hämoglobinhaltigen Blutgefäße nicht separiert, sondern gemeinsam mit den Infiltraten bzw. Aggregaten ausgeschnitten. Eine Relevanz für die TLO-Bildung bleibt demnach fraglich.

3.5.2.2.3 Heatmap „Gemeinsam exprimierte Gene“

Wir konnten insgesamt sechs Gene ermitteln, die sowohl in B-Zell-Aggregaten als auch Infiltraten hochreguliert waren (siehe Abbildung 11: Heatmap: Gemeinsam exprimierte Gene).

Von besonderem Interesse waren zwei Vertreter der Hitzeschockproteine (HSP), sowie ein Vertreter der Matrix Metalloproteinasen (MMP). Deren genauere Funktion im Kontext der MS wird im Kapitel „4.3.4 Gemeinsam exprimierte Gene“ beschrieben.

Gut erkennbar ist, dass die B-Zell-Infiltrate und -Aggregate zwar insgesamt scharf von den Lymphfollikeln und MOG:35-55-Infiltraten abgrenzbar, allerdings untereinander vermischt sind. Das spricht für ein ähnliches Expressionsmuster untereinander und deckt sich daher mit den Erwartungen an diese Gruppe.

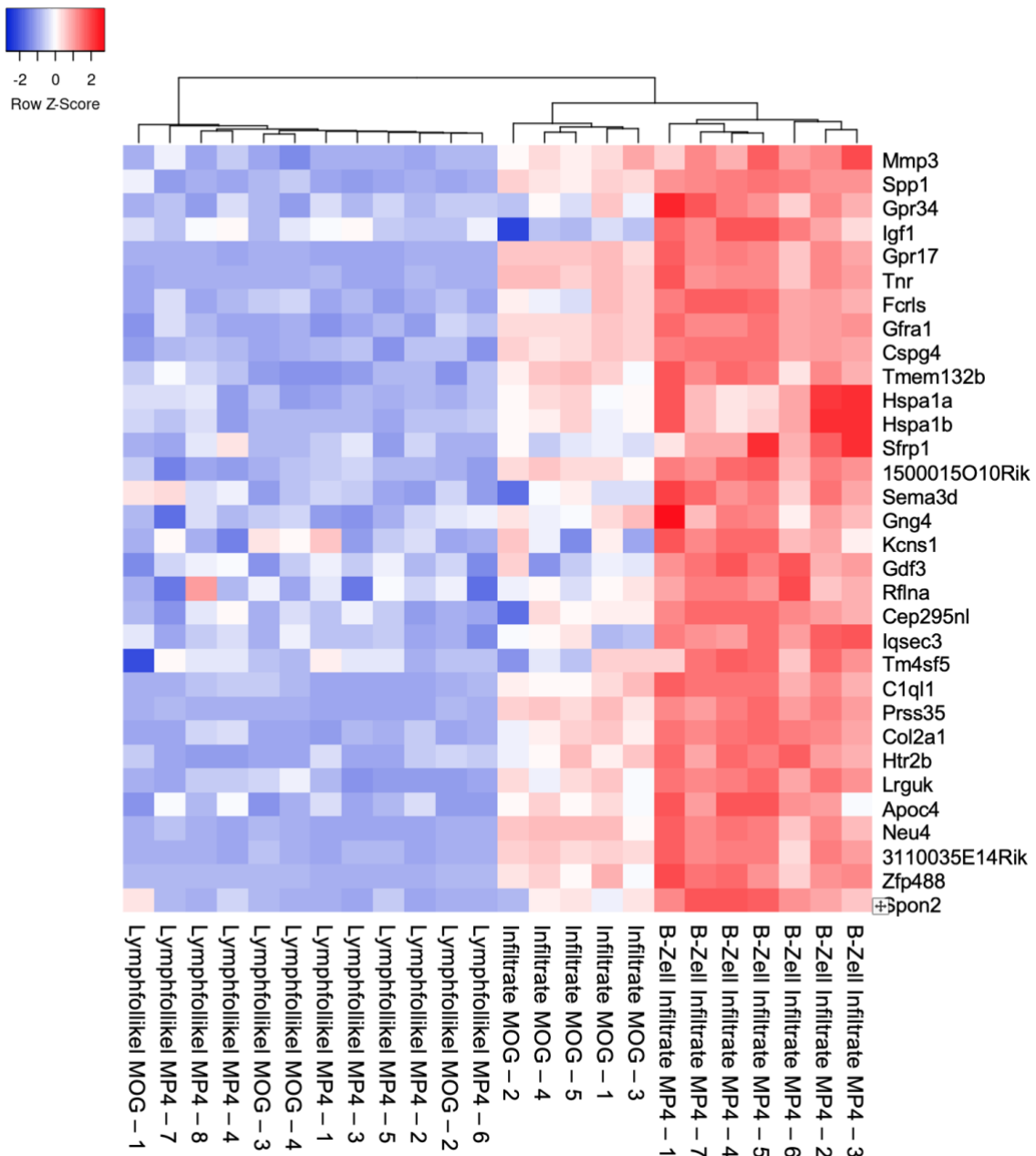


Abbildung 9 Heatmap B-Zell Infiltrate: Die für die B-Zell-Infiltrate als relevant eingestuft Gene werden hier gesondert betrachtet. Durch die Farbcodierung (blau: geringe Expression, rot: starke Expression) und das im oberen Teil der Grafik abgebildete Dendrogramm, lassen sich im Wesentlichen drei Cluster unterscheiden. Der links stehende Cluster (im wesentlichen blau) zeigt die Lymphfollikel mit einer kaum vorhandenen Genexpression. Im mittleren Cluster sind die Infiltrate aus dem MOG:35-55-Modell mit einer geringen bis mäßigen Expression abgebildet. Eine scharfe Trennung ist zu dem rechtsständigen Cluster (im Wesentlichen rot) erkennbar. Er bildet die hohe Expression der Gene in den B-Zell-Infiltraten des MP4-Modells ab.

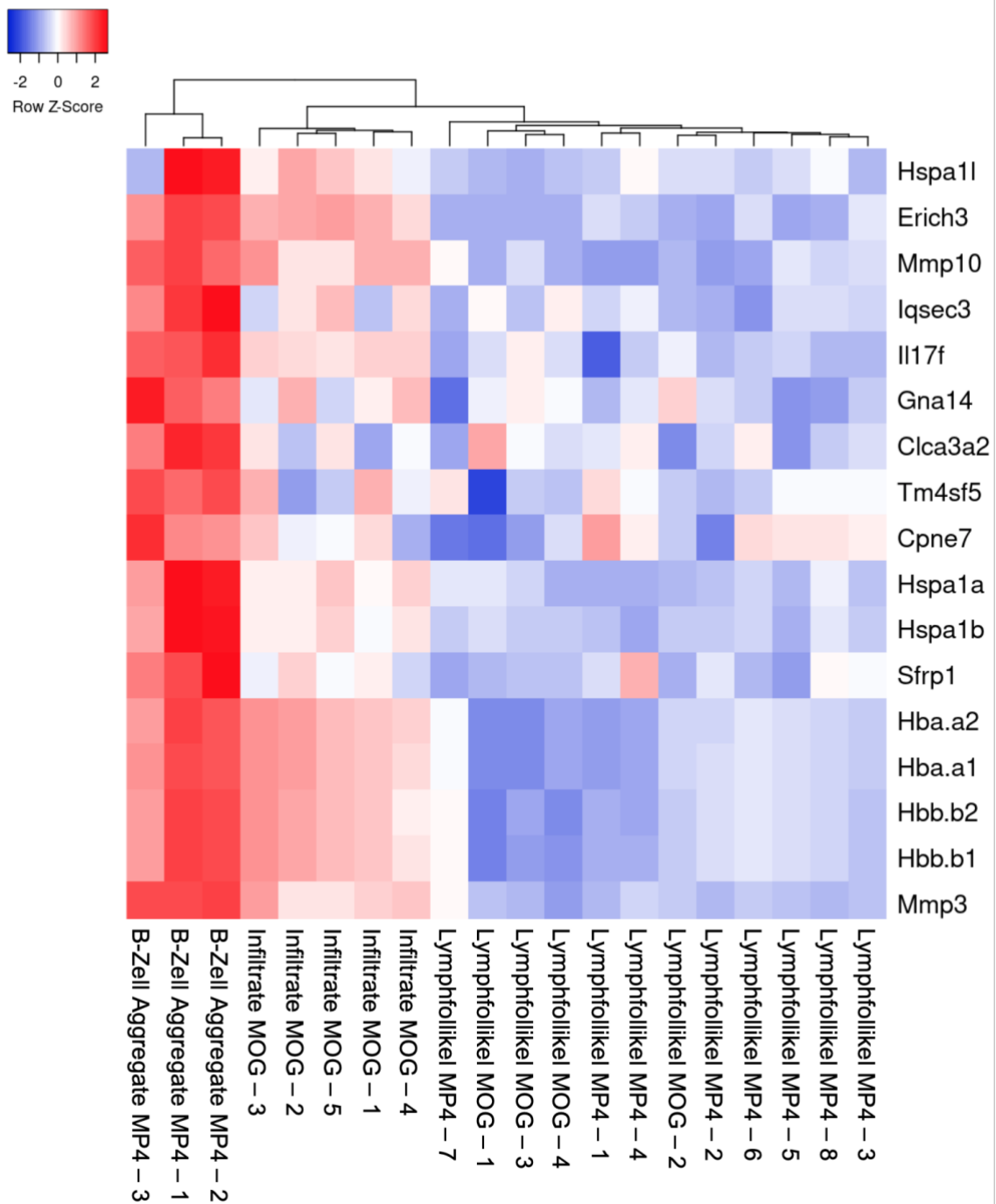


Abbildung 10 Heatmap B-Zell Aggregate: Die für die B-Zell-Aggregate als relevant eingestufte Gene werden hier gesondert betrachtet. Durch die Farbcodierung (blau: geringe Expression, rot: starke Expression) und das im oberen Teil der Grafik abgebildete Dendrogramm, lassen sich im Wesentlichen drei Cluster unterscheiden. Der rechts stehende Cluster (im Wesentlichen blau) zeigt die Lymphfollikel mit einer kaum vorhandenen Genexpression. Im mittleren Cluster sind die Infiltrate aus dem MOG:35-55-Modell mit einer geringen bis mäßigen Expression abgebildet. Eine scharfe Trennung ist zu dem linksständigen Cluster (im Wesentlichen rot) erkennbar. Er bildet die hohe Expression der Gene in den B-Zell-Aggregaten im MP4-Modell ab.

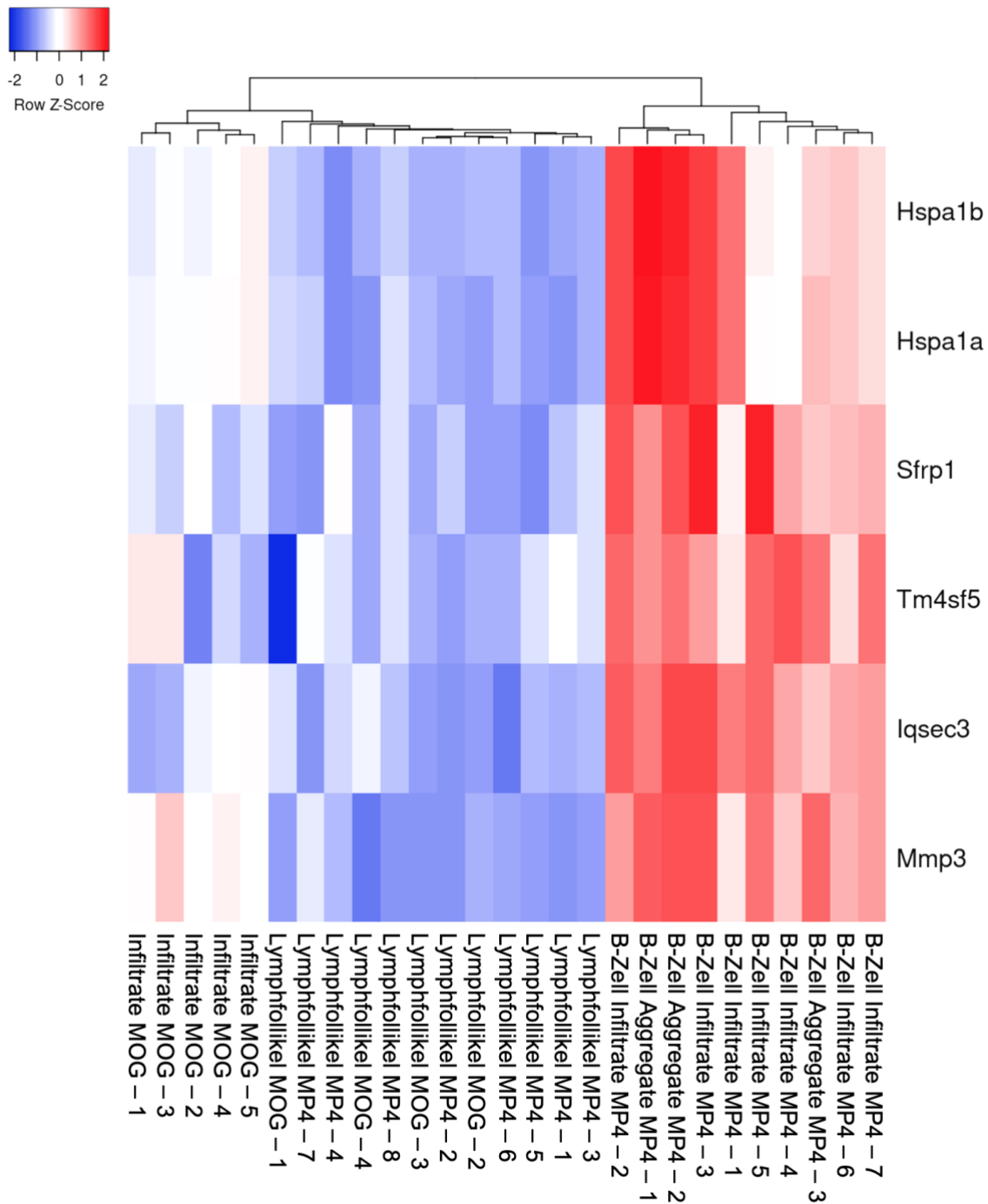


Abbildung 11 Heatmap: Gemeinsam exprimierte Gene: Hier werden die Gene die sowohl in B-Zell-Infiltraten als auch -Aggregaten eine erhöhte Expression zeigten, den Kontrollgruppen gegenübergestellt. Durch die Farbcodierung (blau: geringe Expression, rot: starke Expression) und das im oberen Teil der Grafik abgebildete Dendrogramm, lassen sich im Wesentlichen zwei Cluster unterscheiden. Der rechtsseitige Cluster zeigt durch seine überwiegend rote Färbung die erhöhte Expression der am rechten Rand der Grafik genannten Gene. Eine scharfe Trennung gibt es zu dem linksseitigen Cluster, hier erscheinen die Kontrollgruppen (Lymphfollikel, ZNS-Infiltrate aus dem MOG:35-55 Modell) als Korrelat ihrer geringen Expression eine überwiegend blaue bis weiße Färbung.

4 Diskussion

4.1. Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, in erster Linie stabile RNA aus dem Gewebe von immunisierten Mäusen zu gewinnen. Prinzipiell handelt es sich hierbei nicht um ein sonderlich schweres Unterfangen. Die RNA-Isolation ist ein gut erprobtes und routinemäßig durchgeführtes laboratorisches Verfahren. In unserem speziellen Fall gab es jedoch zwei maßgebliche Probleme, die es zu lösen galt. Zum einen wollten wir die Möglichkeiten erproben, RNA aus Gewebe zu isolieren, welches zuvor in Paraffin eingebettet wurde. Zum anderen wollten wir Gewebe aus speziellen, schwer zugänglichen Strukturen isolieren. Um suffiziente Aussagen zu erhalten, war es nötig, Zellkompartimente aus Lymphfollikeln, B-Zell-Aggregaten, B-Zell-Infiltraten und Immunzellinfiltraten aus mit MOG:35-55 immunisierten Mäusen zu isolieren und einzeln zu sequenzieren. Gerade die Detektierung der Immunzellkompartimente über Färbemethoden und die anschließende Separierung mittels LCM stellte sich als anspruchsvoll heraus. Abschließend erfolgte eine ausführliche Datenanalyse, die hauptsächlich von der Core Unit durchgeführt wurde. Die hierbei zu Tage gekommenen Erkenntnisse, insbesondere die für die unterschiedlichen Kompartimente spezifischen Gene, bieten Anregung für weitere Forschung. Deshalb beinhaltet diese Arbeit eine Einordnung der einzelnen Gene in einen Zusammenhang mit der MS.

4.2. Etablierung der RNA-Isolation

4.2.1 Fixierung und Einbettung

Wie bereits einleitend erwähnt, war das erste Ziel dieser Arbeit die Möglichkeiten einer RNA-Isolierung aus Gewebe zu evaluieren, welches zuvor in Paraffin eingebettet wurde. Hierfür verglichen wir zwei grundlegend

verschiedene Methoden. Zum einen die paraffinabhängige Immersionsfixierung unter Zuhilfenahme verschiedener Immersionsreagenzien (Methacarn, Hope, PFA) und zum anderen die Kryofixierung, welche ohne Immersionsreagenzien auskommt und lediglich ein Einbettungsmedium benötigt (TissueTek®).

Grundsätzlich kann man davon ausgehen, dass eine Manipulation am Gewebe mittels Immersionsreagenzien auch einen Einfluss auf die RNA-Integrität hat und sich somit letztlich auch auf die Durchführbarkeit einer Sequenzierung auswirkt. Hierbei spielen insbesondere RNA-Protein-Quervernetzungen und RNA-Fragmentierung eine entscheidende Rolle [89]. Des Weiteren muss vor der Verarbeitung und Analyse von Paraffin-eingebettetem Gewebe die Probe aufwendig vom Paraffin befreit werden. Trotzdem verfügen immersionsfixierte und Paraffin-eingebettete Proben über einige Vorteile. So sind sie beispielsweise über einen sehr langen Zeitraum bei Raumtemperatur lagerfähig. Kryofixierte Proben hingegen müssen aufwendig und lückenlos bei -80°C gelagert werden. Ein weiterer entscheidender Vorteil der Paraffin-eingebetteten Proben sind enorme, bereits existente Sammlungen von Gewebeproben. So haben beispielsweise diagnostische pathologische Institute oder internationale Biodatenbanken große Mengen an Proben eingelagert, die somit einer retrospektiven Analyse zur Verfügung stehen würden.

4.2.1.1 Potentielle Fehlerquellen

Ein weiterer entscheidender Nachteil der Immersionsfixierung ist die aufwendige Verarbeitung des Gewebes mit vielen Zwischenschritten. Viele Zwischenschritte erhöhen auch die Gefahr von Fehlern und vor allem Verunreinigungen. Gerade RNasen, die in nahezu jedem Organismus vorhanden sind, können eine Probe schnell unbrauchbar machen [90]. Über mehrere Versuche hinweg verschärften wir die hygienischen Vorsichtsmaßnahmen und versuchten die Versuche so weit wie möglich zu vereinfachen. Allerdings kamen wir trotz allem niemals über eine RIN von 4,8 (siehe Kapitel 3.1 Etablierung der RNA-Isolation). In der Literatur wurden laut Akane et al. bei der Fixiermethode mittels Methacarn immerhin stabile RIN-Werte von >8 beschrieben [91]. Solch hohe Werte konnten wir nicht

erreichen. Hinzu kam, dass die Ergebnisse mit verhältnismäßig höheren RIN-Werten schwer reproduzierbar waren, die RIN ließ sich also nicht ohne weiteres in jedem Versuch auf gleich hohem Niveau halten. Kryogewebe hingegen erzielte direkt bei ersten Probeläufen sehr gute RIN und die RIN Werte konnten auch in den Folgeversuchen auf einem konstant hohen Level gehalten werden.

Auch wenn immersionsfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe eine Reihe an Vorteilen aufweist, wollten wir nicht das primäre Ziel der stabilen RNA-Isolation aus den Augen verlieren. Gerade im Hinblick auf die anschließende Sequenzierung kann man davon ausgehen, dass eine höhere Qualität und auch Quantität der Ausgangsproben auch zu mehr und valideren Informationen für unsere spätere Evaluation der Schlüsselgene führen würden [84]. Des Weiteren konnten wir durch die Entscheidung für das *Fresh Frozen* Gewebe auch die benötigten Mäuse für die Versuche reduzieren und somit deutlich verantwortungsbewusster und sensibler mit dieser wertvollen Ressource umgehen.

4.2.2 Färbungen und LCM

Eine weitere Herausforderung in der Etablierung der Methodik war es, die verschiedenen Immunzellpopulation zu detektieren und zu separieren.

Für die Detektion führten wir, wie in der Methodik beschrieben, eine IHC-Färbung durch. Hierfür fertigten wir von den Kleinhirnen bzw. Lymphknoten Serienschritte an und führten eine B- bzw. T-Zellfärbung durch. Konnten wir eine gewünschte Zellpopulation detektieren, wurden die Folgeschnitte bzw. Parallelschnitte auf einen LCM Objektträger (FrameSlides) aufgezogen, um in der LCM bezüglich der Immunzellpopulationen separiert zu werden (siehe Abbildung 3: Anordnung der Gewebeschnitte auf den OTs). Und genau an dem Punkt findet sich der erste Kompromiss dieser Technik. Wir konnten die Gewebeschnitte, die wir direkt der LCM zuführten, keiner kompletten IHC-Färbung unterziehen, da wir damit das Gewebe zu stark geschädigt hätten, was zu Lasten der RNA-Qualität gegangen wäre. Wir hatten also lediglich die Möglichkeit den Parallelschnitt zu färben.

Dieser liegt bestenfalls 10 µm vom eigentlichen LCM-Schnitt entfernt. Trotzdem kann eine Entfernung von 10 µm bei kleinen Immunzellpopulationen, die zudem noch eine sehr heterogene und dreidimensionale Struktur bieten, einen großen Unterschied ausmachen. Hinzu kommt, dass es sich bei der B-Zell-Aggregatbildung um einen sehr dynamischen Prozess handelt, bei dem es erst im Verlauf der EAE zu einer Clusterbildung der B-Zellen kommt [82]. Unsere Gewebeschnitte ließen nur eine zweidimensionale Sicht auf einen dreidimensionalen dynamischen Prozess zu. Es ließ sich also nicht ausschließen, dass Zellpopulationen unter die Definition „B-Zell Infiltrat“ fielen, obwohl sie sich in einer anderen Ebene des Organs schon in einem Übergangsstadium zu einem B-Zell Aggregat befanden.

Die IHC-gefärbten Schnitte sollten als Orientierungshilfe für die LCM dienen, quasi als Landkarte. Auch wenn wir die LCM-Gewebeschnitte zur besseren Orientierung einer Cresyl Violet Färbung unterzogen, war eine einwandfreie Zuordnung der Immunzellpopulationen zwar in den meisten Fällen, jedoch nicht immer, möglich. Aufgrund der Unsicherheit entschieden wir uns für ein restriktives Regime und führten nur dann eine Dissektion durch, wenn wir die Zellpopulation nahezu zweifelsfrei einer Gruppe zuordnen konnten.

Die von uns durchgeführte IHC-Färbung der MP4-Präparate sah ausschließlich eine B-Zell-Färbung vor. Unspezifische Immunzellcluster ließen sich während der LCM anhand der Cresyl Violet Färbung detektieren. Die B-Zell-Färbung diente der weiteren Unterscheidung zwischen Infiltrat und Aggregat. Eine weitere Definition als TLO lässt diese Färbung jedoch nicht zu. Kuerten et al. definierten die TLOs in der MP4-induzierten EAE anhand einer B- und T-Zell-Kompartimentierung, sowie durch das Vorhandensein von PNA⁺ und oder MAdCAM⁺ HEVs. Zusätzlich musste eines der folgenden Merkmale vorhanden sein: follikulär dendritische Zellen (FDZ), Retikulinfasern, CD138⁺ Plasmazellen, proliferative Aktivität der B- bzw. T-Zellen oder der Nachweis auf somatische Hypermutation. In der gleichen Studie konnte auch gezeigt werden, dass die meisten TLOs im Kleinhirn auftreten und 61% der Aggregate im Kleinhirn die Bedingungen für TLOs erfüllt haben [82].

Da wir in unserer Studie ebenfalls ausschließlich Aggregate aus dem Kleinhirn dissektierten und das gleiche EAE-Modell verwendeten, kann man davon ausgehen, dass das Genexpressionsprofil der Gruppe der B-Zell-Aggregate Eigenschaften der TLOs inkludiert.

Grundsätzlich wäre eine detailliertere Betrachtung der Immunzellkompartimente wünschenswert. Eine Möglichkeit bestände darin, eine Färbung auf dem Gewebeschnitt durchzuführen, der direkt darauf der LCM zugeführt wird. Tjernlund et al. führten 2016 erfolgreich eine *in situ* Färbung von CD8⁺ T-Zellen in Lymphknoten durch mit anschließender LCM und Genexpressionsanalyse und Jintang et al. konnten bereits 2013 mit einem angepassten IHC-Färbeprotokoll CD90⁺ Zellen aus *Glioblastoma multiforme* Gewebeschnitten isolieren und eine Proteomanalyse durchführen [92, 93].

Für uns kamen direkte Färbemethoden auf dem LCM-Gewebeschnitt zunächst nicht in Frage, da die Färbemethodik, um Aggregate per Definition als TLO zu identifizieren, zwar prinzipiell möglich wäre, jedoch sehr viele Schritte, wie beispielsweise Gewebefixierung, Peroxidaseblock, Antikörper-vermittelte Färbereaktion (siehe Kapitel 2.2.8.2 IHC-Färbung an Kryoschnitten) erfordert hätte und somit zu Lasten der RNA-Qualität gegangen wäre. Trotzdem ist die LCM ein Instrument, dessen Möglichkeiten sicherlich noch nicht ausgeschöpft sind und eine genauere Untersuchung der MS ermöglicht. Beispielsweise wäre eine weitere Unterteilung der B-Zell-Aggregate mit spezifischen *in situ* Färbungen und Isolierung einzelner Zelltypen denkbar.

4.3 Einordnung der relevanten Gene

4.3.1 Einleitung

In dieser Arbeit konnten wir insgesamt 43 Gene herausfiltern, die im Prozess der Aggregatbildung gegenüber den Kontrollgruppen hochreguliert waren (siehe Abbildung 1: Schema - Studiendesign). Von diesen 43 Genen waren 32 in den B-Zell-Infiltraten und 17 in den B-Zell-Aggregaten hochreguliert. Bei sechs Genen konnten wir feststellen, dass sie sowohl in den Aggregaten als auch in den Infiltraten hochreguliert waren.

Im Folgenden sollen die Gene in einen Kontext zur MS gesetzt werden. Wir betrachteten die Gene gruppenweise (B-Zell-Aggregate, B-Zell-Infiltrate und gemeinsam exprimierte Gene) und erstellten für jede Gruppe zunächst eine Übersichtstabelle. Die wichtigste Information der Tabellen ist, ob das jeweilige Gen einen Bezug zur MS hat. War das der Fall, wurde im darauffolgenden Fließtext die Rolle des Gens in der MS näher erläutert. Als weitere Information enthalten die Tabellen Bezüge der jeweiligen Gene zu anderen Erkrankungen. Hier fiel auf, dass besonders viele der Gene einen Bezug zu malignen Erkrankungen oder autoimmunen Erkrankungen aufwiesen.

Abschließend beinhalten die Tabellen eine Spalte für weitere Anmerkungen. Hier finden sich Überlegungen, die einerseits die Relevanz einiger Gene genauer betrachtet und andererseits Informationen zu Genen, die zwar keinen direkten Bezug zur MS aufweisen, aber aufgrund ihrer Rolle in immunologischen und inflammatorischen Prozessen nicht unerwähnt bleiben sollten.

Für unsere Literaturrecherche nutzten wir die PubMed[®] Datenbank.

4.3.2 B-Zell-Infiltrate

Von den 32 Genen, die in den B-Zell-Infiltraten hochreguliert waren, konnten wir bei elf Genen einen Bezug zur MS herstellen. Drei der Gene waren auch in Aggregaten hochreguliert und werden deshalb im Kapitel „4.3.4 Gemeinsam exprimierte Gene“ gesondert betrachtet.

Tabelle 8: Übersicht hochregulierter Gene in den B-Zell-Infiltraten

Infiltrate				
Gen	Protein	Bezug zur MS	Bezug zu anderen Erkrankungen	Anmerkungen
<i>htr2b</i>	5-hydroxy-tryptamine (serotonin) receptor 2B	✓	<ul style="list-style-type: none"> diverse Malignome (z.B. Melanome, Magen-Darmkarzinome) [94] 	
<i>neu4</i>	Sialidase 4	✓	<ul style="list-style-type: none"> Kolonkarzinom [95] Glioblastom [96] 	
<i>tnr</i>	Tenascin R	✓	<ul style="list-style-type: none"> Medulloblastom [97] Morbus Parkinson [98] 	
<i>kcns1</i>	K+ spannungsgesteuerter Ionenkanal, Subfamilie S, 1	✓	<ul style="list-style-type: none"> Endometriumkarzinom [99] chronischer postoperativer Schmerz [100] 	
<i>fcrls</i>	Fc receptor-like S, scavenger receptor	✓	<ul style="list-style-type: none"> B-Zell Lymphom Multiples Myelom [101] 	
<i>spp1</i>	Osteopontin	✓	<ul style="list-style-type: none"> diverse onkologische Erkrankungen (z.B. Lungenkrebs und Brustkrebs) [102] 	<ul style="list-style-type: none"> gilt als Mediator für tumorassoziierte Entzündung und fördert die Metastasierung [102]
<i>igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	✓	<ul style="list-style-type: none"> Parkinson, Alzheimer [103] 	
<i>gpr17</i>	G Protein-gekoppelter Rezeptor 17	✓	<ul style="list-style-type: none"> Apoplex Depression Schizophrenie [104] 	
<i>rflna</i>	Refilin A	✗	<ul style="list-style-type: none"> Spondylocarpotarsal-Synostose-Syndrom [105] 	<ul style="list-style-type: none"> Aktin regulatorisches Protein in Änderung des zellulären Phänotyps involviert [106]
<i>tmem132b</i>	Transmembrane protein 132B	✗	<ul style="list-style-type: none"> autosomal-rezessiver nicht-syndromaler Hörverlust [107] Schlaflosigkeit [108] 	<ul style="list-style-type: none"> zelluläre Adhäsionsfunktion Verbindung von extrazellulärer Matrix mit Aktin-Zytoskelett [109]
<i>lrguk</i>	Leucine-rich repeats and guanylate kinase	✗	<ul style="list-style-type: none"> männliche Infertilität [110] 	

	<i>domain containing</i>			
<i>gdf3</i>	<i>Growth differentiation factor 3</i>	×	<ul style="list-style-type: none"> • erhöhter GDF3 Spiegel bei Sepsis Patienten [111] • Klippel-Feil Syndrom [112] 	<ul style="list-style-type: none"> • Makrophagen, die mit GDF3 behandelt wurden, sezernieren weniger proinflammatorische Zytokine [111]
<i>apoc4</i>	Apolipoprotein C-IV	×	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatitis-B-Virus-bedingtes hepatozelluläres Karzinom (HCC) [113] 	<ul style="list-style-type: none"> • keine Beschreibung im Zusammenhang mit MS, allerdings ist Apoc2 in der PPMS hochreguliert und mit einem verstärkten Entzündungsgeschehen assoziiert [114]
<i>cspg4</i>	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 4</i>	×	<ul style="list-style-type: none"> • Oligodendrogliomen, Astrozytomen, Glioblastomen [115] • Melanom, Leukämie, Mamma Karzinom [116] 	
<i>prss35</i>	Serin Protease 35	×	<ul style="list-style-type: none"> • Nierenfibrose [117] 	
<i>c1ql1</i>	<i>Complement component 1, q subcomponent-like 1</i>	×	<ul style="list-style-type: none"> • Follikuläres Schilddrüsenkarzinom [118] • Kolorektales Karzinom [119] 	<ul style="list-style-type: none"> • wird in Th17 Zellen deutlich höher exprimiert als in Th1, Th2 und regulatorischen T-Zellen (Treg) [120]
<i>gng4</i>	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4</i>	×	<ul style="list-style-type: none"> • Glioblastom (mögliche Tumorsuppressorwirkung) [121] • Thymuskarzinom [122] 	
<i>zfp488</i>	Zinkfinger Protein 488	×	-	<ul style="list-style-type: none"> • Beteiligt an der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläufern während der embryonalen Entwicklung, der Oligodendrogenese sowie der Remyelinisierung nach ZNS Schäden [123]
<i>col2a1</i>	Kollagen, Typ II, Alpha 1	×	<ul style="list-style-type: none"> • RA (IL17A inhibiert Col2a1 Expression in einer Kollagen-induzierten Arthritis bei Ratten) [124] 	

<i>gfra1</i>	<i>Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1</i>	×	<ul style="list-style-type: none"> • Osteosarkom [125] • Kolonkarzinom [126] 	
<i>gpr34</i>	G Protein-gekoppelter Rezeptor 34	×	<ul style="list-style-type: none"> • Magenadenokarzinom [127] 	
<i>sema3d</i>	<i>Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, (semaphorin) 3D</i>	×	<ul style="list-style-type: none"> • Asthma bronchiale [128] • Morbus Menière [129] 	
<i>spon2</i>	<i>Spondin 2, extracellular matrix protein</i>	×	<ul style="list-style-type: none"> • hauptsächlich Maligne Erkrankungen z.B. Magenkrebs [130] oder kolorektale Karzinome [131] 	
<i>cep295nl</i>	<i>CEP295 N-terminal like</i>	×	-	
3110035E 14Rik (<i>vxn</i>)	Vexin	×	-	<ul style="list-style-type: none"> • Teil des Riken-Mausgenom-Enzyklopädieprojekts [132]
15000150 10Rik (<i>ecrg4</i>)	Augurin	×	<ul style="list-style-type: none"> • Alzheimer Krankheit [133] • maligne Erkrankungen wie z.B. Ösophaguskarzinom [134] oder Magenkrebs [135] 	

5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2B (5-HT_{2B}-Rezeptor)

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5HT) ist vor allem für seine Funktion als Neurotransmitter bekannt. Über die 5-HT Rezeptoren hat Serotonin jedoch zusätzlich eine Funktion in der Regulation von inflammatorischen Prozessen. Das *htr2b* Gen codiert für den 5-HT_{2B}-Rezeptor. Dieser Rezeptor wird vornehmlich auf M2 (M-CSF)-Makrophagen exprimiert [136]. M2-Makrophagen gelten zwar als eher antiinflammatorische Zellen, aus der Tumorforschung ist jedoch bekannt, dass M2-Makrophagen eine immunsuppressive Funktion haben und zudem das Tumorwachstum und die Angiogenese fördern [137].

Im direkten Zusammenhang mit der MS wurde *htr2b* zwar noch nicht erwähnt, allerdings rückte dieses Gen bei anderen neurologischen Erkrankungen bereits in den Fokus. In der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) begrenzt 5-HT_{2B}-Rezeptoren beispielsweise die Degeneration von mononuklearen Phagozyten des Rückenmarks und verlangsamt das Fortschreiten der ALS [138].

Sialidase 4

Neu4 codiert für die Sialidase 4. Sialidasen bzw. Neuramidasen katalysieren die Entfernung von Sialinsäureresten, die sich endständig an Glykokonjugatketten der zellulären Glykokalix befinden. Diese sogenannten sialylierten Glykokonjugate (SGC) haben eine entscheidende Funktion als Erkennungsmerkmale für molekulare und interzelluläre Wechselwirkungen [139, 140]. Im ZNS sind SGC an der Regulierung der Signalübertragung von Neuronen beteiligt [141].

Sialidasen wurden zwar bisher nicht explizit im Zusammenhang mit der MS erwähnt, spielen allerdings in neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. Tay-Sachs-Krankheit), onkologischen Erkrankungen, Infektionskrankheiten und Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine Rolle [139].

Tenascin R

Das *tnr* Gen codiert für Tenascin R. Tenascine sind Glykoproteine der extrazellulären Matrix (EZM). Tenascin R wird ausschließlich im ZNS von Oligodendrozyten und Astrozyten exprimiert. Tenascine sind in der Regulation

von zahlreichen Prozessen involviert, insbesondere Zelldifferenzierung, Adhäsion, Migration, Neuritenwachstum und Myelinisierung.

Bisher gibt es wenig Erkenntnisse, die Tenascine in Zusammenhang mit Neuroinflammation bringen. Interessant ist allerdings, dass Tenascin C, ein enger Verwandter des Tenascin R, als Mediator bei der Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th17 Zellen fungiert [142].

Bemerkenswert ist auch, dass die Tenascin-Expression in humanen MS-Läsionen verringert ist, wohingegen schon 2009 gezeigt werden konnte, dass die Tenascine in EAE-Läsionen eher hochreguliert sind [143, 144]. Tenascin C defiziente Mäuse, bei denen eine EAE induziert wurde, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlich milderen Krankheitsverlauf. Außerdem wurden bei Tenascin C defizienten Mäusen eine verringerte Anzahl von Th1 Zellen festgestellt, sowie eine Funktionseinschränkung von Th17 Zellen [145].

Die genaue Funktion von Tenascin in der MS ist weitestgehend unklar. Im Kontext der bisherigen Ergebnisse scheint eine weitere Forschung mit Bezug zur MS jedoch sinnvoll.

K⁺ spannungsgesteuerter Ionenkanal, Subfamilie S1

Das *kcns1* Gen codiert für den K⁺ spannungsgesteuerten Ionenkanal, Subfamilie S1. Allgemein bekannt ist, dass K⁺ Kanäle wichtig für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials sind. Spannungsgesteuerte K⁺ Kanäle in Neuronen beeinflussen die Erregbarkeit und synaptische Übertragung. Während die K⁺ Kanäle in neurologischen Erkrankungen, wie beispielsweise der Epilepsie, eine entscheidende Rolle spielen, ist zu ihrem pathologischen Einfluss im Zusammenhang mit der MS eher weniger bekannt [146].

Kaliumkanäle, die bei einer Demyelinisierung von Axonen in der MS freigelegt werden, führen zu einer unkontrollierten Ausbreitung von Nervensignalen. K⁺ Kanal-Blocker, wie beispielsweise Aminopyridine, können diesen Zustand beeinflussen und bei MS-Patienten zu einer Besserung der neurologischen Symptomatik führen. Allerdings zeigen K⁺ Kanal-Blocker auch ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil [147].

Einen komplett anderen Ansatz bietet der Kv1.3 Kanal. Kv1.3 ist ein klassischer Kaliumkanal, der unter anderem auf Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird [148]. Selektive Kv1.3 Blocker schwächten den Krankheitsverlauf einer EAE ab und auch in Tiermodellen anderer autoimmunen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ I und RA, konnte ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf nachgewiesen werden [149].

Fc receptor-like S

Der *Fc receptor-like S* gehört zu der Familie der Fc Rezeptor ähnlichen Moleküle (FCRL). FCRL werden bevorzugt von B-Zellen exprimiert und konnten bei malignen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise systemischer Lupus erythematoses (SLE) und MS nachgewiesen werden [150]. Speziell bei der MS konnte der Fc-Rezeptor-like-3 (FCRL3) mit dem Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht werden. Die Expression von FCRL3 ist in der MS insgesamt herunterreguliert, allerdings ist die Expression in der Remissionsphase höher als in der akuten Phase der MS [151]. Der genaue Einfluss der FCRL auf die MS ist bisher ungeklärt.

Der hier hochregulierte FCRLS ist im menschlichen Genom nicht vorhanden, er findet sich ausschließlich im Mausgenom [150].

Osteopontin

Das *spp1* Gen codiert für *Secreted phosphoprotein 1* bzw. Osteopontin (OPN). OPN ist ein phosphoryliertes Glykoprotein der EZM. Es wird assoziiert mit zellvermittelter Immunität, Gewebereparatur, Zellüberleben und Entzündungsgeschehen. Insbesondere die T-Zell Stimulation scheint eine der Hauptaufgaben von OPN zu sein, weshalb es früher auch als *T cell activation gene-1* bezeichnet wurde.

Normalerweise ist die Expression von OPN im ZNS niedrig. Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise bei Alzheimer, Parkinson oder einem Apoplex, kann die Expression erhöht sein [152-154].

Auch MS-Patienten zeigen ein auffälliges Expressionsprofil von OPN. Der OPN-Spiegel bei SPMS-Patienten ist im Vergleich zu gesunden Patienten erhöht. Bei der RRMS ist der OPN-Spiegel im Schub höher als in der Remission [152]. Forschungen im EAE-Modell konnten zeigen, dass die Verabreichung von rekombinantem OPN bei Mäusen mit einer EAE zu einem Rückfall führte. Im Gegensatz dazu kann eine Verabreichung von Anti-OPN-Antikörpern den Verlauf der EAE abschwächen [155]. Ebenso ist der Verlauf einer MOG:35-55-induzierten EAE bei OPN-defizienten Mäusen deutlich schwächer ausgeprägt [153].

Chondroitin sulfate proteoglycan 4

Chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) wurde bisher nicht im direkten Zusammenhang mit der MS diskutiert, trotzdem soll es hier aufgrund seiner interessanten Funktion im ZNS nicht unerwähnt bleiben.

CSPG4 wird von NG2-Glia exprimiert. NG2-Glia sind besser bekannt als Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC). Aus OPCs entstehen Oligodendrozyten, welche die isolierende Myelinschichten im ZNS bilden. Einige der OPCs verbleiben im adulten ZNS. Hier haben sie die Aufgabe Myelinschäden zu beheben [156].

Es scheint also plausibel, dass die CSPG4 Expression im Rahmen der ZNS-destruktiven EAE hochreguliert ist.

Bisher wurde CSPG4 im Rahmen der MS kaum Aufmerksamkeit geschenkt. Deutlich prominenter ist es in der Malignomforschung. Bei Oligodendrogliomen, Astrozytomen und Glioblastomen ist CSPG4 hochreguliert und korreliert mit der Malignität [115]. Zudem wird es als Zielantigen einer chimärischen Antigen-Rezeptor T-Zell Therapie (CAR-T) diskutiert [116].

Insulin-like growth factor 1

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ist ein Polypeptidhormon, welches hauptsächlich in der Leber durch die Stimulierung von *growth hormone* (GH) synthetisiert wird. Im Gehirn wird es GH unabhängig von Neuronen exprimiert. In der Entwicklung des ZNS ist der IGF-1 Spiegel hoch, mit zunehmendem Alter

nimmt er jedoch wieder ab. Der Einfluss von IGF-1 auf ZNS spezifischen Funktionen ist mannigfaltig und umfasst unter anderem metabolische Funktionen, Zell Proliferation, Myelinisierung und Neuritenwachstum. Insbesondere bei traumatischen Hirnverletzungen ist IGF-1 erhöht [157-159]. Bei Patienten mit einer RRMS konnte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied im Serum IGF-1 Spiegel festgestellt werden [160]. Schaut man sich hingegen die Expressionsmuster direkt in ZNS Läsionen von MS Patienten an, decken sich die Ergebnisse mit unseren. Auch hier ist IGF-1 signifikant hochreguliert [161].

Da IGF-1 eine ausgeprägte neuroregenerative Funktion hat, liegt eine Verwendung in therapeutischer Absicht nahe. Bilbao et al. konnten zeigen, dass rekombinantes humanes IGF-1 die *in vitro* Proliferation von humanen und murinen Treg stimuliert. Außerdem kann eine kontinuierliche systemische Injektion von IGF-1 das Fortschreiten einer EAE im Mausmodell stoppen [162].

G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPR17 und GPR34)

G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPR) sind eine große Familie von transmembranen Proteinen. Die Aktivierung von diesen Rezeptoren erfolgt von extrazellulär über Liganden und löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Diese Eigenschaft macht GPR besonders für therapeutische Zwecke attraktiv.

GPR17 wird auf Neuronen und OPCs exprimiert. Es ist an der Differenzierung und Reifung von Oligodendrozyten beteiligt. Unter pathologischen Bedingungen, also nach ZNS Schäden, ist die Funktion von GPR17 komplex und noch nicht endgültig verstanden [163, 164]. Dziedzic et al. stellten 2020 ein mögliches Schema für den GPR17 anhängigen Reparaturmechanismus vor, welches hier in verkürzter Form wiedergegeben werden soll.

Direkt nach dem ZNS-Schaden kommt es zunächst zu einer erhöhten GPR17-Expression in geschädigten Neuronen. Zudem nimmt die Mortalität von GPR17-positiven Neuronen zu. Nach circa 48 Stunden ist GPR17 hauptsächlich auf Makrophagen am Rande der Läsion nachweisbar. Daraufhin proliferieren OPCs in der Läsion, ihre Differenzierung zu Oligodendrozyten wird aber durch die Expression von GPR17 zunächst verhindert. Die Reifung zu myelinisierenden

Oligodendrozyten ist erst später, nach Verlust der GPR17-Rezeptoren möglich. Abschließend wandern die zunächst randständigen GPR17⁺ Makrophagen in die Läsion ein [164].

GPR17 scheint also abhängig von Zeit und Ort sowohl in den demyelinisierenden als auch in den remyelinisierenden Prozess involviert zu sein. Ein gezielter Eingriff in die Prozesse des GPR17-Rezeptors kann ein möglicher Ansatz sein, um sowohl Demyelinisierung zu verhindern als auch Remyelinisierung zu beschleunigen [164].

Neben GPR17 konnten wir auch GPR34 als hochregulierten Rezeptor identifizieren. GPR34 wird vornehmlich auf Makrophagen und Mikroglia exprimiert. GPR34 findet im direkten Zusammenhang mit der MS bisher keine Erwähnung. Allerdings ist dieser Rezeptor erforderlich, um Mikroglia im ruhenden nicht phagozytierenden M0 Zustand zu halten, und scheint somit eine Relevanz für die intrathekale Immunreaktion zu haben [165].

4.3.3 B-Zell-Aggregate

Von den 17 Genen, die in den B-Zell-Aggregaten hochreguliert waren, konnten wir bei sechs Genen einen Bezug zur MS herstellen. Drei der Gene waren auch in den Infiltraten hochreguliert und werden deshalb im Kapitel „4.3.4 Gemeinsam exprimierte Gene“ gesondert betrachtet. Insgesamt war die Gruppe der B-Zell-Aggregate mit drei sequenzierten Samples und einer errechneten gesamt RNA-Menge von 36,3 ng unsere am schwächsten vertretene Gruppe.

Der niedrige RNA-Ertrag lässt sich dadurch erklären, dass nicht alle immunisierten Mäuse B-Zell-Aggregate ausbildeten bzw. nicht bei allen Mäusen, welche entdeckt werden konnten. Hinzu kommt, dass die Fläche von B-Zell-Aggregaten im Vergleich zu Infiltraten oder Lymphfollikeln sehr viel kleiner ist. Trotzdem konnten in den drei gewonnenen Samples eine gute RIN ($7,7 \pm 0,23$) erreicht werden. Außerdem zeigten die Sequenzierungsdaten der einzelnen B-Zell-Aggregat-Proben ein ähnliches Expressionsmuster auf, was für die Integrität der Daten spricht.

Tabelle 9: Übersicht hochregulierter Gene in den B-Zell-Aggregaten

Aggregate				
Gen	Protein	Bezug zur MS	Bezug zu anderen Erkrankungen	Anmerkungen
<i>il17f</i>	Interleukin 17F	✓	• Psoriasis [166]	
<i>mmp10</i>	Matrix Metalloproteinase 10	✓	• HCC [167] • Lyme Arthritis [168]	
<i>hsa11</i>	Hitzeschockprotein 1-like	✓	• Ovarialkarzinom [169] • männliche Infertilität [170]	
<i>gna14</i>	Guanine nucleotide binding protein, alpha 14	×	• HCC [171] • Hashimoto Thyreoiditis [172]	• beim HCC korreliert die GNA14 Expression mit der Infiltration von B-Zellen und Makrophagen [171]
<i>erich3</i>	Glutamate rich 3	×	• Magenkrebs [173]	
<i>cpne7</i>	Copine VII	×	-	
<i>clca3a2</i>	Chloride channel accessory 3A2	×	-	
<i>hbb-b2</i>	Hemoglobin, beta adult minor chain	×	-	• B-Zell Aggregate traten hauptsächlich als perivaskuläre Cluster auf. Die Blutgefäße wurden während der LCM nicht separiert, sondern zusammen mit den Aggregaten ausgeschnitten. So erklärten wir uns die Hochregulierung aller vier Hämoglobin Ketten.
<i>hbb-b1</i>	Hemoglobin, beta adult major chain	×	-	
<i>hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1	×	-	
<i>hba-a2</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 2	×	-	

Interleukin 17f

Zur Interleukin-17 (IL-17)-Zytokinfamilie zählt man insgesamt sechs verschiedene Zytokine (IL-17 A-F) [174]. IL-17 wird von Immunzellen wie beispielsweise CD4⁺ Th17 Zellen und CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen produziert [175, 176]. Die bisherige Forschung deutet darauf hin, dass IL-17 hauptsächlich über induzierte Freisetzung von weiteren proinflammatorischen Zytokinen eine lokale Entzündung hervorruft [177].

Zytokine der IL-17-Familie sind in mehreren autoimmunen Erkrankungen hochreguliert, hierzu gehören beispielsweise Psoriasis, RA, Sklerodermie, SLE und MS [178]. Im Serum und Liquor von RRMS-Patienten konnten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöhte IL-17 Spiegel nachgewiesen werden, außerdem korreliert die Produktion von IL-17 mit der Anzahl von aktiven Plaques bei MS-Patienten. Es liegt also nahe, dass die Freisetzung von IL-17 mit der Krankheitsaktivität der MS im Zusammenhang steht [179, 180]. Interessanterweise kann in IL-17-defizienten Mäusen zwar eine MOG:35-55-Peptid-EAE ausgelöst werden, allerdings läuft diese EAE mit einem deutlich verzögerten Beginn und einem verringerten Schweregrad ab [181].

Insbesondere die IL-17 produzierenden Th17 Zellen scheinen entscheidende Akteure bei der Pathogenese der MS zu sein. Während der akuten MS steigt die Anzahl der Th17-Zellen im peripheren Blut um das Siebenfache im Vergleich zur inaktiven MS an [182]. Eben solche Th17 Zellen sind in der Lage die BHS zu überwinden und sammeln sich während der aktiven Phase der MS im ZNS an [183].

Einleitend wurde in dieser Arbeit von einem möglichen Einfluss von Vitamin D Mangel auf die MS Ätiologie berichtet. Sotirchos et al. zeigten, dass die Supplementierung mit Vitamin D bei RRMS-Patienten eine immunmodulatorische Wirkung in Form einer verringerten Produktion von IL-17 durch CD4⁺ T-Zellen entfaltet [184]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die direkte Blockierung von IL-17. Secukinumab ist ein monoklonaler Antikörper, der IL17-A hemmt. Eine Behandlung von RRMS-Patienten mit Secukinumab führte zu einer Reduktion von MS-Läsionen im ZNS [185].

Im Fokus dieser Arbeit steht die Entwicklung von TLOs in der MS. TLOs weisen viele strukturelle und morphologische Gemeinsamkeiten zu SLOs auf. Entscheidend für die embryonale Entwicklung von SLOs sind *lymphoid tissue inducer* Zellen (LTi-Zellen). Die Vermutung liegt also nahe, dass eben diese Zellen auch in der Entwicklung von TLOs eine entscheidende Rolle übernehmen. Schropp et al. konnten zwar nicht nachweisen, dass LTi-Zellen im ZNS von mit

MP4 immunisierten Mäusen vorhanden sind, allerdings haben LTi-Zellen und Th17-Zellen einige Zelloberflächenmarker gemeinsam, sodass die Vermutung besteht, dass Th17-Zellen während der TLO-Entstehung zu einem Teil die Funktion von LTi-Zellen übernehmen. Tatsächlich konnten Schropp et al. in der gleichen Studie das Vorhandensein von Th17-Zellen im ZNS von Mäusen mit einer MP4-induzierten EAE nachweisen [186, 187].

Matrix Metalloproteinase-10 (MMP10)

Die MMPs sind eine Familie von 26 proteolytischen Enzymen. Von den 26 Vertretern sind 24 in Säugetieren nachweisbar [188]. Zu den Hauptaufgaben der MMPs gehört der Umbau der EZM. Dieser Umbau erfolgt über proteolytischen Abbau von EZM Komponenten, Abspaltung von membrangebundenen Rezeptormolekülen und Aktivierung von Zelloberflächenproteinen. Darüber hinaus sind sie in die Zellproliferation, Differenzierung und Migration involviert und haben einen regulatorischen Effekt auf andere Proteinase, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zellrezeptoren [189].

In unserer Studie konnten wir eine Hochregulation der MMP3 und MMP10 feststellen. Bei beiden handelt es sich um MMPs, welche zu den Stromelysinen gezählt werden [188].

Während die MMP3 sowohl im Infiltrat als auch im Aggregatstadium verstärkt exprimiert wurde, konnten wir für die MMP10 lediglich eine erhöhte Expression in den Aggregaten beobachten. Im Folgenden soll hauptsächlich auf die Rolle der MMP10 eingegangen werden, eine detaillierte Erläuterung zur MMP3 erfolgt im Kapitel „4.3.4 Gemeinsam exprimierte Gene“.

Zu der Rolle von MMP10 in Bezug auf die MS ist bisher wenig bekannt. MMP10 wird im ZNS auf Mikroglia, Monozyten und Makrophagen exprimiert, eine Expression durch T-Zellen ist fraglich [190, 191]. In der EAE geht ein erhöhtes Expressionsniveau von MMP10 mit einem schwereren Krankheitsverlauf einher [190, 191].

Bei MS-Patienten mit OKB konnte im Vergleich zu OKB-negativen Patienten erhöhte MMP10-Spiegel festgestellt werden [192]. Einen Zusammenhang

zwischen Krankheitsaktivität und MMP10-Expression scheint also denkbar. Diese These wird gestützt durch eine Studie von 2008, in der nachgewiesen werden konnte, dass die Gabe von Natalizumab zu einer Senkung der MMP3- und MMP10-Spiegel führt. Bei Natalizumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, welcher sich negativ auf die Migration von Immunzellen in Entzündungsherde auswirkt [193].

Hitzeschockprotein 1-like (HSPA1I)

HSP sind Proteine, die andere Proteine vor Denaturierung schützen, ihnen beim Erhalt ihrer Struktur helfen und initial bei der richtigen Faltung unterstützen. Proteine mit dieser Funktion werden auch als Chaperone bezeichnet [194, 195]. In unserem Fall waren nur HSP der HSP70-Familie verstärkt exprimiert. Diese Proteine sind hauptsächlich im Zytosol und Zellkern vorhanden. Trotz ihrer sehr ähnlichen Proteinstruktur übernehmen die verschiedenen Vertreter dieser Genfamilie unterschiedliche Aufgaben. Insgesamt kann man zu den Aufgaben den Abbau instabiler bzw. fehlgefalteter Proteine, Transport von Proteinen, die Auflösung von Proteinkomplexen und den Einfluss auf unterschiedliche regulatorische Prozesse zählen.

In den B-Zell-Aggregaten und Infiltraten waren die Gene *hspa1a* und *hspa1b* hochreguliert, welche für die Proteine Hsp70-1a und Hsp70-1b codieren. Exklusiv in den B-Zell-Aggregaten war zusätzlich das Gen *hspa1i* hochreguliert, welches für das Protein Hsp70-hom (bzw. Hsp70-1t) codiert. Insgesamt befinden sich alle drei Gene in der gleichen MHC-Klasse-III-Region [195, 196].

Während hier im Folgenden auf das Gen *hspa1i* eingegangen wird, sollen die Gene *hspa1a* und *hspa1b* im Kapitel „4.3.4 Gemeinsam exprimierte Gene“ im Detail besprochen werden.

Für *hsp70-hom* ist die Transkriptionsregulation und Funktion noch nicht umfassend verstanden und auch der Effekt auf die MS stößt auf widersprüchliche Meinungen [195]. Niino et al. zeigten 2001 das Genpolymorphismen der *hsp70* Gene in einer Gruppe japanischer MS Patienten keinen Einfluss auf die MS-Anfälligkeit oder den Schweregrad der Erkrankung hatten [197]. Im Gegensatz

hierzu stehen die Ergebnisse von Boiocchi et al. aus dem Jahre 2016. Hier konnte gezeigt werden, dass ein bestimmter Genpolymorphismus, (*hsp70-hom* rs2227956 C) des *hspa1l*-Gens, positiv mit dem MS-Risiko korreliert. Darüber hinaus zeigten MS-Patienten mit einem schwereren Krankheitsverlauf auch eine erhöhte *hsp70-hom*-Expression [198].

4.3.4 Gemeinsam exprimierte Gene

Von den 43 insgesamt hochregulierten Genen waren sechs Gene sowohl bei den B-Zell-Aggregaten als auch bei den B-Zell-Infiltraten verstärkt exprimiert. Wir konnten bei drei der sechs Gene einen Bezug zur MS herstellen.

Die Bezeichnung „Gemeinsam exprimierte Gene“ scheint zunächst einleuchtend, da beide Gruppen die Gene exprimieren. Betrachtet man jedoch die Entstehung von Aggregaten als dynamischen Prozess, in dem es zunächst zu einer Infiltration von Immunzellen und im Verlauf der Pathogenese zu einem B-Zell-Clustering mit anschließender Aggregatbildung kommt, wäre eine Bezeichnung als „durchgehend“ oder „langfristig“ exprimierte Gene ebenso denkbar.

Tabelle 10: Übersicht gemeinsam hochregulierter Gene in den B-Zell-Infiltraten und -Aggregaten

Gemeinsam exprimierte Gene				
Gen	Protein	Bezug zur MS	Bezug zu anderen Erkrankungen	Anmerkungen
<i>mmp3</i>	Matrix Metalloproteinase 3	✓	<ul style="list-style-type: none"> • RA [199] 	
<i>hspa1b</i>	Hitzeschockprotein in 1B	✓	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Low-Grade-Gliome</i> [200] • Schizophrenie [201] • männliche Infertilität [170] 	
<i>hspa1a</i>	Hitzeschockprotein in 1A	✓	<ul style="list-style-type: none"> • Plattenepithelkarzinom [202] • Ovarialkarzinom [169] 	
<i>iqsec3</i>	IQ motif and Sec7 domain 3	✗	<ul style="list-style-type: none"> • Autismus • Schizophrenie • bipolare Störung [203] 	<ul style="list-style-type: none"> • an der Regulierung von GABAergen Synapsen beteiligt [204]
<i>sfrp1</i>	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>	✗	<ul style="list-style-type: none"> • Sklerodermie [205] 	
<i>tm4sf5</i>	<i>transmembrane 4 superfamily member 5</i>	✗	<ul style="list-style-type: none"> • Pankreaskarzinom [206] • HCC [207] 	

Matrix Metalloproteinase 3 (MMP-3)

Wie im Kapitel „4.3.3 B-Zell Aggregate“ bereits beschrieben, handelt es sich bei MMP3 um eine Endopeptidase, welche der Subgruppe der Stromelysine zugeordnet wird.

Obwohl die MMP3 schon oft in den Fokus der MS-Forschung gerückt wurde, konnte ihre Funktion noch nicht abschließend geklärt werden. Die MMP3 nimmt an komplexen regulatorischen Vorgängen der EZM teil und scheint sowohl eine neuroprotektive als auch neurodestruktive Wirkung entfalten zu können.

RRMS-Patienten, die einen Schub entwickeln, zeigen erhöhte MMP3 Spiegel, welche sich jedoch innerhalb eines Monats wieder normalisieren. Erhöhte MMP3- Spiegel könnten am Abbau der EZM beteiligt sein und somit auch die BHS schädigen [208].

Dem gegenüber steht die Theorie, dass MMP3 nach einer pathologischen Demyelinisierung beschädigte Myelinreste entfernt und somit eine suffiziente Remyelinisierung ermöglicht. Hinzu kommt, dass die proteolytische Aktivität der MMP3 benötigt wird, um Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IGF1, zu aktivieren und deren neuroregeneratives Potential freizusetzen [209].

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MMP3 einen direkten neuroprotektiven Effekt hat, indem es eine Doxorubicin induzierte Fas-vermittelte neuronale Apoptose hemmt [210].

Insgesamt scheint MMP3 also eher eine protektive Rolle im Rahmen der MS einzunehmen. Diese Vermutung deckt sich auch mit einer Metaanalyse von 2020, in der das MMP3 Gen keine Assoziation mit dem MS-Erkrankungsrisiko zeigte [211].

Hitzeschockproteine (HSPA1a, HSPA1b)

Wie bereits im Kapitel „4.3.3 B-Zell-Aggregate“ beschrieben, handelt es sich bei HSP um molekulare Chaperone, die für die Proteinfaltung unverzichtbar sind. Die genauen Funktionen der HSP in der MS sind unklar, allerdings kann eine geringe Überexpression, insbesondere der *hsp70*-Genfamilie, Zellen vor Stress schützen. Eine stark erhöhte Expression kann jedoch zur MS-Pathogenese beitragen. Die eigentlich intrazellulären HSP können bei starker Überexpression

in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und dort mit Oberflächenrezeptoren interagieren, was wiederum zu einer erhöhten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, sowie einer Aktivierung von DZ führt [212-215].

Es konnte gezeigt werden, dass *hsa1a* und *hsa1b* im ZNS von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden verstärkt exprimiert werden [216]. Zudem weisen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie Monozyten aus dem peripheren Blut von MS-Patienten, eine erhöhte Proteinexpression von Hsp70-1a und Hsp70-1b auf [217]. In MS-Patienten konnte ebenfalls das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen HSP70 nachgewiesen werden. Die Antikörper waren bei PPMS deutlich stärker ausgeprägt als bei der RRMS und korrelierten insgesamt mit der Krankheitsaktivität [218].

Es spricht also vieles dafür, dass Proteine der *hsp70*-Familie in den immunologischen Prozess der MS involviert sind. Abschließend lässt sich jedoch nicht sagen, ob die HSP den Krankheitsverlauf insgesamt positiv oder negativ beeinflussen. Ein weiteres Indiz, welches eher für einen protektiven Effekt spricht, ist eine Studie von Zhang et al. in der gezeigt werden konnte, dass hitzeschockpräkonditionierte Ratten eine erhöhte *hsp70*-Expression entwickelten. Eine anschließend induzierte EAE zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlich milderen Verlauf [219].

5 Fazit/ Ausblick

Die erste Herausforderung in dieser Arbeit bestand in der RNA-Isolation aus Paraffin-eingebettetem Gewebe. Die ersten Versuche zeigten eine maximal fragmentierte RNA. Im Verlauf konnten wir unter Zuhilfenahme von alternativen Fixiermethoden eine Steigerung der RNA auf eine RIN von 4,8 erzielen.

Die eingangs gestellte Frage, ob es möglich ist, aus FFPE-Gewebe ausreichend stabile RNA für eine anschließende Gensequenzierung zu gewinnen, muss am ehesten mit „Nein“ beantwortet werden. Wir waren zwar in der Lage RNA bis zu einer relativ hohen RIN von 4,8 zu isolieren, allerdings waren die Ergebnisse nicht in jedem Versuch reproduzierbar.

Aufgrund der deutlich überlegenen RNA-Integrität und um unser primäres Ziel, die Genexpressionsanalysen, nicht aus den Augen zu verlieren, entschieden wir uns letztlich für kryofixiertes Gewebe.

Dennoch war die steigende Tendenz der RNA-Qualität in unserer Etablierung vielversprechend und bietet Anreiz für weiterführende Forschung. Gerade alternative, nicht quervernetzende Fixativa, wie beispielsweise HOPE, bieten einen Kompromiss zwischen der unkomplizierten Lagerbarkeit, sowie stabiler Gewebequalität, und könnten in Zukunft eine entscheidende Rolle bei der langfristigen Gewebekonservierung spielen.

Ein zentraler Aspekt in dieser Arbeit war die LCM. Hier sollte spezifisch zwischen B-Zell-Aggregaten und -Infiltraten differenziert werden. Um das Gewebe vor möglichen Schäden zu bewahren, entschieden wir uns gegen eine direkte Färbung auf dem LCM-Gewebeschnitt und führten eine IHC-Färbung von Parallelschnitten durch. Dieser Kompromiss beinhaltet allerdings eine topografische Verzerrung, da die per IHC gefärbten Parallelschnitte lediglich als Orientierungshilfe fungierten (siehe Abbildung 4: Schnittführung). Eine zweifelsfreie Identifizierung der Zelltypen während der LCM war somit nicht möglich. Trotzdem konnten wir in der anschließenden Datenanalyse ein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster zwischen der Gruppe der B-

Zell-Infiltrate und -Aggregate feststellen (siehe Kapitel 3.5 Grafische Auswertung der Genexpressionsanalyse), was für eine erfolgreiche Differenzierung während der LCM spricht.

Dennoch ist eine detailliertere Betrachtung der Zellentitäten während der LCM wünschenswert. Zukünftig könnten hierfür schonende Färbeverfahren in Betracht kommen, die direkt auf dem LCM-Gewebeschnitt durchgeführt werden. Die aktuelle Forschung hierzu ist vielversprechend, es konnten bereits *in situ* und IHC-Färbungen direkt auf LCM-Schnitten durchgeführt werden [92, 93].

Abschließendes Kernstück dieser Arbeit war die Identifizierung von hochregulierten Genen während der MP4-induzierten EAE. Dies war auch der Versuch, die lymphoide Neogenese als dynamischen Prozess genauer zu verstehen, und die Genexpression im Längsschnitt abzubilden. Deshalb betrachteten wir die Expressionsprofile in getrennten Gruppen, beginnend bei den B-Zell-Infiltraten als frühes Stadium der Immunantwort, über die gemeinsam bzw. durchgehend exprimierten Gene bis hin zu den B-Zell-Aggregaten, die als stark differenzierte Strukturen der Definition von TLOs am nächsten kommen.

Eingangs stellten wir uns die Fragen, ob es Gene gibt, die ausschließlich in den B-Zell-Aggregaten oder -Infiltraten hochreguliert sind und ob es Gemeinsamkeiten unter den beiden Genexpressionsprofilen gibt. Tatsächlich konnten wir für beide Gruppen spezifisch hochregulierte Gene ermitteln. Bei sechs Genen kam es zur Überschneidung der Expressionsprofile.

Von den insgesamt 43 hochregulierten Genen, wurden bereits 14 im Zusammenhang mit der MS erwähnt. Gerade die Gruppen der HSP, MMP sowie IL-17f scheinen von besonderer Relevanz zu sein und stehen bereits im Fokus der MS-Forschung.

Doch auch die verbleibenden 29 Gene, die bisher nicht mit MS in Verbindung gebracht wurden, zeigen teilweise interessante immunologische Eigenschaften und könnten als Anreiz für weiterführende Forschung dienen.

Die in dieser Arbeit ermittelte breite Liste von Genen, die während der MP4-induzierten EAE in Mäusen hochreguliert waren, muss bezüglich ihres Einflusses auf die MS noch präziser eingeordnet werden. Zunächst scheint hierfür eine ausführliche Literaturrecherche sinnvoll, um den Einfluss der einzelnen Gene auf neuroinflammatorische Erkrankungen näher zu beleuchten, aber auch, um die Einflüsse der Gene untereinander besser zu verstehen und ggf. Regelkreisläufe zu detektieren, die in die Entstehung und Progression solcher Erkrankungen involviert sind. Im Kapitel „Diskussion“ wurde hierauf bereits teilweise eingegangen. Dieser Ansatz sollte in die Tiefe verfolgt werden, um die vielversprechendsten Gene herauszufiltern. Des Weiteren könnte man den Einfluss einzelner Gene mittels Knockout-Mäusen näher betrachten, wie es beispielsweise schon beim OPN geschehen ist (siehe Kapitel 4.3.2. B-Zell-Infiltrate). Auch die hier bereits zum Einsatz gekommene Methode der IHC, oder ähnliche Färbemethoden, können wichtige Auskünfte über die Expressionsmuster einzelner Gene geben.

Schlussendlich muss jedoch der Sprung vom Organismus Maus in den humanen Organismus gewagt werden. Das Instrument der EAE kann die Forschung am Menschen nicht ersetzen.

Interessant wäre ein ähnlicher Ansatz, wie der in dieser Arbeit beschriebene. Eine LCM mit anschließender Genexpressionsanalyse von den TLOs bei SPMS Patienten könnte aufschlussreiche neue Erkenntnisse bringen. Anschließend wäre eine IHC oder Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von ausgewählten Genexpressionen denkbar. Allerdings sollte man bei humanem Gewebe bedenken, dass es sich um eine sehr rare und wertvolle Ressource handelt. Ein äußerst sparsamer und gezielter Umgang ist hier essenziell.

6 Zusammenfassung/ Abstract

Bei Multipler Sklerose (MS) handelt es sich um eine entzündungsvermittelte neurogenerative Erkrankung mit progressiver Demyelinisierung von Nervenfasern und axonaler Schädigung. Bei Patienten, die an einer speziellen Form der MS (der sekundär chronisch progredienten MS, SPMS) erkrankten, konnten Entzündungsinfiltrate in den Meningen nachgewiesen werden, die in ihrem Aufbau lymphoidem Gewebe ähnelten. Das Auftreten dieser Infiltrate war mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert. Das Mausmodell der B-Zell-abhängigen MP4-induzierten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zeigt in den Kleinhirnen der Mäuse Infiltrate, die in ihrem Aufbau und der Struktur den Infiltraten beim Menschen ähneln.

Wir nutzten die MP4-induzierte EAE, um die Mechanismen der Erkrankungsentstehung und Progression besser zu verstehen. Ziel dieser Arbeit war es zunächst intakte und stabile Ribonukleinsäuren (RNA) aus den Infiltraten der Mäuse zu isolieren. Anschließend wurden Gene identifiziert, die während verschiedener Stadien der zerebralen Entzündungsreaktion in den B-Zell-Infiltraten bzw. -Aggregaten hochreguliert waren.

Wir verglichen die Möglichkeiten der RNA-Isolation bei Paraffin-eingebettetem Gewebe und kryofixiertem Gewebe. Um die Vergleichbarkeit der Qualitäts- und Quantitätsanalyse zu gewährleisten, wurde für jede Probe eine RNA Integritätsnummer (RIN) ermittelt.

Wir führten eine *Laser Capture Microdissection* (LCM) und anschließende Gensequenzierung der zerebralen B-Zell-Infiltrate und -Aggregate bei Mäusen durch, bei denen eine MP4-abhängige EAE ausgelöst wurde. Die MOG:35-55-induzierte EAE wurde als B-Zell-unabhängiges Kontrollmodell verwendet. Des Weiteren verglichen wir die Ergebnisse mit den Expressionsprofilen von sekundär lymphatischen Organen (SLOs).

Die RNA-Isolation aus kryofixiertem Gewebe war der aus Paraffin-eingebettetem Gewebe überlegen. Bei Paraffin-eingebettetem Gewebe konnten wir eine maximale RIN von 4,8 erreichen. Bei kryofixiertem Gewebe war eine RIN von 8,2 möglich.

Insgesamt konnten wir 43 Gene herausfiltern, die im Vergleich zu den Kontrollgruppen hochreguliert waren. Von diesen 43 Genen waren 32 in den B-Zell-Infiltraten und 17 in den B-Zell-Aggregaten hochreguliert. Sechs Gene waren sowohl in B-Zell-Infiltraten als auch -Aggregaten hochreguliert.

Die Entwicklung von ektope lymphatischen Strukturen (ELS) im zentralen Nervensystem (ZNS) ist ein komplexer und bisher wenig verstandener Prozess. In dieser Studie beobachteten wir 43 Gene, die während der Entwicklung von B-Zell-Infiltraten in den Kleinhirnen von MP4-immunisierten Mäusen signifikant hochreguliert waren. Von diesen Genen wurden bereits 14 im Zusammenhang mit der MS erwähnt und sind zum Teil Gegenstand aktiver Forschung. Doch auch die verbleibenden Gene zeigen teilweise vielversprechende immunologische Eigenschaften. Die genaue Rolle der Gene und ggf. ihr Einfluss untereinander bieten großen Raum für weiterführende Forschung.

7 Literaturverzeichnis

1. Ramagopalan, S.V., et al., *Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways*. Lancet Neurol, 2010. **9**(7): p. 727-39.
2. Petersen, G., et al., [*Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance*]. Nervenarzt, 2014. **85**(8): p. 990-8.
3. Dobson, R. and G. Giovannoni, *Multiple sclerosis – a review*. European Journal of Neurology, 2019. **26**(1): p. 27-40.
4. Brain, W.R., *Critical Review: Disseminated Sclerosis*. QJM: An International Journal of Medicine, 1930. **os-23**(91): p. 343-391.
5. Palacios, N., et al., *Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence*. Annals of epidemiology, 2011. **21**(7): p. 536-542.
6. Flachenecker, P., et al., *MS-Register in Deutschland – Design und erste Ergebnisse der Pilotphase*. Der Nervenarzt, 2005. **76**(8): p. 967-975.
7. Willer, C.J., et al., *Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12877-82.
8. Hemminki, K., et al., *Risk for multiple sclerosis in relatives and spouses of patients diagnosed with autoimmune and related conditions*. neurogenetics, 2009. **10**(1): p. 5-11.
9. Beecham, A.H., et al., *Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis*. Nat Genet, 2013. **45**(11): p. 1353-60.
10. Colonna, M., et al., *A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function*. Immunol Today, 2000. **21**(9): p. 428-31.
11. Björkström, N.K., et al., *CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells*. Blood, 2012. **120**(17): p. 3455-65.
12. Hollenbach, J.A. and J.R. Oksenberg, *The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2015. **64**: p. 13-25.
13. Gale, C.R. and C.N. Martyn, *Migrant studies in multiple sclerosis*. Prog Neurobiol, 1995. **47**(4-5): p. 425-48.
14. Simpson, S., et al., *Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2011. **82**(10): p. 1132-1141.
15. Munk Nielsen, N., et al., *Multiple sclerosis among first- and second-generation immigrants in Denmark: a population-based cohort study*. Brain, 2019. **142**(6): p. 1587-1597.
16. Pierrot-Deseilligny, C. and J.C. Souberbielle, *Vitamin D and multiple sclerosis: An update*. Mult Scler Relat Disord, 2017. **14**: p. 35-45.
17. Cantorna, M.T., et al., *Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells*. Nutrients, 2015. **7**(4): p. 3011-21.
18. Danner, O.K., et al., *Vitamin D3 Suppresses Class II Invariant Chain Peptide Expression on Activated B-Lymphocytes: A Plausible Mechanism for*

- Downregulation of Acute Inflammatory Conditions*. J Nutr Metab, 2016. **2016**: p. 4280876.
19. Fawaz, L., et al., *Comparative effect of 25(OH)D3 and 1,25(OH)2D3 on Th17 cell differentiation*. Clin Immunol, 2016. **166-167**: p. 59-71.
 20. Ramagopalan, S.V., et al., *Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D*. PLoS Genet, 2009. **5(2)**: p. e1000369.
 21. Pohl, D., *Epstein-Barr virus and multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2009. **286(1-2)**: p. 62-4.
 22. Lang, H.L.E., et al., *A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis*. Nature Immunology, 2002. **3(10)**: p. 940-943.
 23. Morandi, E., et al., *EBV Infection Empowers Human B Cells for Autoimmunity: Role of Autophagy and Relevance to Multiple Sclerosis*. J Immunol, 2017. **199(2)**: p. 435-448.
 24. Degelman, M.L. and K.M. Herman, *Smoking and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis using the Bradford Hill criteria for causation*. Mult Scler Relat Disord, 2017. **17**: p. 207-216.
 25. Hedström, A.K., et al., *Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis*. Neurology, 2009. **73(9)**: p. 696-701.
 26. Van Dyken, P. and B. Lacoste, *Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier*. Front Neurosci, 2018. **12**: p. 930.
 27. Riccio, P. and R. Rossano, *Nutrition facts in multiple sclerosis*. ASN Neuro, 2015. **7(1)**.
 28. Wunsch, M., et al., *The enteric nervous system is a potential autoimmune target in multiple sclerosis*. Acta Neuropathologica, 2017. **134(2)**: p. 281-295.
 29. Rudolf M. Schmidt, F.A.H., *Multiple Sklerose*. Elsevier. 2012. 417.
 30. Wiendel Heinz, K.B.C., *Multiple Sklerose - Klinik, Diagnostik und Therapie*. 2010. 223.
 31. Panginikkod, S. and L.A. Rukmangadachar, *Uhthoff Phenomenon*, in *StatPearls*. 2020, StatPearls Publishing
Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
 32. Kurtzke, J.F., *On the origin of EDSS*. Mult Scler Relat Disord, 2015. **4(2)**: p. 95-103.
 33. Westerlind, H., et al., *A significant decrease in diagnosis of primary progressive multiple sclerosis: A cohort study*. Mult Scler, 2016. **22(8)**: p. 1071-9.
 34. Pearce, J.M.S., *Historical Descriptions of Multiple Sclerosis*. European Neurology, 2005. **54(1)**: p. 49-53.
 35. Bjartmar, C., et al., *Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients*. Ann Neurol, 2000. **48(6)**: p. 893-901.
 36. Trapp, B.D., et al., *Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis*. N Engl J Med, 1998. **338(5)**: p. 278-85.
 37. Lassmann, H., *Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2013. **333(1-2)**: p. 1-4.

38. Garg, N. and T.W. Smith, *An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis*. *Brain and behavior*, 2015. **5**(9): p. e00362-e00362.
39. Kleinschnitz, C., et al., *Multiple-Sklerose-Update zur Pathophysiologie und neuen immuntherapeutischen Ansätzen*. *Der Nervenarzt*, 2007. **78**(8): p. 883-911.
40. Sospedra, M. and R. Martin, *Immunology of multiple sclerosis*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 683-747.
41. Stangel, M., *Autoimmun. erkrankungen in der Neurologie*. 2012. **277** p. : p. 2-11.
42. McCoy, L., I. Tsunoda, and R.S. Fujinami, *Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation*. *Autoimmunity*, 2006. **39**(1): p. 9-19.
43. Pacheco, Y., et al., *Bystander activation and autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2019. **103**: p. 102301.
44. Loma, I. and R. Heyman, *Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment*. *Current neuropharmacology*, 2011. **9**(3): p. 409-416.
45. Ruocco, G., et al., *T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis*. *Clin Sci (Lond)*, 2015. **129**(4): p. 291-303.
46. Kuerten, S., et al., *[The significance of a B cell-dependent immunopathology in multiple sclerosis]*. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2011. **79**(2): p. 83-91.
47. Ziemssen, T., K. Akgün, and W. Brück, *Molecular biomarkers in multiple sclerosis*. *Journal of neuroinflammation*, 2019. **16**(1): p. 272-272.
48. Walsh, M.J. and W.W. Tourtellotte, *Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis*. *J Exp Med*, 1986. **163**(1): p. 41-53.
49. Wekerle, H., *B cells in multiple sclerosis*. *Autoimmunity*, 2017. **50**(1): p. 57-60.
50. Sindic, C.J., P. Monteyne, and E.C. Laterre, *The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 1994. **54**(1-2): p. 75-80.
51. Meca-Lallana, J.E., et al., *Plasma exchange for steroid-refractory relapses in multiple sclerosis: an observational, MRI pilot study*. *Clin Ther*, 2013. **35**(4): p. 474-85.
52. Schilling, S., et al., *Plasmaaustausch bei steroidresistenten Multiple-Sklerose-Schüben*. *Der Nervenarzt*, 2006. **77**(4): p. 430-438.
53. Keegan, M., et al., *Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange*. *Lancet*, 2005. **366**(9485): p. 579-82.
54. Lucchinetti, C., et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. *Ann Neurol*, 2000. **47**(6): p. 707-17.
55. Syed, Y.Y., *Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis*. *CNS Drugs*, 2018. **32**(9): p. 883-890.
56. Hauser, S.L., et al., *B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(7): p. 676-88.

57. Hauser, S.L., et al., *Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis*. New England Journal of Medicine, 2016. **376**(3): p. 221-234.
58. Montalban, X., et al., *Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2017. **376**(3): p. 209-220.
59. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2003. 552.
60. Picker, L.J. and E.C. Butcher, *Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 561-91.
61. Pippi, E., et al., *Tertiary Lymphoid Structures: Autoimmunity Goes Local*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 1952-1952.
62. Aloisi, F. and R. Pujol-Borrell, *Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 205-17.
63. Magliozzi, R., et al., *Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2004. **148**(1-2): p. 11-23.
64. Serafini, B., et al., *Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis*. Brain Pathol, 2004. **14**(2): p. 164-74.
65. Howell, O.W., et al., *Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis*. Brain, 2011. **134**(9): p. 2755-2771.
66. Magliozzi, R., et al., *A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis*. Annals of Neurology, 2010. **68**(4): p. 477-493.
67. Kooi, E.J., et al., *Meningeal inflammation is not associated with cortical demyelination in chronic multiple sclerosis*. J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(9): p. 1021-8.
68. Magliozzi, R., et al., *Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology*. Brain, 2007. **130**(Pt 4): p. 1089-104.
69. Gold, R., C. Lington, and H. Lassmann, *Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research*. Brain, 2006. **129**(8): p. 1953-1971.
70. Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry, *OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS*. The Journal of experimental medicine, 1933. **58**(1): p. 39-53.
71. Jules Freund. The Journal of Immunology, 1963. **90**(3): p. NP.
72. Kabat, E.A., et al., *Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys*. J Exp Med, 1951. **93**(6): p. 615-33.
73. Bernard, C.C.A. and P.R. Carnegie, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice: Immunologic Response to Mouse Spinal Cord and Myelin Basic Proteins*. The Journal of Immunology, 1975. **114**(5): p. 1537.
74. Schluesener, H.J. and H. Wekerle, *Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations*. The Journal of Immunology, 1985. **135**(5): p. 3128.

75. Kuerten, S. and D.N. Angelov, *Comparing the CNS morphology and immunobiology of different EAE models in C57BL/6 mice - a step towards understanding the complexity of multiple sclerosis*. *Ann Anat*, 2008. **190**(1): p. 1-15.
76. Kuerten, S., et al., *MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice*. *J Neuroimmunol*, 2006. **177**(1-2): p. 99-111.
77. Glatigny, S. and E. Bettelli, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS)*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018. **8**(11).
78. Oliver, A.R., G.M. Lyon, and N.H. Ruddle, *Rat and human myelin oligodendrocyte glycoproteins induce experimental autoimmune encephalomyelitis by different mechanisms in C57BL/6 mice*. *J Immunol*, 2003. **171**(1): p. 462-8.
79. Kuerten, S., et al., *Fundamental differences in the dynamics of CNS lesion development and composition in MP4- and MOG peptide 35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Clin Immunol*, 2008. **129**(2): p. 256-67.
80. Elliott, E.A., et al., *Treatment of experimental encephalomyelitis with a novel chimeric fusion protein of myelin basic protein and proteolipid protein*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(7): p. 1602-12.
81. Kuerten, S., et al., *MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum*. *J Neuroimmunol*, 2007. **189**(1-2): p. 31-40.
82. Kuerten, S., et al., *Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response*. *Acta Neuropathol*, 2012. **124**(6): p. 861-73.
83. Pitzalis, C., et al., *Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(7): p. 447-62.
84. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. *BMC Mol Biol*, 2006. **7**: p. 3.
85. Yang, L., et al., *Bacterial adaptation during chronic infection revealed by independent component analysis of transcriptomic data*. *BMC Microbiol*, 2011. **11**: p. 184.
86. Raychaudhuri, S., J.M. Stuart, and R.B. Altman, *Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series*. *Pac Symp Biocomput*, 2000: p. 455-66.
87. Deng, W., et al., *HemI: a toolkit for illustrating heatmaps*. *PLoS One*, 2014. **9**(11): p. e111988.
88. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol*, 2014. **15**(12): p. 550.
89. Amini, P., et al., *An optimised protocol for isolation of RNA from small sections of laser-capture microdissected FFPE tissue amenable for next-generation sequencing*. *BMC Mol Biol*, 2017. **18**(1): p. 22.
90. Cerritelli, S.M. and R.J. Crouch, *Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes*. *Febs j*, 2009. **276**(6): p. 1494-505.

91. Akane, H., et al., *Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats*. J Toxicol Sci, 2013. **38**(3): p. 431-43.
92. He, J., et al., *Immunohistochemical staining, laser capture microdissection, and filter-aided sample preparation-assisted proteomic analysis of target cell populations within tissue samples*. Electrophoresis, 2013. **34**(11): p. 1627-36.
93. Tjernlund, A., et al., *In Situ Staining and Laser Capture Microdissection of Lymph Node Residing SIV Gag-Specific CD8+ T cells--A Tool to Interrogate a Functional Immune Response Ex Vivo*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0149907.
94. Peters, M.A.M., et al., *Serotonin and Dopamine Receptor Expression in Solid Tumours Including Rare Cancers*. Pathol Oncol Res, 2020. **26**(3): p. 1539-1547.
95. Cai, B.H., et al., *Synergistic activation of the NEU4 promoter by p73 and AP2 in colon cancer cells*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 950.
96. Silvestri, I., et al., *Sialidase NEU4 is involved in glioblastoma stem cell survival*. Cell Death Dis, 2014. **5**(8): p. e1381.
97. Paul, C.P., et al., *Transcriptional profiling of medulloblastoma in children*. Journal of Neurosurgery, 2003. **99**(3): p. 534-541.
98. Farlow, J.L., et al., *Whole-Exome Sequencing in Familial Parkinson Disease*. JAMA Neurol, 2016. **73**(1): p. 68-75.
99. Xu, X., et al., *miRNA-mRNA Associated With Survival in Endometrial Cancer*. Front Genet, 2019. **10**: p. 743.
100. Chidambaran, V., et al., *Systematic Review and Meta-Analysis of Genetic Risk of Developing Chronic Postsurgical Pain*. J Pain, 2020. **21**(1-2): p. 2-24.
101. Rostamzadeh, D., et al., *Update on Fc receptor-like (FCRL) family: new immunoregulatory players in health and diseases*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2018. **22**(6): p. 487-502.
102. Lamort, A.-S., et al., *Osteopontin as a Link between Inflammation and Cancer: The Thorax in the Spotlight*. Cells, 2019. **8**(8): p. 815.
103. Procaccini, C., et al., *Role of metabolism in neurodegenerative disorders*. Metabolism, 2016. **65**(9): p. 1376-1390.
104. Marucci, G., et al., *GPR17 receptor modulators and their therapeutic implications: review of recent patents*. Expert Opin Ther Pat, 2019. **29**(2): p. 85-95.
105. Shimizu, H., et al., *Identification of a homozygous frameshift variant in RFLNA in a patient with a typical phenotype of spondylocarpotarsal synostosis syndrome*. J Hum Genet, 2019. **64**(5): p. 467-471.
106. Gay, O., F. Nakamura, and J. Baudier, *Refilin holds the cap*. Commun Integr Biol, 2011. **4**(6): p. 791-5.
107. Li, J., et al., *Whole-exome sequencing identifies a variant in TMEM132E causing autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss DFNB99*. Hum Mutat, 2015. **36**(1): p. 98-105.
108. Lane, J.M., et al., *Genome-wide association analyses of sleep disturbance traits identify new loci and highlight shared genetics with neuropsychiatric and metabolic traits*. Nat Genet, 2017. **49**(2): p. 274-281.

109. Sanchez-Pulido, L. and C.P. Ponting, *TMEM132: an ancient architecture of cohesin and immunoglobulin domains define a new family of neural adhesion molecules*. *Bioinformatics*, 2018. **34**(5): p. 721-724.
110. Okuda, H., et al., *LRGUK1 is part of a multiprotein complex required for manchette function and male fertility*. *Faseb j*, 2017. **31**(3): p. 1141-1152.
111. Wang, L., et al., *GDF3 Protects Mice against Sepsis-Induced Cardiac Dysfunction and Mortality by Suppression of Macrophage Pro-Inflammatory Phenotype*. *Cells*, 2020. **9**(1).
112. Li, Z., et al., *The mutational burden and oligogenic inheritance in Klippel-Feil syndrome*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020. **21**(1): p. 220.
113. Wang, X., et al., *Diagnostic and prognostic significance of mRNA expressions of apolipoprotein A and C family genes in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. *J Cell Biochem*, 2019. **120**(10): p. 18246-18265.
114. Martin, N.A., et al., *Orthologous proteins of experimental de- and remyelination are differentially regulated in the CSF proteome of multiple sclerosis subtypes*. *PloS one*, 2018. **13**(8): p. e0202530-e0202530.
115. Schiffer, D., et al., *The Significance of Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) in Human Gliomas*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(9).
116. Harrer, D.C., J. Dörrie, and N. Schaft, *CSPG4 as Target for CAR-T-Cell Therapy of Various Tumor Entities-Merits and Challenges*. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(23): p. 5942.
117. LeBleu, V.S., et al., *Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis*. *Nat Med*, 2013. **19**(2): p. 227-31.
118. Celestino, R., et al., *CRABP1, C1QL1 and LCN2 are biomarkers of differentiated thyroid carcinoma, and predict extrathyroidal extension*. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 68.
119. Qiu, X., et al., *Profiles of differentially expressed genes and overexpression of NEBL indicates a positive prognosis in patients with colorectal cancer*. *Mol Med Rep*, 2018. **17**(2): p. 3028-3034.
120. Sałkowska, A., et al., *Identification of Novel Molecular Markers of Human Th17 Cells*. *Cells*, 2020. **9**(7).
121. Pal, J., et al., *Epigenetically silenced GNG4 inhibits SDF1 α /CXCR4 signaling in mesenchymal glioblastoma*. *Genes Cancer*, 2016. **7**(3-4): p. 136-47.
122. Kishibuchi, R., et al., *DNA methylation of GHSR, GNG4, HOXD9 and SALL3 is a common epigenetic alteration in thymic carcinoma*. *Int J Oncol*, 2020. **56**(1): p. 315-326.
123. Soundarapandian, M.M., et al., *Zfp488 promotes oligodendrocyte differentiation of neural progenitor cells in adult mice after demyelination*. *Sci Rep*, 2011. **1**: p. 2.
124. Shui, X.L., et al., *Blockade of IL-17 alleviated inflammation in rat arthritis and MMP-13 expression*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017. **21**(10): p. 2329-2337.
125. Kim, M. and D.J. Kim, *GFRA1: A Novel Molecular Target for the Prevention of Osteosarcoma Chemoresistance*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(4).

126. Ma, W.R., et al., *Impact of GFRA1 gene reactivation by DNA demethylation on prognosis of patients with metastatic colon cancer*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(2): p. 184-198.
127. Yu, W., et al., *Upregulation of GPR34 expression affects the progression and prognosis of human gastric adenocarcinoma by PI3K/PDK1/AKT pathway*. Histol Histopathol, 2013. **28**(12): p. 1629-38.
128. McGeachie, M.J., et al., *CTNNA3 and SEMA3D: Promising loci for asthma exacerbation identified through multiple genome-wide association studies*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(6): p. 1503-1510.
129. Gallego-Martinez, A. and J.A. Lopez-Escamez, *Genetic architecture of Meniere's disease*. Hear Res, 2019: p. 107872.
130. Kang, H.G., et al., *SPON2 Is Upregulated through Notch Signaling Pathway and Promotes Tumor Progression in Gastric Cancer*. Cancers (Basel), 2020. **12**(6).
131. Žlajpah, M., et al., *Differential expression of extracellular matrix-related genes DCN, EPHA4, FN1, SPARC, SPON2 and SPP1 in colorectal carcinogenesis*. Oncol Rep, 2019.
132. Hayashizaki, Y., *The Riken mouse genome encyclopedia project*. C R Biol, 2003. **326**(10-11): p. 923-9.
133. Chung, J., et al., *Genome-wide pleiotropy analysis of neuropathological traits related to Alzheimer's disease*. Alzheimers Res Ther, 2018. **10**(1): p. 22.
134. Li, L.W., et al., *Expression of esophageal cancer related gene 4 (ECRG4), a novel tumor suppressor gene, in esophageal cancer and its inhibitory effect on the tumor growth in vitro and in vivo*. Int J Cancer, 2009. **125**(7): p. 1505-13.
135. Deng, P., et al., *Downregulation and DNA methylation of ECRG4 in gastric cancer*. Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 4019-4028.
136. de las Casas-Engel, M., et al., *Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2301-10.
137. Min, A.K.T., et al., *Therapeutic potential of anti-VEGF receptor 2 therapy targeting for M2-tumor-associated macrophages in colorectal cancer*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2020.
138. El Oussini, H., et al., *Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(3): p. 465-80.
139. Glanz, V.Y., et al., *Sialidase activity in human pathologies*. Eur J Pharmacol, 2019. **842**: p. 345-350.
140. Miyagi, T. and K. Yamaguchi, *Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions*. Glycobiology, 2012. **22**(7): p. 880-896.
141. Pan, X., et al., *Neuraminidases 3 and 4 regulate neuronal function by catabolizing brain gangliosides*. Faseb j, 2017. **31**(8): p. 3467-3483.
142. Jakovcevski, I., et al., *Tenascins and inflammation in disorders of the nervous system*. Amino Acids, 2013. **44**(4): p. 1115-1127.
143. Zhao, C., et al., *Up-regulation of oligodendrocyte precursor cell alphaV integrin and its extracellular ligands during central nervous system remyelination*. J Neurosci Res, 2009. **87**(15): p. 3447-55.

144. Gutowski, N.J., J. Newcombe, and M.L. Cuzner, *Tenascin-R and C in multiple sclerosis lesions: relevance to extracellular matrix remodelling*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1999. **25**(3): p. 207-14.
 145. Momčilović, M., et al., *Tenascin-C deficiency protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neuroimmunol*, 2017. **302**: p. 1-6.
 146. Allen, N.M., et al., *Genetic potassium channel-associated epilepsies: Clinical review of the K(v) family*. *Eur J Paediatr Neurol*, 2020. **24**: p. 105-116.
 147. Al-Sabi, A., et al., *A Rational Design of a Selective Inhibitor for Kv1.1 Channels Prevalent in Demyelinated Nerves That Improves Their Impaired Axonal Conduction*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017. **60**(6): p. 2245-2256.
 148. Wang, X., et al., *Kv1.3 Channel as a Key Therapeutic Target for Neuroinflammatory Diseases: State of the Art and Beyond*. *Front Neurosci*, 2019. **13**: p. 1393.
 149. Rangaraju, S., et al., *Kv1.3 potassium channels as a therapeutic target in multiple sclerosis*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2009. **13**(8): p. 909-924.
 150. Davis, R.S., *Fc Receptor-Like Molecules*. *Annual Review of Immunology*, 2007. **25**(1): p. 525-560.
 151. Cui, X., C.M. Liu, and Q.B. Liu, *FCRL3 promotes IL-10 expression in B cells through the SHP-1 and p38 MAPK signaling pathways*. *Cell Biol Int*, 2020.
 152. Comabella, M., et al., *Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis*. *Journal of Neuroimmunology*, 2005. **158**(1): p. 231-239.
 153. Chabas, D., et al., *The Influence of the Proinflammatory Cytokine, Osteopontin, on Autoimmune Demyelinating Disease*. *Science*, 2001. **294**(5547): p. 1731.
 154. Zhou, Y., et al., *Osteopontin as a candidate of therapeutic application for the acute brain injury*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. **n/a**(n/a).
 155. Clemente, N., et al., *Role of Anti-Osteopontin Antibodies in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. *Frontiers in immunology*, 2017. **8**: p. 321-321.
 156. Butt, A.M., M. Papanikolaou, and A. Rivera, *Physiology of Oligodendroglia*, in *Neuroglia in Neurodegenerative Diseases*, A. Verkhratsky, et al., Editors. 2019, Springer Singapore: Singapore. p. 117-128.
 157. Madathil, S.K., H.N. Evans, and K.E. Saatman, *Temporal and regional changes in IGF-1/IGF-1R signaling in the mouse brain after traumatic brain injury*. *J Neurotrauma*, 2010. **27**(1): p. 95-107.
 158. Bach, M.A., et al., *Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1991. **10**(1): p. 43-8.
 159. Madathil, S.K. and K.E. Saatman, *Frontiers in Neuroengineering IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome*, in *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*, F.H. Kobeissy, Editor. 2015, CRC Press/Taylor & Francis
- © 2015 by Taylor & Francis Group, LLC.: Boca Raton (FL).

160. Akcali, A., B. Bal, and B. Erbagci, *Circulating IGF-1, IGFB-3, GH and TSH levels in multiple sclerosis and their relationship with treatment*. Neurological Research, 2017. **39**(7): p. 606-611.
161. Zeis, T., et al., *Molecular pathology of Multiple Sclerosis lesions reveals a heterogeneous expression pattern of genes involved in oligodendroglioneogenesis*. Experimental Neurology, 2018. **305**: p. 76-88.
162. Bilbao, D., et al., *Insulin-like growth factor-1 stimulates regulatory T cells and suppresses autoimmune disease*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(11): p. 1423-35.
163. Alavi, M.S., G. Karimi, and A. Roohbakhsh, *The role of orphan G protein-coupled receptors in the pathophysiology of multiple sclerosis: A review*. Life Sciences, 2019. **224**: p. 33-40.
164. Dziedzic, A., et al., *The GPR17 Receptor-A Promising Goal for Therapy and a Potential Marker of the Neurodegenerative Process in Multiple Sclerosis*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(5): p. 1852.
165. Schöneberg, T., et al., *The G protein-coupled receptor GPR34 - The past 20 years of a grownup*. Pharmacol Ther, 2018. **189**: p. 71-88.
166. Fletcher, J.M., et al., *IL-17 in inflammatory skin diseases psoriasis and hidradenitis suppurativa*. Clin Exp Immunol, 2020. **201**(2): p. 121-134.
167. Scheau, C., et al., *The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma*. Anal Cell Pathol (Amst), 2019. **2019**: p. 9423907.
168. Crowley, J.T., et al., *Matrix metalloproteinase-10 is a target of T and B cell responses that correlate with synovial pathology in patients with antibiotic-refractory Lyme arthritis*. J Autoimmun, 2016. **69**: p. 24-37.
169. De Andrade, W.P., et al., *HSPA1A, HSPA1L and TRAP1 heat shock genes may be associated with prognosis in ovarian epithelial cancer*. Oncol Lett, 2020. **19**(1): p. 359-367.
170. Kohan, L., O. Tabiee, and N. Sepahi, *HSPA1L and HSPA1B gene polymorphisms and haplotypes are associated with idiopathic male infertility in Iranian population*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2019. **240**: p. 57-61.
171. Yu, T., S. Lu, and W. Xie, *Downregulation of GNA14 in hepatocellular carcinoma indicates an unfavorable prognosis*. Oncology letters, 2020. **20**(1): p. 165-172.
172. Brčić, L., et al., *Genome-wide association analysis suggests novel loci for Hashimoto's thyroiditis*. J Endocrinol Invest, 2019. **42**(5): p. 567-576.
173. Chen, Q., et al., *Long non-coding RNA ERICH3-AS1 is an unfavorable prognostic factor for gastric cancer*. PeerJ, 2020. **8**: p. e8050.
174. Waisman, A., J. Hauptmann, and T. Regen, *The role of IL-17 in CNS diseases*. Acta Neuropathologica, 2015. **129**(5): p. 625-637.
175. Marks, B.R., et al., *Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1125-32.
176. Huber, M., et al., *IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 247-60.
177. Kolls, J.K. and A. Lindén, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.

178. Monin, L. and S.L. Gaffen, *Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(4).
179. Schofield, C., et al., *Characterization of IL-17AA and IL-17FF in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis*. Bioanalysis, 2016. **8**(22): p. 2317-2327.
180. Hedegaard, C.J., et al., *T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis*. Immunology, 2008. **125**(2): p. 161-9.
181. Komiyama, Y., et al., *IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 566-73.
182. Durelli, L., et al., *T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta*. Ann Neurol, 2009. **65**(5): p. 499-509.
183. Kebir, H., et al., *Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2009. **66**(3): p. 390-402.
184. Sotirchos, E.S., et al., *Safety and immunologic effects of high- vs low-dose cholecalciferol in multiple sclerosis*. Neurology, 2016. **86**(4): p. 382-90.
185. Havrdová, E., et al., *Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study*. J Neurol, 2016. **263**(7): p. 1287-95.
186. Grogan, J.L. and W. Ouyang, *A role for Th17 cells in the regulation of tertiary lymphoid follicles*. Eur J Immunol, 2012. **42**(9): p. 2255-62.
187. Schropp, V., et al., *Contribution of LTi and T(H)17 cells to B cell aggregate formation in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis*. J Neuroinflammation, 2019. **16**(1): p. 111.
188. de Jong, J.M., et al., *Remodeling of the interstitial extracellular matrix in white matter multiple sclerosis lesions: Implications for remyelination (failure)*. Journal of Neuroscience Research, 2020. **98**(7): p. 1370-1397.
189. Baker, A.H., D.R. Edwards, and G. Murphy, *Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities*. Journal of Cell Science, 2002. **115**(19): p. 3719.
190. Toft-Hansen, H., et al., *Key Metalloproteinases Are Expressed by Specific Cell Types in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(8): p. 5209.
191. Bar-Or, A., et al., *Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis*. Brain, 2003. **126**(12): p. 2738-2749.
192. Castellazzi, M., et al., *Multiplex Matrix Metalloproteinases Analysis in the Cerebrospinal Fluid Reveals Potential Specific Patterns in Multiple Sclerosis Patients*. Frontiers in neurology, 2018. **9**: p. 1080-1080.
193. Balasa, R., et al., *The Matrix Metalloproteinases Panel in Multiple Sclerosis Patients Treated with Natalizumab: A Possible Answer to Natalizumab Non-Responders*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2018. **17**(6): p. 464-472.
194. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 571-9.

195. Daugaard, M., M. Rohde, and M. Jäättelä, *The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions*. FEBS Letters, 2007. **581**(19): p. 3702-3710.
196. Milner, C.M. and R.D. Campbell, *Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes*. Immunogenetics, 1990. **32**(4): p. 242-51.
197. Niino, M., et al., *Heat shock protein 70 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis*. Tissue Antigens, 2001. **58**(2): p. 93-96.
198. Boiocchi, C., et al., *Heat shock protein 70-hom gene polymorphism and protein expression in multiple sclerosis*. Journal of Neuroimmunology, 2016. **298**: p. 189-193.
199. Park, J.K., et al., *Therapeutic potential of CKD-506, a novel selective histone deacetylase 6 inhibitor, in a murine model of rheumatoid arthritis*. Arthritis research & therapy, 2020. **22**(1): p. 176-176.
200. Zhang, M., et al., *Novel Immune-Related Gene Signature for Risk Stratification and Prognosis of Survival in Lower-Grade Glioma*. Front Genet, 2020. **11**: p. 363.
201. Kowalczyk, M., et al., *Association of HSPA1B Polymorphisms with Paranoid Schizophrenia in a Polish Population*. Neuromolecular Med, 2020. **22**(1): p. 159-169.
202. Chen, Q., et al., *LASP1 promotes proliferation, metastasis, invasion in head and neck squamous cell carcinoma and through direct interaction with HSPA1A*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(2): p. 1626-1639.
203. Ellis, S.E., et al., *Transcriptome analysis of cortical tissue reveals shared sets of downregulated genes in autism and schizophrenia*. Transl Psychiatry, 2016. **6**(5): p. e817.
204. Kim, S., et al., *Loss of IQSEC3 Disrupts GABAergic Synapse Maintenance and Decreases Somatostatin Expression in the Hippocampus*. Cell Rep, 2020. **30**(6): p. 1995-2005.e5.
205. Luo, Y. and R. Xiao, *The Epigenetic Regulation of Scleroderma and Its Clinical Application*, in *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity*, C. Chang and Q. Lu, Editors. 2020, Springer Singapore: Singapore. p. 375-403.
206. Park, S., et al., *Targeting TM4SF5 with anti-TM4SF5 monoclonal antibody suppresses the growth and motility of human pancreatic cancer cells*. Oncol Lett, 2020. **19**(1): p. 641-650.
207. Xu, B., et al., *Clinicopathological significance of TM4SF5 expression in human hepatocellular carcinoma tissues*. Oncol Lett, 2019. **17**(6): p. 5187-5192.
208. Kanesaka, T., et al., *Serum matrix metalloproteinase-3 levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 2006. **77**(2): p. 185-188.
209. Škuljec, J., et al., *Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination of Brain White and Gray Matter*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2011. **70**(9): p. 758-769.
210. Wetzelsch, M., G.A. Rosenberg, and L.A. Cunningham, *Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and matrix metalloproteinase-3 regulate neuronal*

- sensitivity to doxorubicin-induced apoptosis*. European Journal of Neuroscience, 2003. **18**(5): p. 1050-1060.
211. Mohammadhosayni, M., et al., *Matrix metalloproteinases (MMPs) family gene polymorphisms and the risk of multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis*. BMC neurology, 2020. **20**(1): p. 218-218.
212. Asea, A., et al., *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 435-42.
213. Lehner, T., et al., *Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 594-603.
214. Floto, R.A., et al., *Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5*. Science, 2006. **314**(5798): p. 454-8.
215. Turturici, G., et al., *Positive or Negative Involvement of Heat Shock Proteins in Multiple Sclerosis Pathogenesis: An Overview*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2014. **73**(12): p. 1092-1106.
216. Chiricosta, L., et al., *Could the Heat Shock Proteins 70 Family Members Exacerbate the Immune Response in Multiple Sclerosis? An in Silico Study*. Genes, 2020. **11**(6): p. 615.
217. Mansilla, M.J., et al., *Up-regulation of inducible heat shock protein-70 expression in multiple sclerosis patients*. Autoimmunity, 2014. **47**(2): p. 127-33.
218. Chiba, S., et al., *Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis*. Journal of the Neurological Sciences, 2006. **241**(1): p. 39-43.
219. Zhang, J.F., et al., *[Protective effects of heat shock preconditioning on the experimental autoimmune encephalomyelitis rats]*. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2007. **9**(6): p. 563-6.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

A

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APZ	Antigen-präsentierende-Zelle

B

BHS	Blut-Hirn-Schranke
B6	C57BL/6

C

CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
B6-Maus	C57BL/6-Maus

D

DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zellen

E

EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELS	Ektope lymphatische Strukturen
EZM	Extrazelluläre Matrix

F

FCRL	Fc Rezeptor ähnliche Moleküle
FDZ	Follikulär dendritische Zellen
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

G

GH	<i>Growth Hormone</i>
GPR	G Protein gekoppelter Rezeptor

H

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEV	Hochendotheliale Venolen
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HOPE	<i>Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect</i>
HSP	Hitzeschockprotein
I	
IHC	Immunhistochemie
K	
KFA	Komplettes Freund-Adjuvans
KIR	<i>Killer-Immunoglobulin-Like Receptors</i>
L	
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i>
LTi	<i>Lymphoid Tissue Inducer</i>
M	
MAC	Membranangriffskomplex
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MALT	mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MBP	Basisches Myelinprotein/ <i>myelin basic protein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MP4	MBP-PLP Fusionsprotein
MS	Multiple Sklerose
N	
NGS	Normales Ziegenserum
NK	Natürliche Killerzellen
O	
OKB	Oligoklonale Banden
OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
OPN	Osteopontin

OT	Objektträger
P	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Hauptkomponente (<i>Principal Component</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>Principal Component Analysis</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PLO	Primär lymphatische Organe
PLP	Proteolipid Protein
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
R	
RA	Rheumatoide Arthritis
rhMOG	Rekombinantes humanes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
RIN	RNA Integritätsnummer
Rlog	Regularisierte Log-Transformation
RNA	Ribonukleinsäure
RRMS	Relapsing-Remitting Multiple Sklerose
S	
SGC	Sialylierte Glykokonjugate
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SLO	Sekundär lymphatische Organe
SPMS	Sekundär chronisch progrediente Multiple Sklerose
T	
TLO	Tertiär lymphatische Organe
Treg	Regulatorische T-Zellen
U	
UVB	Ultraviolettstrahlung B
Z	
ZNS	Zentrales Nervensystem
5HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte/Software	20
Tabelle 2: Reagenzien/Kits	20
Tabelle 3: Antikörper	22
Tabelle 4: Etablierung der B-Zell Färbung - Antikörperkonzentrationen	36
Tabelle 5: Etablierung der T-Zell Färbung - Antikörperkonzentrationen.....	36
Tabelle 6: Übersicht: Versuche zur Etablierung der RNA Isolation	41
Tabelle 7: Übersicht RNA-Isolation.....	44
Tabelle 8: Übersicht hochregulierter Gene in den B-Zell-Infiltraten.....	60
Tabelle 9: Übersicht hochregulierter Gene in den B-Zell-Aggregaten.....	70
Tabelle 10: Übersicht gemeinsam hochregulierter Gene.....	75

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schema – Studiendesign.....	19
Abbildung 2 Arbeitsschema: RNA-Isolation.....	23
Abbildung 3 Anordnung der Gewebeschnitte auf den OTs.....	29
Abbildung 4 Schnittführung	30
Abbildung 5 Krankheitsverlauf der MP4-Mäuse	42
Abbildung 6 Immunhistochemische Färbung von B220 ⁺ B-Zellen.....	43
Abbildung 7 PCA	46
Abbildung 8 Heatmap – Übersicht	48
Abbildung 9 Heatmap B-Zell Infiltrate	51
Abbildung 10 Heatmap B-Zell Aggregate	52
Abbildung 11 Heatmap: Gemeinsam exprimierte Gene.....	53

IV Danksagung

Zu Beginn möchte ich Frau Prof. Dr. Stefanie Kürten danken, meiner Doktormutter, für ihre außergewöhnliche Betreuung über einen Zeitraum, der so viel länger dauerte als zunächst geplant. Dafür, dass Sie trotz allem stets verständnisvolle Geduld zeigte und durch motivierende Gespräche diese Arbeit vorantrieb. Aber auch für Ihre Rolle als Mentorin, dafür, dass sie bei mir eine Begeisterung für naturwissenschaftliche Forschung entfachen konnte und damit nicht nur diese Arbeit maßgeblich prägte, sondern auch meinen Werdegang als Mediziner.

Als nächste möchte ich Frau Verena Schropp danken. Meiner Betreuerin, die fast zeitgleich mit mir in die Arbeitsgruppe kam und wir quasi gemeinsam in das Projekt hineinwachsen konnten. Auch hier gebührt der Dank nicht nur ihrer fachlichen Expertise, sondern auch dem persönlichen und freundschaftlichen Austausch über die Jahre.

Großer Dank gebührt natürlich auch der gesamten Arbeitsgruppe Kürten, die mich von Anfang an freundlich aufgenommen hatte. Besonders danken möchte ich Alla Ganscher, Brigitte Treffny und Erna Kleinschroth, die mir in ihren jeweiligen Bereichen die Grundlagen der Laborarbeit mit auf den Weg geben konnten.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Süleyman Ergün, weil ich in dem von ihm geführten Institut die Möglichkeit hatte, dieses Projekt durchzuführen. Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Friebe dafür, dass er sich sehr spontan und unkompliziert dazu bereit erklärt hat, die Zweitkorrektur für diese Arbeit zu übernehmen.

In diesem Zuge möchte ich auch Frau Prof. Dr. Leane Lehmann danken. Zum einen für die Übernahme der Drittkorrektur und weil ich bei ihr am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie einen großen Teil der methodischen Arbeit durchführen durfte. Hier darf auch Herr René Hauptstein nicht unerwähnt bleiben, der mich stets geduldig über diesen langen Zeitraum im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie betreute.

Auch möchte ich dem Team der Core Unit Systemmedizin Würzburg danken, die sich der Sequenzierung und Datenanalyse angenommen haben und stets mit einem offenen Ohr und hilfreichen Antworten zur Verfügung standen. Hier möchte ich auch Herrn Dr. Erik T. Frank und Herrn Florens Fischer erwähnen, die mir bei vielen Fragen zur Datenanalyse und zum wissenschaftlichen Arbeiten immer zuverlässige Ansprechpartner waren.

Ganz besonders großer Dank gilt meinen Freunden, die zum Teil mit ähnlichen Projekten beschäftigt, stets ein Quell des persönlichen Austauschs und Motivation waren. Und die mir die Möglichkeit gaben, abseits dieser Arbeit ein wenig Zerstreuung zu finden und neue Kraft zu schöpfen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meiner Freundin Sabrina Stüb meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Für ihre Geduld, fürs Zuhören, fürs Motivieren, aber auch für Ihre ganz praktischen Tipps und Hilfestellungen und für ihren immerwährenden Optimismus. Dafür, dass sie während dieser Zeit immer für mich da waren.

VI Veröffentlichungen

Publikation [187]:

Schropp, V., Rohde, J., Rovituso, D.M. *et al.*, *Contribution of LT α and T(H)17 cells to B cell aggregate formation in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis*. J Neuroinflammation, 2019. **16**(1): p. 111.