

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann**

**Pathomechanismen von Antikörpern gegen Aquaporin 4 in einem Tiermodell für die  
Neuromyelitis Optica**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Christian Ritter**

**aus Coburg**

**Würzburg, Mai 2013**

Referent: Prof. Dr. Claudia Sommer

Koreferent: Prof. Dr. Anna-Lena Sirén

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08. November 2013

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Neuromyelitis optica (NMO) .....	1
1.2. Die Rolle des NMO-Immunglobulins .....	2
1.2.1. Komplementaktivierung durch die Bindung von NMO-IgG an AQP4 .....	3
1.2.2. Herabregulierung von AQP4 durch Bindung von NMO-IgG .....	4
1.2.3. Störung der Glutamatomöstate durch NMO-IgG .....	5
1.2.4. Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke durch NMO-IgG .....	6
1.3. NMO Tiermodelle .....	6
1.4. Problemstellung und Zielsetzung .....	6
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Tierhaltung und Testung .....	8
2.1.1. Tierhaltung.....	8
2.1.2. Verhaltenstestung .....	8
2.1.3. Anästhesie .....	10
2.2. Operative Methoden .....	10
2.2.1. Intrathekale Katheterimplantation .....	10
2.2.2. Kraniale Schraubenimplantation .....	13
2.3. Elektrophysiologie .....	14
2.3.1. Theoretische Grundlagen .....	14
2.3.2. Messung somatosensibel evozierter Potentiale (SEP) .....	16
2.3.3. Messung motorisch evozierter Potentiale (MEP) .....	16
2.4. Bildgebende Verfahren.....	17
2.4.1. Kontrastmittelgabe.....	17
2.4.2. MR-Bildgebung .....	17
2.5. Histologie .....	17
2.5.1. Gewebeentnahme .....	17
2.5.2. Immunhistochemische Färbungen .....	18
2.5.3. Quantitative Analyse .....	20
2.6. Versuchsgruppen und Versuchsdurchführung.....	21
2.6.1. Versuchsgruppen.....	21

2.6.2. Versuchsdurchführung .....	22
2.7. Statistische Analyse .....	23
3. Ergebnisse.....	23
3.1. Auswertung der Verhaltenstestung .....	23
3.1.1. Auswertung des NMO-Scores.....	24
3.1.2. Auswertung des Gewichts .....	27
3.1.3. Auswertung der Laufleistung (RotaRod) .....	29
3.2. Auswertung Elektrophysiologie.....	32
3.2.1. Auswertung der SEP .....	32
3.2.2. Auswertung der MEP.....	34
3.3. Auswertung der Bildgebung .....	36
3.4. Auswertung der Einzelfärbungen .....	37
3.4.1. Auswertung Human-IgG-Färbung.....	37
3.4.2. Auswertung AQP4-Färbung .....	41
3.4.3. Auswertung GFAP-Färbungen .....	45
3.4.4. Auswertung EAAT2-Färbung .....	53
3.4.5. Auswertung Komplement-Färbung .....	57
4. Diskussion.....	58
4.1. Beurteilung der Verhaltenstestung .....	59
4.2. Beurteilung der elektrophysiologischen Untersuchungen und MR- tomographischen Bildgebung .....	61
4.3. Beurteilung der histologischen Ergebnisse .....	62
4.3.1. Verminderte AQP4-Expression.....	63
4.3.2. Verminderte EAAT2-Expression .....	64
4.3.3. Kein Astrozytenverlust durch NMO-IgG Bindung.....	65
4.3.4. NMO-IgG und Komplementaktivierung.....	66
4.4. Schlussfolgerung und Ausblick .....	67
5. Zusammenfassung.....	69
6. Literaturverzeichnis.....	70

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Neuromyelitis optica (NMO)

Die Neuromyelitis optica (NMO) ist eine schwerwiegende Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) die mit rezidivierenden Optikusneuritiden und Querschnittsmyelitiden einhergeht. Bereits im Jahre 1870 beschrieb der englische Neurologe Clifford Allbutt ein gemeinsames Auftreten einer Entzündung der Sehnerven und einer akuten Myelitis (Allbutt 1871). 20 Jahre später beschäftigte sich der Franzose Eugène Devic mit diesem Erkrankungsbild und versuchte die bisherigen Beobachtungen anhand von Fallbeispielen zu systematisieren (Devic 1894). Aufgrund dieser Verdienste Devics ist die NMO auch heute noch unter dem Namen Devic-Syndrom geläufig.

Die Erkrankung galt lange Zeit als eine Variante der Multiplen Sklerose (MS) und war vor allem in asiatischen Ländern als optikospinale MS bekannt. Typisch ist v.a. eine langstreckige Entzündung des Rückenmarks und schwerwiegende, rezidivierende, zum Teil auch beidseitige Optikusneuritiden mit oftmals persistierender Visusminderung. Auch zerebral können Läsionen auftreten. Diese bleiben jedoch in der Regel klinisch stumm (Pittock et al. 2006). Die Abgrenzung zur MS erfolgte zunächst klinisch. So ist bei der NMO der Verlauf häufig fulminanter (Wingerchuk and Weinshenker 2003), spontane Remissionen sind seltener und zumeist inkomplett. Mit Hilfe neuer histopathologischer und laborchemischer Erkenntnisse gelang es, die NMO als eigene Krankheitsentität genauer zu umschreiben und von der MS weiter abzugrenzen. So wurde in humanpathologischen Studien in NMO-typischen Läsionen eine gefäßassoziierte Ablagerung von Immunglobulinen mit aktiviertem Komplement beschrieben (Misu et al. 2007; Roemer et al. 2007). Diese perivaskulären, entzündlichen Demyelinisierungen gingen mit einem ausgeprägten axonalen Schaden in der weißen und der grauen Substanz des Rückenmarks einher. Zusätzlich zeigten sich kavitäre Nekrosen, Oligodendrozytenverluste und inflammatorische Infiltrate bestehend aus Makrophagen, B-Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Lucchinetti et al. 2002).

Laborchemisch wurden Antikörper („NMO-IgG“) in Seren betroffener Patienten entdeckt, die als Biomarker mit einer hohen Sensitivität von 73% und einer Spezifität von 91% das Vorhandensein einer NMO detektieren (Lennon et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass diese Antikörper (AK) spezifisch an murine Arteriolen und Kapillaren im Bereich der Pia mater des Hirn- und Rückenmarkgewebes binden. Als Hauptzielantigen wurde Aquaporin 4 (AQP4) ermittelt (Lennon et al. 2005), ein osmotisch regulierter Wasserkanal, der bevorzugt an abluminalen Astrozytenendfüßen in der Nähe der Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird (Amiry-Moghaddam and Ottersen 2003). Der Nachweis von Aquaporin-4-Autoantikörpern (AQP4-AK) bei von der NMO betroffenen Patienten gelang mittels indirekter Immunfluoreszenz an AQP-4-transfizierten humanen HEK-Zelllinien mit einer Spezifität von bis nahezu 100% (Takahashi et al. 2007).

Unter Einbeziehung der histopathologischen und laborchemischen Erkenntnisse konnten neue Diagnosekriterien für die NMO erarbeitet werden (Wingerchuk et al. 2006). Zur Diagnosestellung sind eine Optikusneuritis und eine Myelitis obligate klinische Befunde, die von 2 der 3 folgenden Kriterien ergänzt werden müssen: 1) ein atypisches cMRT, das nicht die PATY-Kriterien für die MS erfüllt (4 hyperintense Läsionen im MRT des ZNS in der T2-Wichtung mit mindestens einem periventrikulär gelegenen Herd); 2) eine spinale Läsion im spinalen MRT über mindestens 3 Wirbelkörper-Segmente; 3) der Nachweis von NMO-IgG im Serum.

### *1.2. Die Rolle des NMO-Immunglobulins*

NMO-Patienten profitierten klinisch von einer Plasmapherese sowie einer B-Zell Depletion (Keegan et al. 2002; Cree et al. 2005). Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass sich in den histopathologischen Läsionen eine starke Komplementaktivierung sowie Ablagerungen von Immunkomplexen fanden, stellte sich die Frage nach der pathophysiologischen Relevanz von NMO-IgG. Im zentralen Nervensystem (ZNS) befinden sich die Regionen mit erhöhter AQP4-Expression perivaskulär im N. opticus, an der Glia limitans und rosettenartig im Cortex, am Boden des 4. Ventrikels, sowie in der grauen und weißen Substanz des Rückenmarks. Diese Stellen korrelierten gut mit den histopathologisch beschriebenen Läsionsorten bei NMO Patienten (Roemer et al. 2007). Somit rückte AQP4 als potentiell Zielantigen in

den Mittelpunkt der Pathogeneseforschung der NMO. Statt den Oligodendrozyten und der Myelinscheide wurden die Astrozyten nun als primäre Zielstrukturen und Ursprung einer immunologischen Entzündung im Rahmen einer möglichen autoimmunen Genese betrachtet. Im Folgenden werden einige kürzlich entdeckte Mechanismen näher beschrieben, die eine pathophysiologische Wirkung der AQP4-AK wahrscheinlich machen.

### ***1.2.1. Komplementaktivierung durch die Bindung von NMO-IgG an AQP4***

NMO-IgG zählt zur IgG1 Untergruppe und ist somit ein potenter Komplementaktivator. NMO-IgG konnte nach erfolgreicher in-vitro Antigenbindung an AQP4 Komplement aktivieren. Über die klassische Komplementkaskade wurde die Zellmembran der Zielzelle soweit geschädigt, dass es zu einer Lyse der Zielzelle kam (Hinson et al. 2007; Sabater et al. 2009). Die Aktivierung von C3 Konvertase durch NMO IgG erhöhte weiterhin die astrozytäre Produktion und Sekretion von Komplementkomponenten und proinflammatorischen Zytokinen (Morgan and Gasque 1996). Die Freisetzung von C3a und C5a Fragmenten fördert die vaskuläre Permeabilität und die Bindung von C3b an die Zellmembran erleichtert die Phagozytose. C5a verursacht einen chemotaktischen Gradienten, der die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen fördert und somit zu einer ausgedehnten Infiltration von Leukozyten führt, die die charakteristischen, massiv zelldestruierenden Läsionen der NMO induzieren können (Lucchinetti et al. 2002; Roemer et al. 2007). Infolge der Aktivierung des Komplementsystems wäre vor allem während akuten Schüben bei NMO-Patienten eine Veränderung der Konzentration der Komplementfaktoren im Serum zu vermuten. Es konnte nachgewiesen werden, dass in solch akuten Schubphasen die gesamte Komplementaktivität (CH50) in Seren NMO-IgG positiver Patienten mit ausgedehnten ZNS Läsionen höher war als in seronegativen NMO oder MS Patienten (Doi et al. 2009). Astrozyten haben auf ihrer Zellmembran das Protein CD59. Dieser Rezeptor ist in der Lage, aktivierte C5b Subgruppen zu binden und somit die Zelle vor dem terminalen Lysekomplex C5b-9 zu schützen (Yang et al. 1993; Morgan and Gasque 1996; Spiller et al. 1996). Bei entsprechend hoher C5b Konzentration ist jedoch eine Vulnerabilität der Astrozyten gegenüber dem terminalen Lysekomplex gegeben. Die astrozytäre

Plasmamembran ist nicht gegen die frühen Komponenten der Komplementkaskade wie C3a geschützt, die durch die Bindung von NMO-IgG an AQP4 aktiviert werden (Spiller et al. 1996). Insgesamt kann eine spezifische Vulnerabilität der Astrozyten als Träger des Zielantigens bei der NMO angenommen werden, was dann zu einer ausgeprägten Depletion der Astrozyten in den Läsionsarealen führt (Saadoun et al. 2010; Chan et al. 2012). Es kann weiterhin vermutet werden, dass es im Rahmen eines ‚Bystander-Effekts‘ und durch die generelle Entzündungsaktivierung und Attraktion von Entzündungszellen auch zu einer Schädigung der benachbarten Neurone und insbesondere der Oligodendrozyten kommt.

### **1.2.2. Herabregulierung von AQP4 durch Bindung von NMO-IgG**

*In-vitro* induzierte NMO-IgG durch die Bindung an AQP4 eine Modulation der Dichte der Kanalexpression. Die AQP4-Expression wurde in Astrozytenkulturen (Hinson et al. 2008) wie auch in nicht-neuronalen, AQP4-exprimierenden HEK-Zellen (Hinson et al. 2007) verringert. Dieses Phänomen einer Internalisierung des AQP4-Proteins wird möglicherweise durch die Bindung von AQP4-AK an zwei benachbarte AQP4 Moleküle ausgelöst, die genaueren Mechanismen hierfür sind allerdings noch nicht geklärt. Dieser Hypothese ist allerdings umstritten, da andere keinen Hinweis auf eine Internalisierung von AQP4 in primären Astrozyten und *in-vivo* nach intrazerebraler Injektion von NMO-IgG im Mausmodell fanden (Ratelade et al. 2011).

Die Herabregulierung von AQP4 wurde auch in autopsiertem Nervengewebe von NMO-Patienten mit positivem Nachweis von AQP4-AK beschrieben. Es wurde gezeigt, dass neben den klassischen Läsionsorten im Rückenmark und im Nervus opticus (Lucchinetti et al. 2002) in zirkumventrikulären Organen, die durch ein fenestriertes Endothel gekennzeichnet sind, die Immunreaktivität von AQP4 vermindert wurde bzw. verloren ging. Interessanterweise lag in diesen Läsionen keine Demyelinisierung bzw. Gewebeerstörung vor, sodass daraus gefolgert wird, dass der Verlust von AQP4 der zelldestruktiven Aktivierung des Immunsystems vorangeht (Roemer et al. 2007). Aufgrund ihrer Permeabilität für IgG und der hohen Expressionsdichte von AQP4 könnten zirkumventrikuläre Organe eine der ersten Kontaktstellen mit NMO-IgG



darstellen. Eine Herabregulierung von AQP4 in den perivaskulären Astrozyten könnte sich zudem auf die Wasserhomöostase im ZNS auswirken.

### **1.2.3. Störung der Glutathomöostase durch NMO-IgG**

Vor kurzem wurde in-vitro eine Kopplung von AQP4 und dem Glutamattransporter EAAT2 in Form eines Membrankomplexes postuliert. Die Inkubation von AQP4-AK mit AQP4-transfizierten HEK-Zellen bewirkte neben der Herabregulation der Expression von AQP4 auch die der membrangebundenen Anteile von EAAT2 (Hinson et al. 2008). Da dieser Glutamattransporter hauptsächlich für die Beseitigung von extrazellulärem Glutamat im ZNS Gewebe verantwortlich ist, könnte diese Internalisierung zu einer toxischen Entkopplung der Glutamat-Homöostase im ZNS führen. Auch in entzündlichen Läsionen von NMO Patienten wurde eine verminderte Expression von EAAT2 in Bereichen beschrieben, in denen auch AQP4 vermindert exprimiert war (Hinson et al. 2008). Neurone und Oligodendrozyten sind sensibler gegenüber der Toxizität von Glutamat als Astrozyten (McDonald et al. 1998). Eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration könnte zu einer übermäßigen Stimulation von Glutamatrezeptoren führen. Solch eine zytotoxische Umgebung könnte zu einer Verstärkung der komplementvermittelten Schäden an Neuronen und Oligodendrozyten führen, bzw. auch komplementunabhängig eine Schädigung im Gewebe hervorrufen.

In einer weiteren Arbeit (Marignier et al. 2010) konnte gezeigt werden, dass Inkubation mit AQP4-AK in einem Zellkulturmodell mit Astrozyten und Oligodendrogliazellen tatsächlich zu einer Herabregulierung von EAAT2 führt, und dass es funktionell durch die erhöhte Glutamatkonzentration sekundär zu einer Schädigung von Oligodendroglia kommt. Dem gegenüber konnte eine andere Arbeit durch Inkubation von primären Astrozyten mit NMO IgG keinen Hinweis auf eine relevante Internalisierung des EAAT2 Transporters oder eine Glutamatoxizität feststellen (Ratelade et al. 2011). Dieser potentielle pathogene Mechanismus bleibt weiterhin in der Fachwelt umstritten.

#### **1.2.4. Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke durch NMO-IgG**

In vitro Versuche zeigten, dass NMO-IgG positive Patientenserum in der Lage sein können die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu beeinflussen. Hierbei wurde in einem Zellkulturmodell die physiologischen Bedingungen der BHS nachgestellt. Nach Zugabe der AQP4-AK wurde eine verminderte AQP4-Dichte an den astrozytären Endfüßchen sowie eine erhöhte Permeabilität der BHS beobachtet (Vincent et al. 2008). Des Weiteren wurde in Anwesenheit der Komplementfaktoren C3a und C5a die Migration von Granulozyten durch das Endothel der BHS gefördert. Die Bindung von NMO-IgG an AQP4 induzierte im Zellkulturmodell eine Aktivierung und Degranulierung von natürlichen Killerzellen mit damit einhergehendem Untergang der Astrozyten.

#### **1.3. NMO Tiermodelle**

Kürzlich wurde die Wirkung von NMO-IgG und von rekombinanten AQP4-AK (AQP4-rABs) im Tierversuch mit Hilfe des Modells der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) bei weiblichen Lewis-Ratten untersucht. Mittels autoreaktiver T-Zell-Blasten wurde die Blut-Hirn Schranke der Versuchstiere geöffnet (sog. adoptive-Transfer EAE) (Sommer et al. 2005; Boettger et al. 2010) und NMO-IgG bzw. AQP4-rABs systemisch appliziert. Hierbei stellte sich heraus, dass die Immunglobuline von NMO-Patienten und AQP4-rABs eine Aktivierung von Komplement induzieren und es damit zu einer Depletion der Astrozyten und der AQP4-Expression an den NMO-typischen Stellen kommt. Des Weiteren wurden die Krankheitssymptome der EAE hierdurch weiter verstärkt (Bennett et al. 2009; Bradl et al. 2009). Ein für die NMO charakteristisches histologisches Bild mit Depletion von Astrozyten und Reduktion der AQP4 Expression lieferte ebenfalls die intrazerebrale Co-Injektion von NMO-IgG gemeinsam mit humanen Komplementfaktoren bei Mäusen (Saadoun et al. 2010).

#### **1.4. Problemstellung und Zielsetzung**

Der Nachweis einer pathologischen Wirkung von AQP4-AK im Tiermodell ist notwendig, damit die NMO die Kriterien für eine antikörpervermittelte autoimmune

Erkrankung erfüllt (Witebsky and Rose 1963). Danach wird gefordert, dass ein passiver Transfer des Immunglobulins entsprechende Krankheitssymptome im Tiermodell induzieren muss. Die bisher veröffentlichten Tiermodelle zum Nachweis der Pathogenität von AQP4-AK hatten den Nachteil, dass eine AT-EAE notwendig war, um die Blut-Hirn-Schranke zu öffnen und dem systemisch applizierten IgG somit den Zutritt in das ZNS-Kompartiment zu verschaffen (Bennett et al. 2009; Bradl et al. 2009). Es besteht hierbei prinzipiell die Schwierigkeit, die Effekte der AT-EAE von denen der AQP4-AK klinisch zu trennen. Demzufolge wurde das Augenmerk v.a. auf histopathologische Analysen gelegt. Auch bei dem zweiten Tiermodell, der intraparenchymalen Injektion der AK wurden vorwiegend histologische Untersuchungen durchgeführt und weniger das Verhalten der Versuchstiere analysiert (Saadoun and Papadopoulos 2010). Außerdem ist diese Applikationsart als passiv-Transfer Modell sehr unphysiologisch und entspricht nicht den Gegebenheiten beim Patient. Die Etablierung eines chronischen Krankheitsmodells mit der Möglichkeit, evtl. auftretende Krankheitssymptome zu beobachten ist demzufolge wichtig. Des Weiteren ist bislang nicht geklärt, ob die AK gegen AQP4 auch intrinsische, Komplement-unabhängige Pathomechanismen im lebenden Organismus bewirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von AQP4-AK in einem Tiermodell zu untersuchen, das die o.g. Eigenschaften für eine suffiziente Beurteilung des Effekts der AK im ZNS erlaubt. Hierzu wurde ein passiv-Transfer Rattenmodell verwendet mit Hilfe dessen aufgereinigte IgG Fraktionen von Plasmapheresematerial AQP4-AK positiver NMO Patienten intrathekal verabreicht werden konnten. Das gleiche Modell diente der Untersuchung der Spezifität der AK-Effekte durch Verwendung von rABs. Der im Versuchstier resultierende klinische Phänotyp wurde mit standardisierten Verhaltenstests untersucht. An ausgewählten Versuchsgruppen die zentralen Leitungszeiten mittels elektrophysiologischer Verfahren überprüft. Zum Nachweis von Rückenmarksläsionen wurden ausgewählte Versuchstiere im MRT untersucht. Zur sensitiven Detektion wurde das neuartige Kontrastmittel Gadofluorin (Bendszus et al. 2008) verwendet. Nach Beendigung des Versuchs wurde das ZNS-Gewebe entnommen und histologisch aufbereitet.

## **2. Material und Methoden**

### *2.1 Tierhaltung und Testung*

#### **2.1.1. Tierhaltung**

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um 6-8 Wochen alte weibliche Lewis-Ratten mit einem Gewicht von 175-200 g. Die Tiere wurden von der Firma HARLAN Netherlands bezogen. Je nach Versuchsumstand wurden sie einzeln in Käfigen Typ III oder zu fünf im Typ IV Eurostandard auf Standardstreu gehalten. Für die Tiere war jederzeit kommerzielles Futter (Typ 1324; Firma Altromin GmbH & CO.KG, Lage, Deutschland) und Wasser erreichbar. Die Versorgung wurde durch Tierpfleger der Tierhaltung (Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg) gewährleistet. Die Versuche waren durch die Regierung von Unterfranken genehmigt worden (20.01.2010, AZ 55.2-2531.01-93/09).

#### **2.1.2. Verhaltenstestung**

##### **2.1.2.1. Allgemeine Betrachtung**

Die Tiere wurden während der Versuchsphase täglich allgemein betrachtet und evaluiert. Das beinhaltete das Wiegen und eine optische Begutachtung der Versuchstiere. Diese wurden einzeln auf einen Tisch gesetzt und unter dem Aspekt der motorischen Fähigkeiten im Sinne von Bewegung auf freier Fläche sowie Klettern über Hindernisse beobachtet und anschließend in einen klinischen Punktescore eingeteilt. Dieser NMO-Score wurde von einem bestehenden Punkteverteilungsschlüssel für die experimentelle autoimmune Neuritis, sog. EAN-Score, adaptiert.

##### **2.1.2.2. NMO-Score**

Die Tiere wurden täglich im Rahmen der allgemeinen Betrachtung auf klinische Erkrankungszeichen untersucht und entsprechend eines Scores, der ursprünglich für ein Modell einer entzündlichen Neuropathie entwickelt wurde (Hartung et al. 1988), von

1 – 10 eingeteilt (Tabelle 1). Dieser Score wurde auf das Tiermodell der NMO insofern angepasst, dass nicht unbedingt eine Schwanzlähmung als erstes Symptom auftreten musste, sondern dass auch andere Extremitäten erste Krankheitssymptome zeigen konnten, da die möglichen lokalen Schädigungsstellen im Rückenmark durch die gezielte intrathekale Injektion der vermutet pathogenen AK induziert werden können.

Score	Klinische Erkrankungszeichen
0	Normal
1	läuft normal, proximale 2/3 des Schwanzes waagrecht, Schwanzspitze schleift auf Boden oder leichte Parese einer Extremität
2	läuft normal, gesamter Schwanz schleift auf Boden oder moderate Parese einer Extremität (kein Wegklappen der Extremität).
3	zusätzlich etwas breitbeiniger Gang, geringe Ataxie
4	breitbeiniger ataktischer Gang, Hinterbeine nicht mehr ganz durchgestreckt, Hintern tiefer als bei 3
5	zusätzlich klappt beim Laufen öfter oder immer ein Hinter- oder Vorderbein nach hinten weg, kann jedoch wieder vollständig nach vorne gebracht werden für den nächsten Schritt
6	eine Extremität konstant hinten, kann für den Schritt nicht mehr unter den Körper gebracht werden, oder zwei Extremitäten inkonstant hinten, können noch unter den Körper gezogen werden, oder seitliches Wegrutschen beider Beine, Gang im Spagat
7	zwei Extremitäten (zumeist Hinterbeine) fast völlig oder völlig gelähmt, können nicht mehr bis zur Spagatstellung vorgezogen werden (schwere Parese oder Paraplegie)
8	Schwäche aller vier Extremitäten, zieht sich nicht mehr gerade und flott mit den Vorderbeinen voran, Aufstützen des Oberkörpers nicht mehr nur auf die Pfoten (Tetraparese)
9	Tetraparese und Atemnot; moribund
10	Gestorben

**Tabelle1: NMO Score (modifizierter EAN-Score)**

### 2.1.2.3. Rotarod

Der Rotarod-Test ist ein häufig verwendeter Test für die Koordinationsfähigkeit und das Laufvermögen der Versuchstiere bei forcierter Lokomotion. Das verwendete Gerät (TSE Systems GmbH; Bad Homburg, Deutschland) beschleunigte innerhalb von 300 Sekunden auf eine maximale Umdrehungszahl von 30 pro Minute. Zu Beginn der

jeweiligen Versuchsreihe wurden 3 Einheiten an aufeinander folgenden Tagen durchgeführt um die Versuchstiere zum einen an die Testvorrichtung zu gewöhnen und zum anderen stabile Ausgangswerte zu erhalten. Danach wurde pro Woche einmal getestet. Pro Testung wurden 5 Messungen erhoben und von den 3 besten Wiederholungen der Median gebildet.

### **2.1.3. Anästhesie**

Für invasive Verfahren (Ausnahme: intrathekale Katheterimplantation) und elektrophysiologische Untersuchungen wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin (80 bzw. 8 mg/kg KG) intraperitoneal anästhesiert (1 µl pro g KG von folgender Lösung: 0,2 ml Rompun 2%, 0,6 ml ddH<sub>2</sub>O, 0,8 ml Ketanest 10%). Über den Cornealreflex und Schmerzreflexe am Fuß wurde die Narkosetiefe überprüft. Zur Aufrechterhaltung der Narkosetiefe wurden bei Untersuchungen, die länger als 30 min dauerten, kleinere Dosen (0,05 – 0,2 ml) intramuskulär in die Unterschenkelmuskulatur injiziert. Die Augen des Tieres wurden während der Narkose mit Bepanthen-Augensalbe vor Austrocknung geschützt.

## **2.2. Operative Methoden**

### **2.2.1. Intrathekale Katheterimplantation**

Für die intrathekale Implantation wurden eigens bearbeitete Polyethylen-Katheter sowie kommerzielle Polyurethan-Katheter verwendet. Im Anschluss an die Implantation wurde der Katheter entweder transkutan ausgeleitet um manuelle Injektionen ermöglichen oder subkutan an ein osmotisches Pumpsystem angeschlossen, welches eine gleichmäßige Infusion gewährleistete.

#### **2.2.1.1. Wahl des intrathekalen Katheters**

Zur Herstellung der Polyethylen-Katheter wurde ein 14 cm langes Stück eines PE – 10 Katheters (Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm; BD

Intramedicpolyethylentubing, Clay.Adams, USA) verwendet und mit einem Überhandknoten in ein 7 cm Teilstück und ein entsprechendes Restteilstück unterteilt. Der lose Knoten wurde mit Hoffmann's Phosphat Zement (Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Deutschland) fixiert. Die Katheter wurden mit einer NaCl-Testinjektion auf ihre Durchgängigkeit geprüft und anschließend für mindestens 24 h bis zur Implantation in eine 70% Ethanollösung zur Desinfektion eingelegt.

Alternativ wurden für die intrathekale Implantation speziell für Ratten angefertigte Katheter der Firma Alzet benutzt. Diese bestanden aus einem 10 cm langen 28 G Abschnitt (Außendurchmesser 0,36mm; Innendurchmesser 0,18 mm) der für die intrathekale Lage bestimmt war und ein 12,7 cm langes Endstück (Außendurchmesser 0,84mm; Innendurchmesser 0,36mm). In dem aus Polyurethan gefertigten Katheter befand sich ein mit Teflon beschichteter, aus rostfreiem Stahl bestehender Führungsdraht. Der 10 cm lange 28 G Abschnitt wurde für die intrathekale Implantation gemäß der Größe der Tiere auf 7 cm gekürzt.

#### **2.2.1.2. Intrathekale Implantation des Katheters**

Für die intrathekale Katheterimplantation wurden ausschließlich 6-8 Wochen alte, weibliche Lewis Ratten mit einem Gewicht von 170-200g verwendet.

Das Tier wurde zunächst in eine geschlossenen Narkosekammer (Büchner Sonderanfertigungen; Würzburg, Deutschland) gelegt, die über einen Plastikschauch mit einer Narkosegasanlage und einem Vakuumschluss verbunden war. Die Narkose erfolgte mittels einer 4 Vol % Isofluran – Sauerstoffmischung bei einem O<sub>2</sub>-Flow von 0,4 l/min. Die Narkosetiefe wurde über den Kornealreflex und Schmerzreize an den Hinterpfoten überprüft. Anschließend wurde das Tier aus der Narkosekammer herausgenommen und der Nackenbereich beginnend zwischen den Ohren 2 cm nach kaudal mit einem Rasiergerät (Ermila 3000, Wahl Deutschland GmbH, Fernwald, Deutschland) rasiert. Danach wurde das Versuchstier in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt und über eine speziell angefertigte Maske weiterhin mit Narkosegas versorgt. Der rasierte Nackenbereich wurde mit einer 70% Ethanollösung desinfiziert und die Augen mit einer Bepanthen-Augensalbe vor Austrocknung geschützt, wobei gleichzeitig der Cornealreflex und somit eine suffiziente Narkosetiefe

überprüft wurde. Mit einem Skalpell (Größe 10) wurde in der Mittellinie beginnend zwischen den Ohren ein 2 cm langer Hautschnitt nach kaudal durchgeführt. Im Anschluss an den Hautschnitt wurde die Narkosegaszufuhr auf 2 Vol % Isofluran gedrosselt und die Narkosetiefe mit Hilfe eines Schmerzreizes am Fuß des Tieres erneut überprüft. War diese ausreichend so wurde die oberflächliche Nackenmuskulatur mit einem kleinen Skalpell (Größe 15) am okzipitalen Knochenkamm durchtrennt und mit einem Wundhaken etwa 1 cm nach kaudal gezogen. Die darunter gelegenen Ansätze der zweigeteilten Muskelschicht wurden am Hinterhaupt zu 3 mm in beide Richtungen von der Mittellinie ausgehend nach lateral durchtrennt. Die Muskelfasern wurden sorgfältig nach kaudal vom okzipitalen Schädelknochen abgeschabt, so dass anschließend die Dura mater zwischen Schädel und erstem Wirbelkörper freipräpariert werden konnte. Hierbei wurde unter mikroskopischer Sicht (M3Z Surgerymicroscope, Wild, Heerbrugg, Schweiz) gearbeitet um die Dura mater sowie lokale Gefäße zu schonen. Anschließend wurde die Dura vorsichtig mit einer 30 G Nadel punktiert bis Liquor austrat. Durch das entstandene Loch wurde der zu implantierende Katheter mit dem 7 cm langen Teilstück voran parallel zum Rückenmark in das Liquorkompartiment eingeführt und nach kaudal vorgeschoben. Um eine für das Tier schonende Implantation zu gewährleisten wurde ständig auf mögliche Nervenwurzelreizungen geachtet. In solchen Fällen wurde der Katheter zunächst wieder etwas nach kranial zurückgezogen und anschließend rotiert, um eine Richtungsänderung beim erneuten Vorschub zu bewirken. Die dorsalen Nervenwurzeln konnten durch dieses Manöver geschont werden. Der eingebrachte Katheter wurde mit einer Tabaksbeutelnaht unter der Nackenmuskulatur fixiert. Für diese Naht wurde ein nicht resorbierbarer Silikam 4/0 Braun DS19 Faden verwendet. Das weitere operative Vorgehen war abhängig von der Entscheidung für bzw. gegen die Implantation eines subkutan gelegenen, osmotischen Pumpsystems.

### **2.2.1.3. Repetitive Injektionsvariante**

Bei der repetitiven Injektionsvariante wurde das Katheterende mit Hilfe einer 20 G Nadel subkutan nach kranial getunnelt und 5 mm oberhalb der Augen des Tieres ausgeleitet. Anschließend wurde der Hautschnitt mit einem resorbierbaren 4/0 Faden



(Vicryl 4/0 RB 1-1 plus; Ethicon, Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit Einzelknopfnähten verschlossen. Der implantierte Katheter wurde mit Hilfe einer Hamilton-Spritze (Hamilton MicroliterSyringes, Model 710-80601 TLL; PostnovaAnalytics GmbH, Landsberg/Lech, Deutschland) mit 10 µl NaCl gespült und mittels einem 1 cm langen Stück chirurgischen 28 G Stahldraht (Surgealsteel B&S DS 28; Ethicon, Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland) reversibel verschlossen.

#### **2.2.1.4. Subkutane Implantation osmotischer Pumpsysteme**

Alternativ zu der repetitiven Injektionsvariante wurde der intrathekale Katheter an subkutan implantierten, osmotischen Pumpsystemen angeschlossen, die eine gleichmäßige Infusion ermöglichten. Hierbei wurden Pumpen (Alzet, Model 2004; Charles River Laboratories, Research Models and Service, Germany GmbH Sulzfeld, Deutschland) verwendet, die über 28 Tage eine Pumprate von 0,25µl/h gewährleisten. Vor der subkutanen Implantation wurden die Pumpen zunächst mit der zu infundierenden AK-Lösung aufgefüllt. Das Füllergebnis wurde mit Hilfe einer Präzisionswaage (440-47 Präzisionswaage; Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland) überprüft. Anschließend wurden die gefüllten osmotischen Pumpen für 4 Stunden in ein 37°C warmes NaCl-Bad gelegt. Nach diesem Zeitraum war ein sofortiger Pumpstart gewährleistet. Die intrathekalen Katheter wurden wie unter **2.2.1.2.** beschrieben implantiert. Das pumpbereite osmotische System wurde mit dem freien Katheterende verbunden. Für die subkutane Implantation wurde mit Hilfe einer stumpfen Schere am kaudalen Rand des Hautschnittes eine Tasche geformt (mind. 3 cm Länge, mind. 0,7 cm Durchmesser). Die osmotische Pumpe wurde darin eingebettet, die Hautwundränder über den Katheter gezogen und mit einem resorbierbaren 4/0 Faden (Vicryl 4/0 RB 1-1 plus; Ethicon, Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit Einzelknopfnähten verschlossen.

#### **2.2.2. Kraniale Schraubenimplantation**

Das Versuchstier wurde gemäß **2.1.3.** narkotisiert. Anschließend wurde das Hinterhaupt im Bereich zwischen den Ohren mit einem Rasiergerät rasiert und das Tier

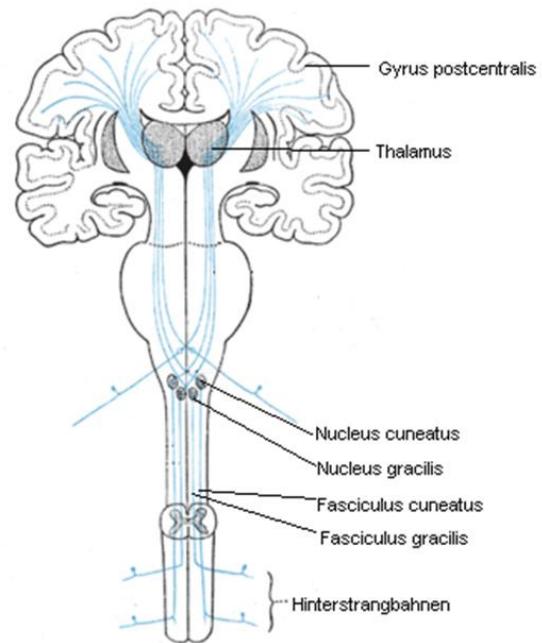
in einen Stereotaxierahmen eingespannt. Nach einer gründlichen Desinfektion des rasierten Areales wurde auf der Mittellinie des fixierten Schädels zwischen den Ohren ein 1,5 cm langer Hautschnitt mit Hilfe eines Skalpells (Größe 15) durchgeführt. Der Schädelknochen wurde sorgfältig freipräpariert bis die Sagital- bzw Lambdanaht sowie das Bregma frei von Muskelfaszien und Bindegewebe waren. Mit einem Mehrzweckbohrer (Dremel 300-1/55 Bohrer; Dremel Deutschland, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland) wurde jeweils ein Bohrloch (Durchmesser 1 mm) zu beiden Seiten 2mm lateral der Mittellinie und 2,5mm kaudal vom Bregma sowie ein Bohrloch 1-2mm kaudal der Lambdanaht gebohrt. Die Bohrung wurde unter mikroskopischer Sicht durchgeführt, so dass die Dura nicht beschädigt wurde. Anschließend wurden rostfreie Schrauben (Durchmesser 1,5mm; Länge 6mm) in die Bohrlöcher eingebracht und mit Sekundenkleber und Hoffmanns Phosphatzement (Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Deutschland) fixiert.

### *2.3. Elektrophysiologie*

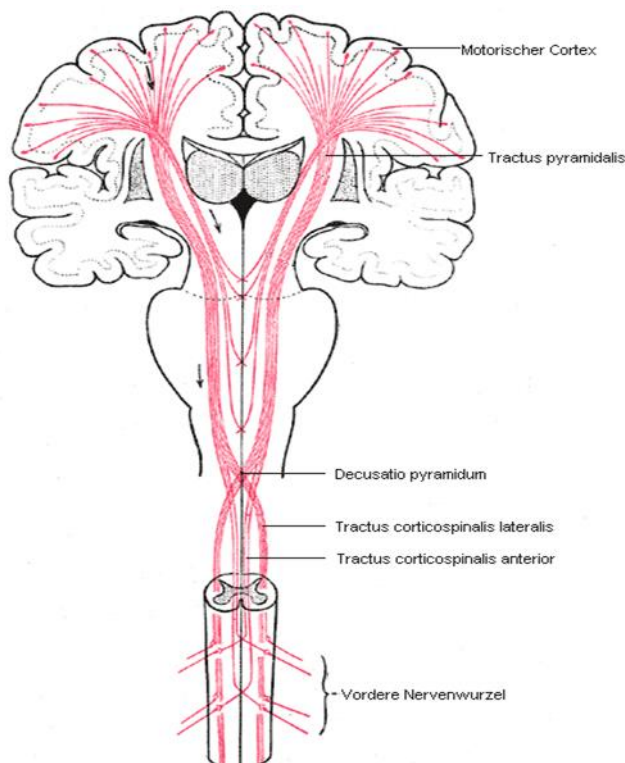
#### **2.3.1. Theoretische Grundlagen**

Die in einer festen zeitlichen Beziehung zu einem sensiblen Reiz stehende elektrische Aktivität des ZNS ist das somatosensibel evozierte Potential (SEP). Andersherum ist das zeitliche Verhältnis einer Stimulation motorischer Areale im Kortex zu der Aktivität der entsprechenden Zielmuskulatur das motorisch evozierte Potential (MEP). SEPs wie auch MEPs eröffnen folglich die Möglichkeit detaillierte Informationen über die Integrität des zentralen Nervensystems zu erhalten. Voraussetzung für die suffiziente Stimulation der MEPs sowie für die Ableitung der SEPs im Tierversuch bei Kleinnagern ist die kraniale Implantation von Edelstahlschrauben als Ableitungs- bzw. Stimulationselektroden.

Zur Auslösung der spinalen und zerebralen SEPs wird ein peripherer Nerv elektrisch stimuliert. Die dadurch ausgelösten Aktionspotenziale werden afferent über den Fasciculus gracilis bzw. cuneatus des Hinterstrangsystems (Fasern im Rückenmark, die für die Lageempfindung und feine Hautsensibilität verantwortlich sind), über Hirnstamm (Lemniscus medialis) und Thalamus in den postzentralen Kortex fortgeleitet. Über diesem sensiblen Kortexareal erfolgt anschließend die Reizableitung.



**Abbildung 1: Sensible Leitungsbahnen**



**Abbildung 2: Motorische Leitungsbahnen**

Um MEPs zu erhalten wird bei dem Versuchstier das Gehirn bzw. der motorische Kortex über die kranial implantierten Schrauben elektrisch stimuliert. Es kommt zu einer Erregung der Betzschen Riesenpyramidenzellen im motorischen Kortex, dem Ausgangspunkt der kortikospinalen Bahn. Ziel ist eine Aktivierung der spinalen alpha-Motoneurone, deren Aktivität mit Hilfe von Ableitelektroden in der entsprechenden Zielmuskulatur gemessen werden kann.

### **2.3.2. Messung somatosensibel evozierter Potentiale (SEP)**

Die Versuchstiere wurden mit Ketamin/Xylazin wie in **2.1.3.** beschrieben narkotisiert. Zur Stimulation des Nervus tibialis wurde eine Nadelelektrode unterhalb der Achillessehne (Kathode), die andere (Anode) oberhalb davon positioniert. Die Reizableitungsklemmen wurden an der kontralateralen kranialen Schraube (Anode) sowie an der posterioren Schraube (Kathode) befestigt. Außerdem wurde eine subkutane Erdungselektrode in der vorderen Achselhöhle platziert. Anschließend wurde die Stromstärke bestimmt, bei der die Stimulation des Nervus tibialis Muskelkontraktionen im Fuß des Versuchstieres auslöste. Die Stromstärke wurde zwischen 1 mA und 2 mA variiert.

Die Aufnahmen wurden mit einem Toenniesverstärker und der NeuroScreen-plus-Software (Erich Jaeger GmbH, Höchberg, Deutschland) durchgeführt. Bei einer Stimulationsdauer von 10 ms wurde die elektrische Reizung 200mal wiederholt und anschließend aus dem Mittelwert ein Graph gebildet. Dieser Vorgang wurde auf beiden Seiten jeweils zweimal durchgeführt.

Gemessen wurde zum einen die Latenzzeit der Punkte P1 und N1 nach Stimulation sowie die Amplitude zwischen den zwei Punkten.

### **2.3.3. Messung motorisch evozierter Potentiale (MEP)**

Die Versuchstiere wurden mit Ketamin/Xylazin wie in **2.1.3.** beschrieben narkotisiert. Zur Reizableitung wurde eine Nadelelektrode im Muskulus tibialis anterior, die Referenzelektrode am unteren Fußrand der entsprechenden Seite platziert. Eine Erdungselektrode wurde subkutan in der vorderen Achselhöhle positioniert. Die Stimulationsklemmen wurden an der kontralateralen und an der posterioren kranialen Schraube angebracht. Nach Platzierung aller Elektroden wurde die Stromstärke ermittelt, bei der die Muskulatur supramaximal stimuliert wurde und eine Reizableitung möglich war. Die Stromstärke wurde hierbei in einem Bereich von 10 – 20 mA variiert.

Die Stimulationsdauer betrug 10 ms, es wurden 20 Aufnahmen gemittelt. Dieser Vorgang wurde auf beiden Seiten je zweimal durchgeführt. Aufgrund der invasiven

intramuskulären Ableitung ist die Amplitude der MEP sehr variabel, weswegen bei der Messung der MEP nur die Latenz ausgewertet wurde.

## *2.4. Bildgebende Verfahren*

### **2.4.1. Kontrastmittelgabe**

Das Kontrastmittel Gadofluorine M wurde dem zu untersuchenden Versuchstier 24 Stunden vor der Magnetresonanz-Bildgebung intravenös in einer Dosierung von 0,1 mmol/kg appliziert.

### **2.4.2. MR-Bildgebung**

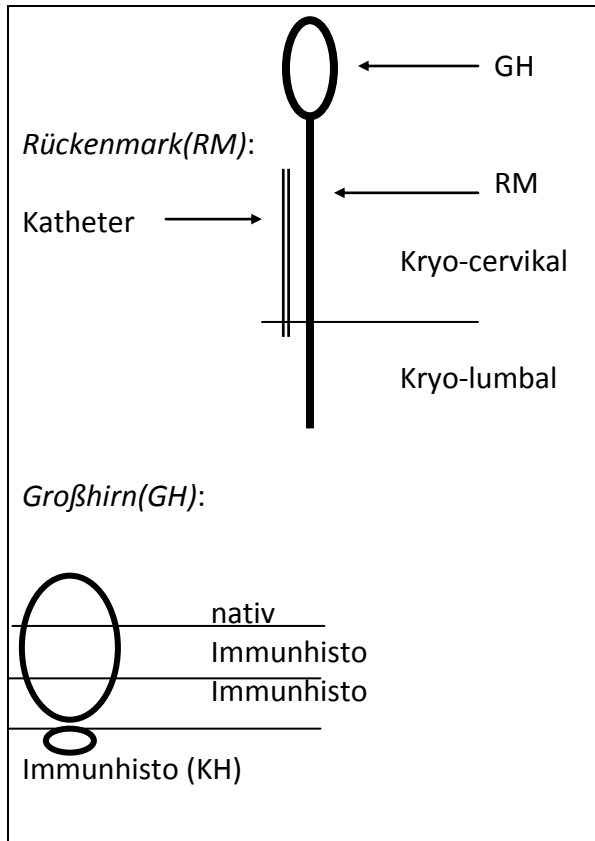
Für die Magnetresonanz-Bildgebung wurde ein Siemens TIM Trio 3 Tesla Scanner mit einer 7 cm großen Empfängerspule (Siemens) benutzt. Nach einem triplanaren Flash-Localizer wurden die axialen, T1 gewichteten Serien für die genaue Planung benutzt. Anatomische, T1 gewichtete Turbo-spin-echo Sequenzen (TR/TE 860ms/15ms, Schichtdicke 1mm, Matrix 256x256, FOV 80mm, 6 Schichten) wurden in der sagittalen Ebene parallel zum Rückenmark mit einer Sättigung der ventral gelegenen Strukturen aufgenommen. Aufgrund der limitierten Größe der Empfängerspule wurde das Rückenmark in 2 Schritten (zervikal/thorakaler und lumbaler Anteil) abgebildet. Ausgedehnte Läsionen wurden zusätzlich in der koronaren Ebene dargestellt (TR/TE 860ms/15ms, Schichtdicke 1,5mm, matrix 256x256, FOV 80mm, 6 Schichten).

## *2.5. Histologie*

### **2.5.1. Gewebeentnahme**

Nach der Überlebenszeit von 2-5 Wochen (je nach Versuchsteil) wurden die Tiere mit Pentobarbitalnarkose betäubt und anschließend getötet. Es wurde das Rückenmark kranial und kaudal des Katheterendes, das Kleinhirn, die Sehnerven und das Großhirn entnommen. Das Gewebe wurde in kleinen Einbetttschälchen (Cryomold, Miles Inc.,

Elkhart, USA) mit Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura, Zoeterwonde, Niederlande) eingebettet und in 2-Methylbutan (Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland), das in flüssigem Stickstoff abgekühlt wurde, eingefroren. Die Lagerung bis zur Verarbeitung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Das Rückenmark wurde in einen zervikalen oberhalb und einen lumbalen Anteil unterhalb der Katheterspitze unterteilt und kryokonserviert.

Das Großhirn wurde in 3 Anteile geschnitten. Das frontale Gewebe wurde nativ konserviert, der präzentrale sowie der postzentrale Teil wie auch das Kleinhirn wurden für immunhistochemische Färbungen eingefroren.

**Abbildung 3: Entnahmeschema für Histologie**

### **2.5.2. Immunhistochemische Färbungen**

Für die histologischen Färbungen wurden Schnitte mit einer Dicke von  $10\ \mu\text{m}$  mit einem Kryostat (CM 050S Kryostat, Leica Microsystems; Wetzlar, Deutschland) angefertigt.

Die  $10\ \mu\text{m}$  dicken Schnitte wurden zunächst 30 min lang bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, daraufhin für 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Aceton fixiert und für 5 min auf einer Heizplatte (max.  $42^{\circ}\text{C}$ ) getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Pap-Pen umrandet und mit 10% BSA/Tris zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen des Erst-AKs im Gewebe für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach diesem Blocken der Schnitte wurde die Lösung abgekippt. Die Erst-AK (s.Tabelle 2) wurden in

1% BSA/Tris mit 2% Milchpulver verdünnt auf die Schnitte aufgetragen (50-100 µl pro Schnitt) und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal für 10 min mit Tris gewaschen und anschließend für 20 min bei RT in eine 200 ml Methanol und 3,5 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung gelegt um die endogene Phosphatase zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal in Tris gewaschen.

Der Sekundär-AK wurde 1:200 in BSA/Tris verdünnt und 30 min bei Raumtemperatur mit den Schnitten inkubiert. Die Schnitte wurden daraufhin dreimal in Tris gewaschen. Es folgte die Zugabe des Streptavidin-Biotin-Komplexes der Firma Vector (ABC-Kit). Hierbei wurden 50-100 µl auf die Schnitte aufgetragen und für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde dreimal in Tris gewaschen und DAB der Firma Kementec appliziert. Hierbei wurde eine Tablette in 10 ml Aqua dest. gelöst und direkt vor Gebrauch 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben. Die Schnitte wurde mit dieser Lösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde zunächst zweimal in Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70-100% Ethanol für je 2 min behandelt. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für 10 min mit Tissue Clear behandelt und mit Tissue Mount und Deckgläsern eingedeckt. Diese wurden mit Nagellack umrandet, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

AK	Host	Konz.	Sek. AK	Konz. Sek. AK
Anti-Human-IgG	Rabbit	1:200	Anti-Rabbit-IgG	1:200
AQP4	Rabbit	1:500	Anti-Rabbit-IgG	1:200
GFAP	Rabbit	1:5000	Anti-Rabbit-IgG	1:200
EAAT2	Rabbit	1:1000	Anti-Rabbit-IgG	1:200
C9neo	Rabbit	1:1000	Anti-Rabbit-IgG	1:200

**Tabelle 2: In den Versuchen verwendete Antikörper (AK) mit Ursprungsspezies (Host), Verdünnung (Konz.) und zugehörigem Sekundärantikörper (Sek. AK)**

**Anti-human-IgG, polyclonal; Dako Deutschland; Hamburg, Deutschland**

**AQP 4, polyclonal; Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA**

**GFAP, polyclonal; EMD Millipore Corporation; Billerica, MA, USA**

**EAAT 2, polyclonal; Cell Signaling Technology, Inc.; Danvers, MA, USA**

**C9neo, polyclonal; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fr. Prof. C. Stadelmann-Nessler (Institut für Neuropathologie, Göttingen).**

### 2.5.3. Quantitative Analyse

Die immunhistochemisch gefärbten Rückenmarksschnitte der Versuchstiere wurden in einer 10-fachen Vergrößerung mit einer CCD-Kamera (Visitron Systems, Tuchheim, Deutschland) über ein Axiophot 2 Mikroskop (Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) aufgenommen.

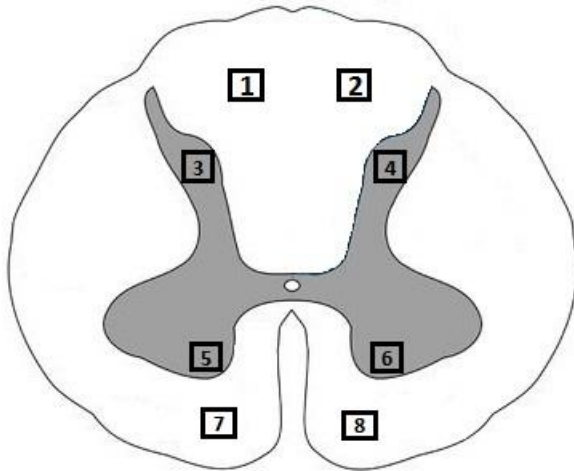


Abbildung 4: Schema Auswertung Rückenmarksschnitte

aufgenommen. Die Aufnahmen wurden gemäß Abbildung 4 im .jpg-Format gespeichert. Als Software diente Spot Advanced (Windows, Version 4.5). Die Auswertung erfolgte im Image-

Pro Plus Bildbearbeitungsprogramm (Version 4.5.0.29, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA).

#### 2.5.3.1. Human-IgG-, EAAT2- und AQP4-Färbung

Zur Auswertung der Dichte des Farbsignals wurde zunächst eine standardisierte Area-of-Interest (AOI) von  $61.770 \mu\text{m}^2$  festgelegt. Diese wurde gemäß Abbildung 4 in der grauen und weißen Substanz positioniert. Die Einzelwerte der verschiedenen Aufnahmen wurden für die weiße und graue Substanz gemittelt und mit den Werten der Läsionsareale verglichen.

Aufgrund unterschiedlicher Färbeintensitäten der verschiedenen Versuchsreihen wurde eine Korrektur der Färbewerte durchgeführt. Hierzu wurden aus jeder Versuchsgruppe die beiden am stärksten und am schwächsten gefärbten Schnitte ausgewählt und durch die entsprechenden Schnitte aus einer Referenzgruppe dividiert. Die daraus resultierenden Korrekturfaktoren aus dem Mittelwert für die weiße und graue Substanz wurden mit den Einzelwerten der Messungen multipliziert.

Ein hoher Farbwert entspricht aufgrund der verwendeten RGB-Skala einer schwachen Färbung. Zur Darstellung der Graphen wurde der gemessene Wert von dem maximalen Weißwert der RGB-Skala (255) abgezogen.



### **2.5.3.2. GFAP-Färbung**

Die Dichtemessung erfolgte in der standardisierten AOI. Die Astrozyten wurden zusätzlich gezählt. Die Mindestgröße wurde hierbei auf mindestens 25  $\mu\text{m}^2$  festgelegt. Abschließend wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche in Bezug zur AOI berechnet.

## *2.6. Versuchsgruppen und Versuchsdurchführung*

### **2.6.1. Versuchsgruppen**

Die Einteilung der Versuchsgruppen erfolgte randomisiert in Gruppen zur Applikation von aufgereinigtem IgG Material verschiedener AQP4-AK positiven Patienten (NMO 1-4, Gruppe 1-4). Den Versuchsgruppen wurde außerdem eine Kontrollgruppe mit aufgereinigtem IgG eines Patienten mit chronisch inflammatorischer demyelinisierender Neuropathie (CIDP) ohne spezifische Auto-AK gegenübergestellt (Kontroll-IgG, Gruppe 5). Zusätzlich wurde ein spezieller rekombinanter, AQP4-AK und ein monoklonaler, nicht gegen AQP4 gerichteter AK ( $r\text{AB}^{\text{AQP4}}$ ,  $r\text{AB}^{\text{Kontrolle}}$ , Gruppe 6-7) und als weitere Krankheitskontrollen rekombinante AK von 2 Patienten mit MS ohne Reaktivität gegen AQP4 verwendet ( $r\text{AB}^{\text{MS1}}$ ,  $r\text{AB}^{\text{MS2}}$ , Gruppe 8-9). Die Injektion sowie die Verhaltenstestungen wurden verblindet durchgeführt.

Das Patienten-IgG wurde nach zuvor beschriebenen Protokollen (Geis et al. 2010; Geis et al. 2011) aus dem Plasmapherat nach therapeutischer Plasmapherese gewonnen und in einer Konzentration von 100mg/ml verwendet.

Die rAB ( $r\text{AB}^{\text{AQP4}}$ ,  $r\text{AB}^{\text{Kontrolle}}$ ) standen durch Kooperation mit Prof. Bennett, Denver, USA zur Verfügung. Sie wurden durch Expansion immortalisierter Plasmazellen aus dem Liquor von Patienten gewonnen (Bennett et al. 2009). Die rABs wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Dabei war  $r\text{AB}^{\text{AQP4}}$  spezifisch gegen humanes AQP4 gerichtet,  $r\text{AB}^{\text{Kontrolle}}$  war eine Negativkontrolle eines Kontrollpatienten mit Reaktivität gegen einen Hüllenbestandteil des Masernvirus.

Die monoklonalen AK von 2 MS Patienten standen durch Kooperation mit Prof. Holmoy, Oslo, Norwegen zur Verfügung. Sie wurden aus immortalisierten Hybridzellen

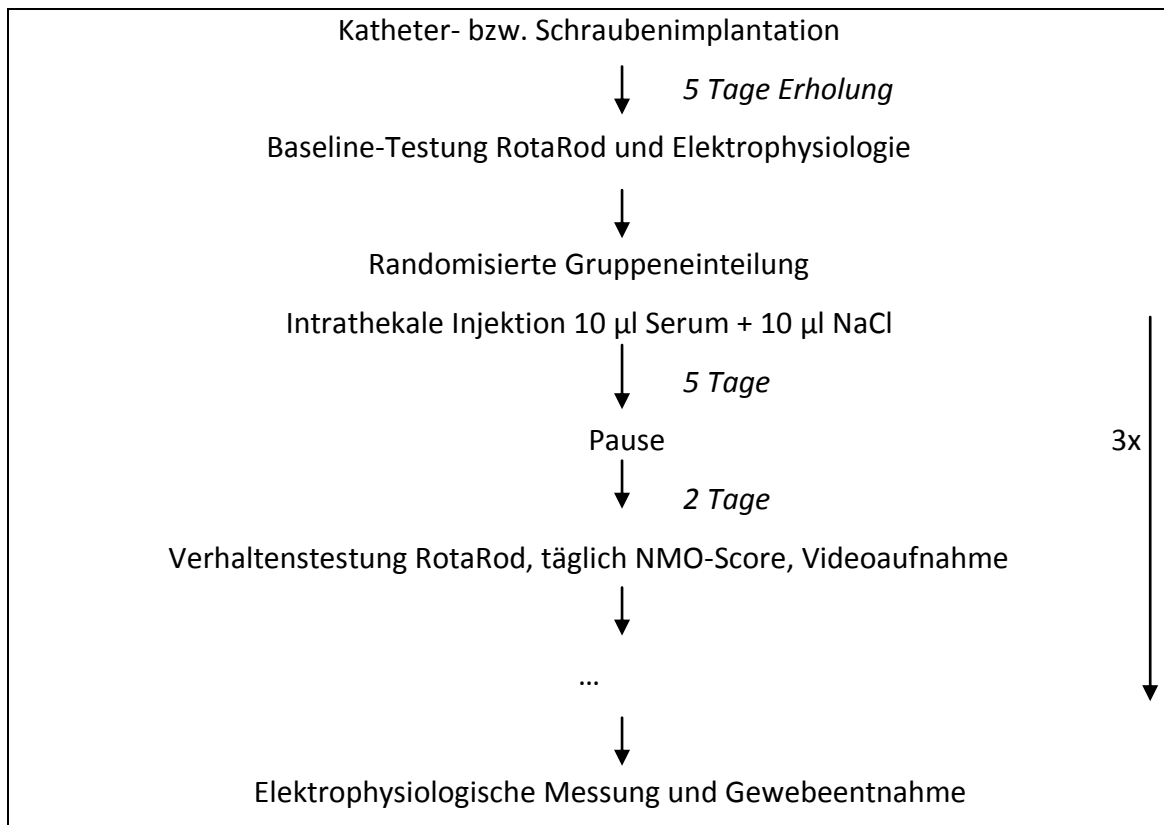
gewonnen. Diese wurden mittels Hybridomatechnik aus der Fusion von B-Zellen mit Myelomzellen hergestellt (Holmoy et al. 2005).

Gruppe	Operation	Antikörper	Injektionen	Anzahl Tiere
1	I.th. Katheter	NMO 1	19	9
2	I.th. Katheter	NMO 2	15	6
3	I.th. Katheter	NMO 3	15	8
4	I.th. Katheter	NMO 4	19	11
5	I.th. Katheter	Kontroll IgG	19	13
6	I.th. Katheter + osm. Pumpe	rAB <sup>AQP4</sup>	15 Tage	6
7	I.th. Katheter + osm. Pumpe	rAB <sup>Kontrolle</sup>	15 Tage	6
8	I.th. Katheter	rAB <sup>MS1</sup>	15	4
9	I.th. Katheter	rAB <sup>MS2</sup>	15	4

**Tabelle 3: Überblick Versuchgruppen**

### **2.6.2. Versuchsdurchführung**

Nach erfolgreicher Implantation eines intrathekalen Katheters sowie einer kranialen Schraubenanlage bei der Versuchsgruppe NMO 1 und NMO 2 hatten die Versuchstiere eine 5tägige Erholungsphase. Daraufhin wurden die Ausgangswerte der Verhaltenstestung mittels RotaRod-Laufrad ermittelt und bei den Tieren mit implantierten Schrauben eine elektrophysiologische Messung durchgeführt. Danach wurden die Versuchstiere randomisiert auf die entsprechenden Versuchsgruppen (siehe Tab. 3) verteilt. Den Tieren wurden über einen Zeitraum von zumeist 3 Wochen an 5 aufeinander folgenden Tagen AK injiziert gefolgt von 2 Tagen Injektionspause. Der klinische NMO-Score wurde täglich erhoben, die RotaRod-Messung erfolgte 1x wöchentlich nach der zweitägigen Injektionspause. Die elektrophysiologischen Messungen wurden vor der Gewebeentnahme durchgeführt (Abb. 5).



**Abbildung 5: Schema Versuchsdurchführung**

### 2.7. Statistische Analyse

Die PC-gestützte statistische Analyse erfolgte mit Sigma-Plot Version 12.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Je nach Beschaffenheit der Daten und deren Verteilung (ermittelt mittels Shapiro-Wilk Test) erfolgte die Analyse mittels Student's T-Test, Mann-Whitney Test oder one-way ANOVA für Mehrfachvergleiche. Die Sterne in den Graphen symbolisieren die Signifikanzniveaus (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Wenn nicht anders beschrieben sind die Daten als Mittelwert +/- Standardfehler dargestellt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Auswertung der Verhaltenstestung

### **3.1.1. Auswertung des NMO-Scores**

#### **3.1.1.1. NMO-IgG und Kontroll-IgG**

In den Versuchsgruppen 1-4 (NMO 1-4) zeigte sich mit zunehmender Anzahl an Injektionen ein Anstieg des durchschnittlich erzielten Punktwertes im NMO-Score.

In Versuchsgruppe 1 (NMO 1) stieg der durchschnittliche Punktwert zunächst kontinuierlich an. Nach 13 Injektionen erzielten die Versuchstiere einen NMO-Score von  $4,1 \pm 0,84$ . Aufgrund hoher Punktwerte und eines damit verbundenen schlechten klinischen Zustandes mussten zu nach 13 Injektionen 2 Versuchstiere aus dem Versuch genommen werden (NMO-Score 7 bzw. 8). Deshalb war ein leichter Abfall des NMO-Scores der Versuchsgruppe bis Injektion 16 zu beobachten ( $3,4 \pm 0,86$ ). Im weiteren Verlauf stieg dieser jedoch wieder und erreicht nach 18 Injektionen mit  $5,7 \pm 0,67$  den höchsten Punktwert, der Endwert nach 19 Injektionen liegt bei  $5,0 \pm 0,66$  (Abb. 6A).

Gruppe 2 (NMO 2) zeigte einen Maximalwert von  $3,5 \pm 0,57$  nach 12 Injektionen und erreichte einen Endwert von  $3,1 \pm 0,52$  nach 16 Injektionen (Abb. 6B).

Ausgehend vom NMO-Score Punktwert  $0,5 \pm 0,20$  zeigte sich bei Gruppe 3 (NMO 3) eine stetige Zunahme bis zum Endpunkt  $4,6 \pm 0,90$  nach 16 Injektionen (Abb. 6C).

Gruppe 4 (NMO 4) erreicht den höchsten Punktwert nach 18 Injektionen mit  $4,1 \pm 0,47$ . Zu Versuchsende nach 19 Injektionen erzielte die Versuchsgruppe einen durchschnittlichen Wert von  $3,9 \pm 0,42$  Punkten im NMO-Score (Abb. 6D).

In der Kontrollgruppe 5 zeigte sich hingegen nur ein gering erhöhter NMO-Score. Ausgehend von durchschnittlich  $0,23 \pm 0,13$  Punkten zu Versuchsbeginn wurden nach 16 Injektionen  $0,78 \pm 0,29$  und nach 19 Injektionen  $1,0 \pm 0,24$  Punkte erreicht (Abb. 6E).

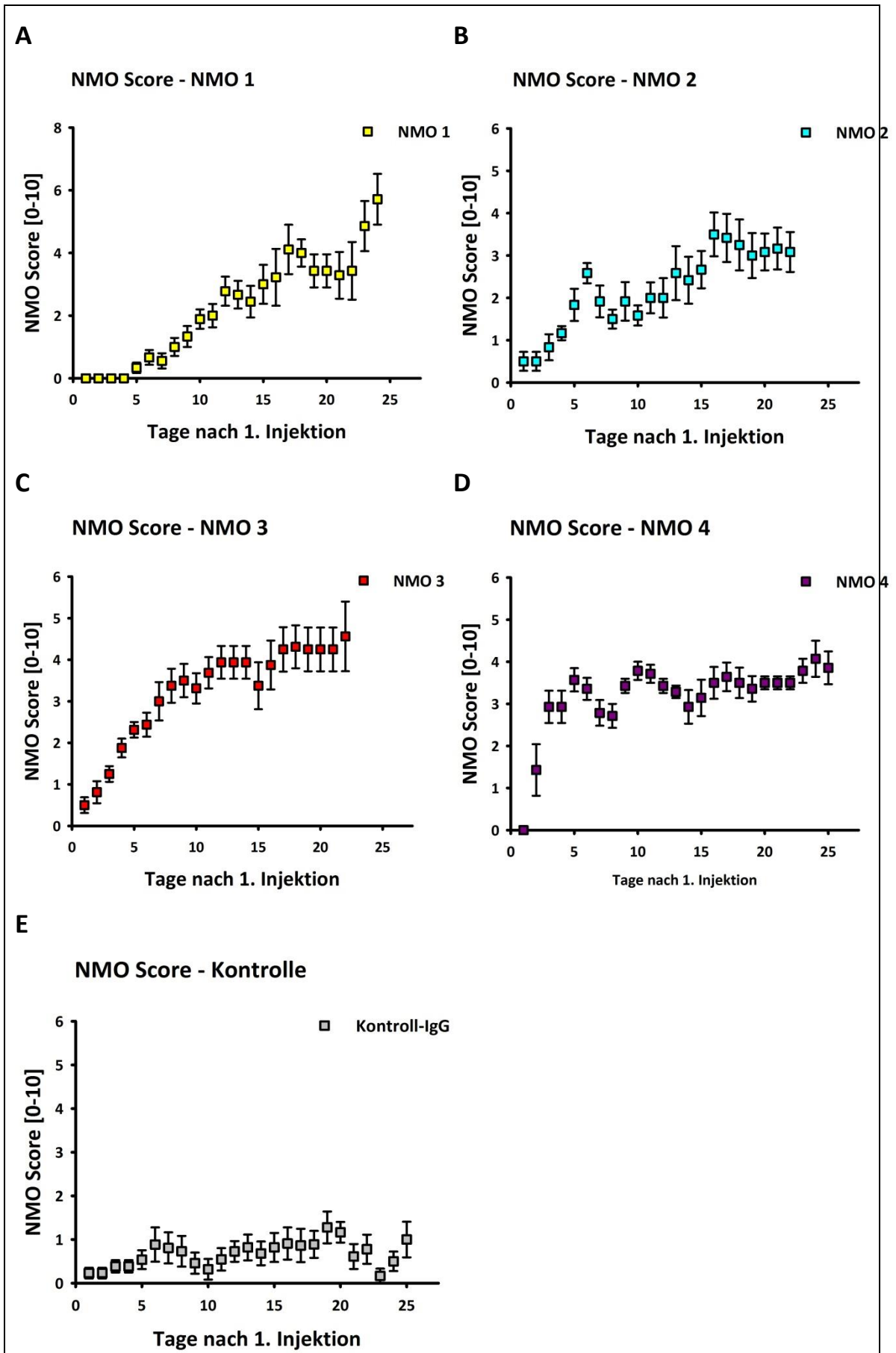


Abbildung 6: Entwicklung NMO-Score NMO 1-4 und Kontrolle mit steigender Injektionsanzahl

### 3.1.1.2. rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

Mit Hilfe des in **2.2.1.4.** beschriebenen osmotischen Pumpsystems wurden die rekombinanten monoklonalen AK rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup> in Versuchsgruppen 6 und 7 getestet. Rechnerisch erreichten die rAB an Versuchstag 8 den Liquor des Versuchstieres. Das errechnete Infusionsende der osmotischen Pumpe liegt bei Versuchstag 25. Die monoklonalen AK rAB<sup>MS1</sup> und rAB<sup>MS2</sup> wurden nach Katheteranlage gemäß **2.2.1.3.** repetitiv manuell injiziert.

Bei rAB<sup>AQP4</sup> zeigte sich ein Sprung im NMO-Score-Punktwert an Tag 8 auf  $1,4 \pm 0,75$ . Im Verlauf stieg der Punktwert während der Infusionsphase auf  $2,7 \pm 0,78$  an und erreichte nach Infusionsende an den Versuchstagen 26 und 27 den Maximalwert von  $3,7 \pm 0,81$ . Bis Versuchsende fiel der NMO-Score auf einen Wert von  $2,3 \pm 0,91$  ab.

Bei rAB<sup>Kontrolle</sup> zeigt sich an Infusionstag 10 ein Anstieg des NMO-Scores von 0 auf  $0,33 \pm 0,23$ . Der Maximalwert von  $0,83 \pm 0,45$  während der Infusionsphase wurde an Tag 15 und 22 erreicht. Nach Infusionsende erreichte rAB<sup>Kontrolle</sup> einen Endwert von  $0,75 \pm 0,40$  (Abb. 7).

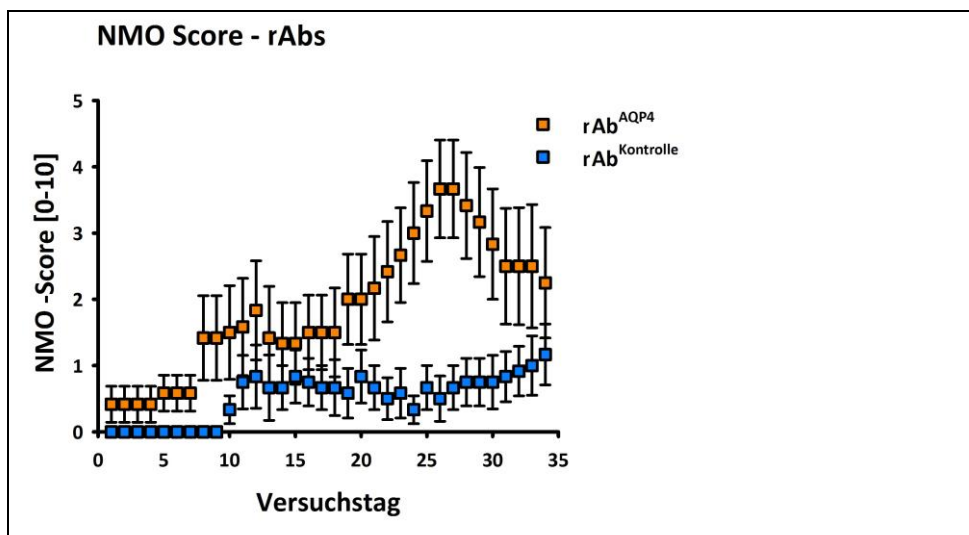


Abbildung 7: Entwicklung NMO-Score rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

rAB<sup>MS1</sup> und rAB<sup>MS2</sup> in Versuchsgruppe 8 bzw. 9 zeigen nur geringe Punktwerte im NMO-Score. So erreichen die Versuchstiere der Gruppe rAB<sup>MS1</sup> einen Höchstwert von  $0,88 \pm 0,36$  nach 11 Injektionen und einen Endwert von  $0,75 \pm 0,17$  nach 15

Injektionen. In der Gruppe  $rAb^{MS2}$  liegt der maximale NMO-Score bei  $0,63 \pm 0,28$  nach 14 Injektionen (Abb. 8).

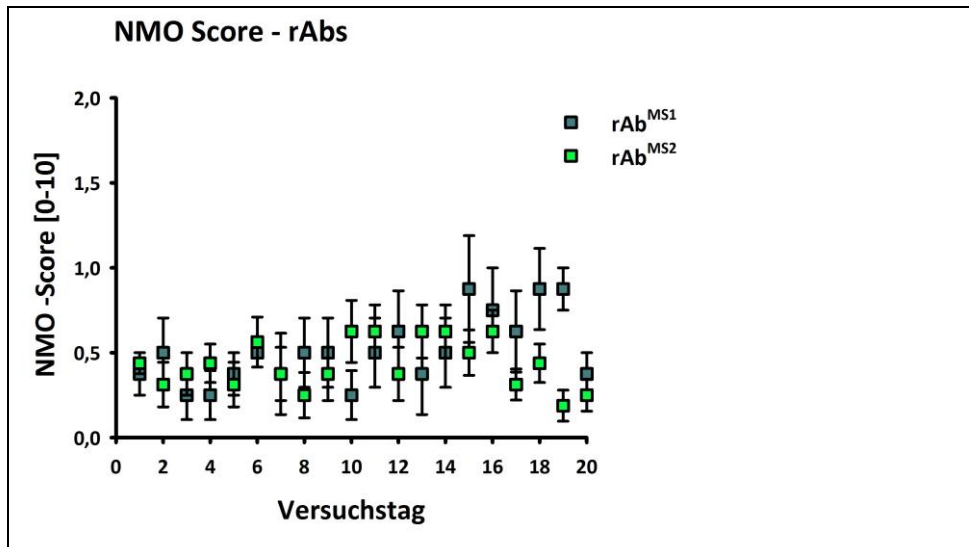


Abbildung 8: Entwicklung NMO-Score  $rAb^{MS1}$  und  $rAb^{MS2}$

### 3.1.2. Auswertung des Gewichts

Die Tiere der Versuchsgruppen wurden im Rahmen der klinischen Betrachtung gewogen, um höhergradige allgemeine Krankheitssymptome wie z.B. systemische Infektionen o.ä. auszuschließen.

#### 3.1.2.1. NMO-IgG und Kontroll-IgG

Insgesamt war bei allen Versuchsgruppen nach der OP ein Abfall des Körpergewichts zu beobachten, nach der Erholungsphase und im Versuchsverlauf kam es allerdings zu einer Erholung des Körpergewichts und zu einem stabilen Gewichtsverlauf. Das durchschnittliche Gewicht der Versuchsgruppen betrug vor der Operation  $162,2 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$  (NMO 1),  $161,3 \text{ g} \pm 0,9 \text{ g}$  (NMO 2),  $180,3 \text{ g} \pm 0,6 \text{ g}$  (NMO 3),  $181,1 \text{ g} \pm 0,6 \text{ g}$  (NMO 4) und  $167,7 \text{ g} \pm 2,2 \text{ g}$  (Kontrollgruppe). An Tag 15 nach der ersten Injektion lagen die Werte bei  $168,7 \text{ g} \pm 5,7 \text{ g}$  (NMO 1),  $179,0 \text{ g} \pm 2,4 \text{ g}$  (NMO 2),  $184,0 \text{ g} \pm 5,7 \text{ g}$  (NMO 3),  $186,4 \text{ g} \pm 4,0 \text{ g}$  (NMO 4) und  $187,2 \text{ g} \pm 2,8 \text{ g}$  (Kontrollgruppe). Zu Versuchsende wogen die Tiere aus der Gruppe NMO 2 im Mittel  $189,0 \text{ g} \pm 3,7 \text{ g}$ , NMO 3 erreichte einen Endwert von  $185,1 \text{ g} \pm 8,9 \text{ g}$  und NMO 4  $193,1 \text{ g} \pm 5,3 \text{ g}$ . In der Kontrollgruppe zeigte sich ein durchschnittliches Gewicht von  $194,6 \text{ g} \pm 4,0 \text{ g}$ . Der erzielte Endwert von NMO

1 lag mit  $169,2 \text{ g} \pm 4,2 \text{ g}$  unter den Werten der anderen Gruppen, wobei diese Tiere auch initial vor der OP ein niedrigeres Ausgangsgewicht hatten (Abb. 9).

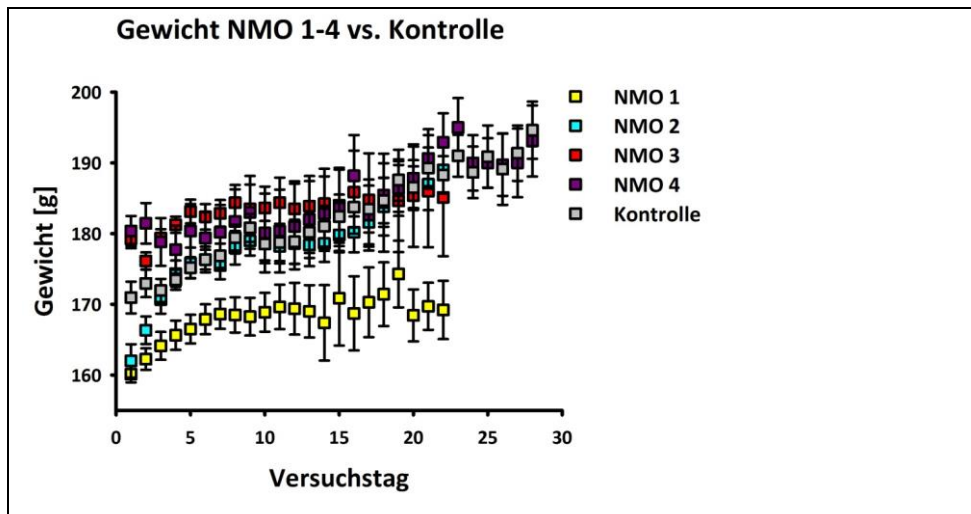


Abbildung 9: Gewicht NMO 1-4 und Kontrolle mit zunehmender Injektionsanzahl

### 3.1.2.2. $rAb^{AQP4}$ und $rAb^{Kontrolle}$

Zu Versuchsbeginn betrug das durchschnittliche Gewicht der Gruppen  $rAb^{AQP4}$  und der  $rAb^{Kontrolle}$   $184,7 \text{ g} \pm 3,1 \text{ g}$  bzw.  $183,3 \text{ g} \pm 4,0 \text{ g}$ . Von dem dritten Versuchstag bis zu Tag 19 nahm das Gewicht der Versuchsgruppen kontinuierlich zu. Den höheren Wert erzielte hierbei  $rAb^{Kontrolle}$  mit  $201,5 \text{ g} \pm 4,2 \text{ g}$ . Die Gruppe  $rAb^{AQP4}$  erreichte  $193,3 \text{ g} \pm 3,5$ . Zu Versuchsende erreichte ebenfalls Gruppe  $rAb^{Kontrolle}$  mit  $203,2 \text{ g} \pm 4,0 \text{ g}$  den höchsten Durchschnittswert vor der Gruppe  $rAb^{AQP4}$  mit  $199,3 \text{ g} \pm 3,2 \text{ g}$  (Abb. 10).

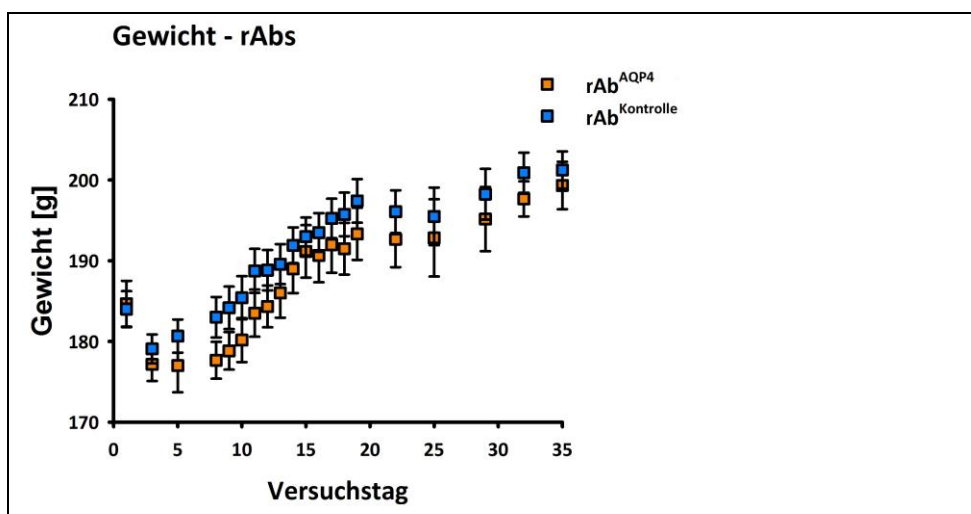


Abbildung 10: Entwicklung Gewicht  $rAb^{AQP4}$  und  $rAb^{Kontrolle}$



### **3.1.3. Auswertung der Laufleistung (RotaRod)**

#### **3.1.3.1. NMO IgG und Kontroll-IgG**

Bei der Versuchsgruppe NMO 1 zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der relativen Laufzeit mit steigender Injektionsanzahl. Nach 5 Injektionen erreichten die Tiere nur 47,0 %  $\pm$  13,5 % ihrer Ausgangsleistung. Im weiteren Versuchsverlauf fiel die relative Laufzeit signifikant auf 33,2 %  $\pm$  11,1 % nach 10 bzw. auf 23,0 %  $\pm$  6,1 % nach 15 Injektionen ab (Abb. 11A).

In Versuchsgruppe NMO 2 betrug die relative Laufzeit nach 5 Injektionen nur noch 70,0 %  $\pm$  4,5 % des Startwertes. Nach 5 weiteren Injektionen fiel dieser Wert auf 32,0 %  $\pm$  12,6 % ab (Abb. 11B).

Bei der Gruppe NMO 3 fiel die relative Laufzeit nach 5 Injektionen signifikant auf 44,6 %  $\pm$  10,2 % ab. Im weiteren Versuchsverlauf erreichen die Tiere nach 10 bzw. 15 Injektionen noch 38,0 %  $\pm$  13,1 % bzw. 36,0 %  $\pm$  13,0 % ihrer Ausgangsleistung (Abb. 11C). Versuchsgruppe 4 zeigte ebenfalls einen kontinuierlichen Abfall der relativen Laufzeit.

Nach 5 Injektionen erreichten die Tiere noch 66,5 %  $\pm$  16,2 % ihrer Laufzeit vor Versuchsbeginn. Die Laufleistung fällt nach 10 Injektionen signifikant auf 29,2 %  $\pm$  13,4 % und nach 5 weiteren Injektionen auf 26,1 %  $\pm$  14,9 % ab (Abb. 11D).

In der Kontrollgruppe zeigte sich zunächst eine leicht sinkende Laufzeit nach 5 Injektionen und 10 Injektionen auf 82,8 %  $\pm$  7,7% bzw. 74,5 %  $\pm$  10,2 %. Nach 15 Injektionen erreichten die Tiere jedoch wieder eine relative Laufzeit von 82,5 %  $\pm$  11,8 % (Abb. 11E).

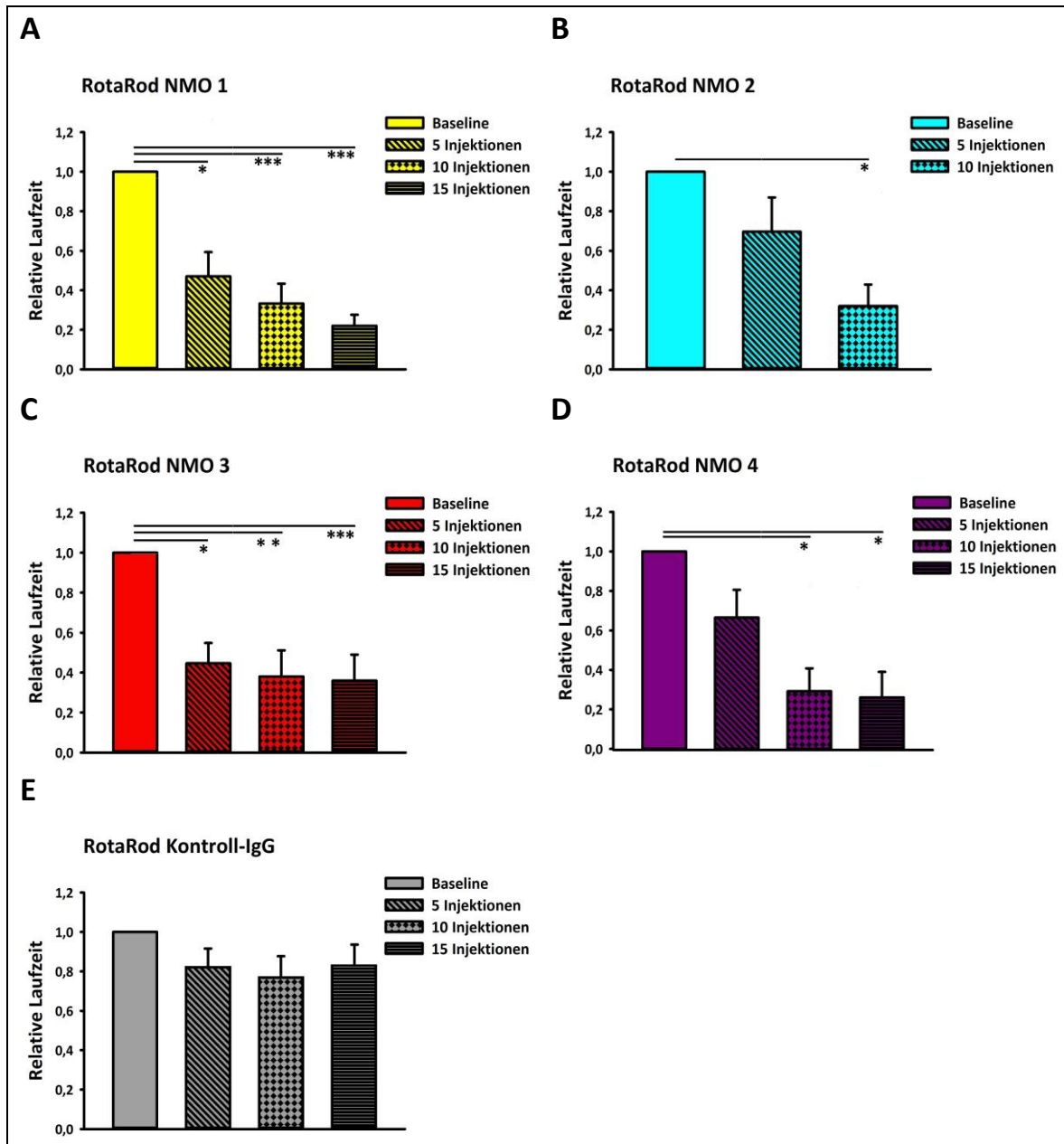


Abbildung 11: Relative Laufzeit der Gruppen NMO 1-4 mit steigender Injektionsanzahl

### 3.1.3.2. rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

Die Tiere der Versuchsgruppen rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup> wurden untereinander verglichen. Aufgrund der unterschiedlichen Operations- und Injektionstechnik wurde die Laufleistung der Tiere nicht mit der Kontrollgruppe 5 verglichen.

Da am 23ten Versuchstag der errechnete Pumpstopp der osmotischen Pumpe eintrat wurden die Ausgangsdaten von Versuchstag 0 mit denen von Tag 23 verglichen.

Anschließend wurden die Werte von Versuchstag 23 mit jenen von Tag 29 verglichen, da in der Zwischenzeit keine Applikation von IgG mehr durch die Pumpe erfolgt war. Bei  $rAb^{Kontrolle}$  zeigte sich bis Versuchstag 16 ein leichter Abfall der relativen Laufleistung auf  $72,1 \% \pm 24,8 \%$  des Ausgangswertes mit Wiederanstieg auf  $86,5 \% \pm 15,2 \%$  an Versuchstag 23 und  $86,1 \% \pm 18,7 \%$  am Versuchstag 29. Bei  $rAb^{AQP4}$  fiel hingegen die Laufleistung der Tiere bis Versuchstag 23 auf  $43,0 \% \pm 14,6 \%$  der Ausgangslaufzeit vor Versuchsbeginn ab. Nach Pumpstop kam es zu einer Erholung an Tag 29 auf  $71,3 \% \pm 27,7 \%$  (Abb. 12).

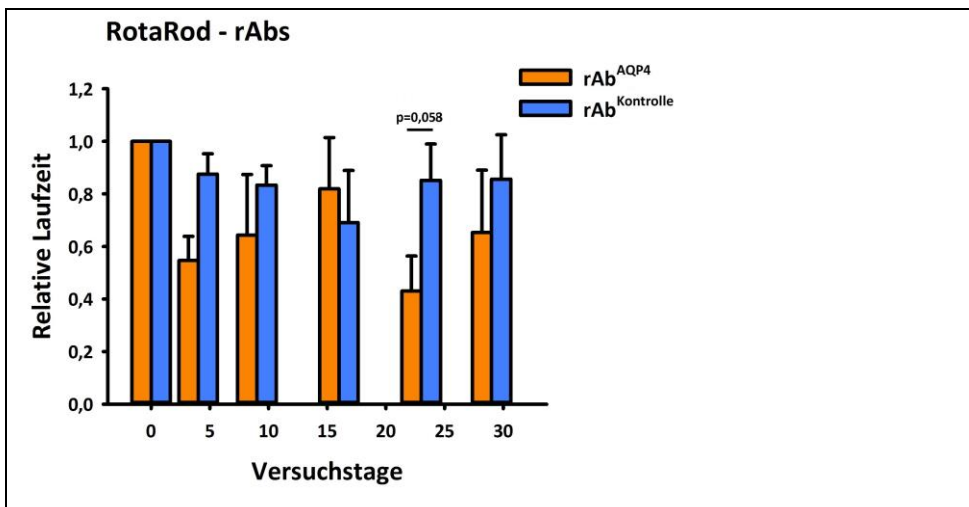


Abbildung 12: Relative Laufzeit  $rAb^{AQP4}$  und  $rAb^{Kontrolle}$

Bei  $rAb^{MS1}$  und  $rAb^{MS2}$  zeigten sich zu Versuchsende nur geringfügige Veränderungen in der relativen Laufzeit. So zeigten die Versuchstiere der Gruppe  $rAb^{MS1}$  sogar eine graduelle Verbesserung auf  $155,6 \% \pm 33,3 \%$  ihrer Ausgangsleistung. Die Gruppe  $rAb^{MS2}$  erzielte einen Wert von  $97,7 \% \pm 31,6 \%$  (Abb. 13).

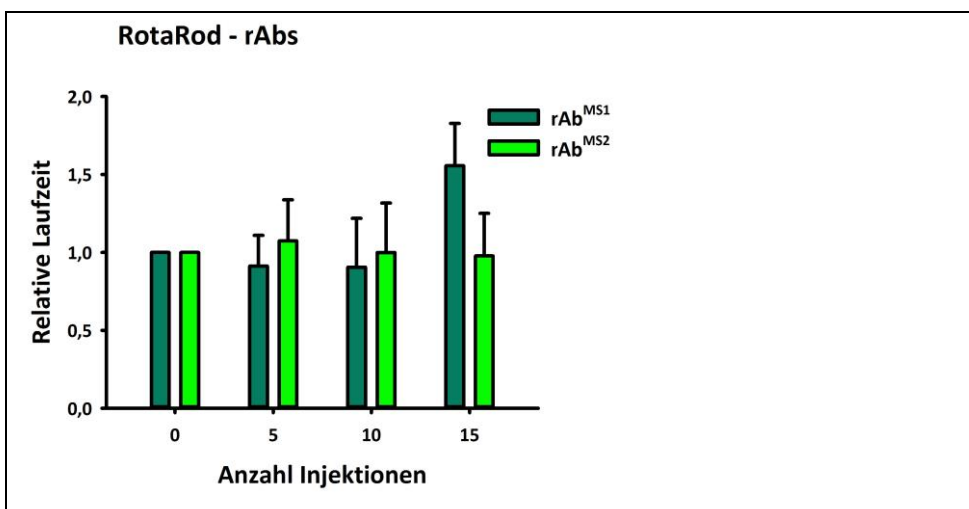


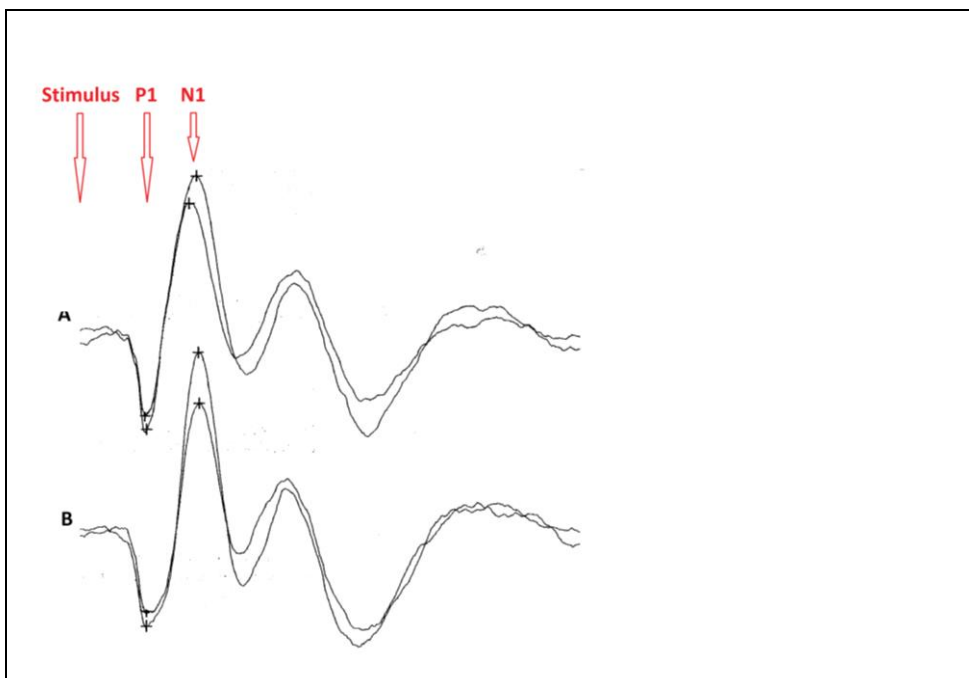
Abbildung 13: Relative Laufzeit  $rAb^{MS1}$  und  $rAb^{MS2}$

### 3.2. Auswertung Elektrophysiologie

Bei den Versuchstieren der Gruppen NMO1, NMO 2 und Kontroll-IgG wurde nach Implantation von kranialen Schrauben eine Messung der SEPs und der MEPs durchgeführt. Eine zweite Vergleichsmessung erfolgte am Versuchsende nach der Injektion der IgG Fraktionen vor Gewebeentnahme.

#### 3.2.1. Auswertung der SEP

Bei der Evaluierung der SEPs wurde die Latenz zwischen Stimulus und P1 sowie die Amplitude zwischen P1 und N1 zu den oben genannten Zeitpunkten gemessen und zur Auswertung in Relation zum Ausgangswert gesetzt.

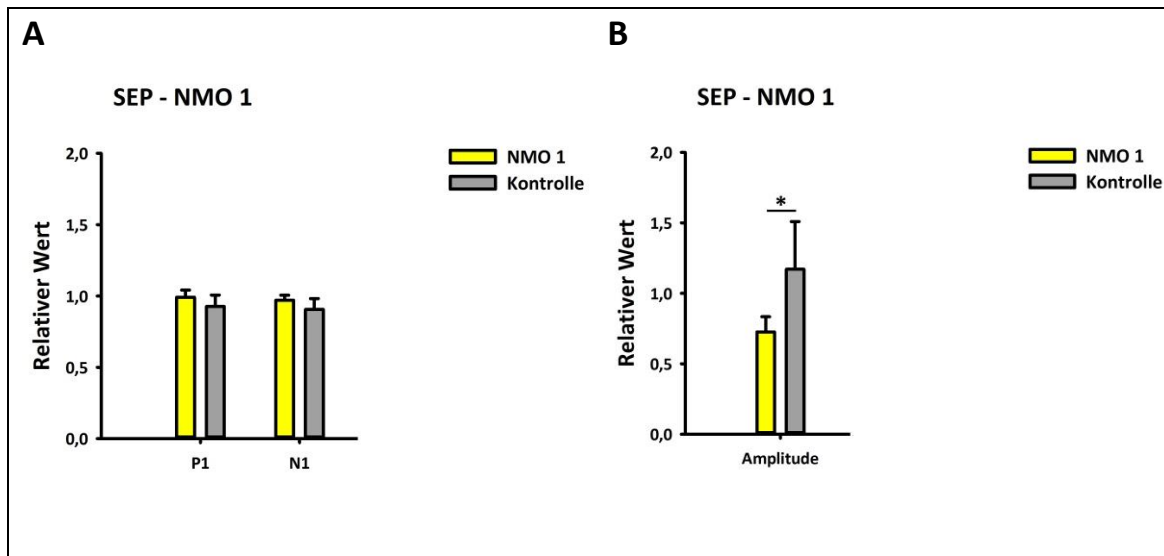


**Abbildung 14: Ableitung SEP**

Abbildung 14 zeigt eine Beispielaufnahme der SEPs. Der Nervus tibialis des Versuchstieres wurde jeweils in 2 Serien auf der rechten Seite (Abb. 14A) sowie auf der linken Seite (Abb. 14B) stimuliert und die Reizantwort über dem Kortex mittels den kranial implantierten Schrauben abgeleitet. Anschließend wurden die Messpunkte P1 und N1 festgelegt.

Im Vergleich der Latenzveränderungen zeigte sich nach komplettem Injektionszyklus von 15 Injektionen nur eine geringe Veränderung in der Versuchsgruppe NMO 1 und Kontrollgruppe. Die relative Leitungslatenz lag bei Versuchsende bei 99,1 %  $\pm$  5,3 % (P1) und 97,1 %  $\pm$  3,7 % (N1) bei NMO 1 bzw. bei 92,7 %  $\pm$  8,6 % und 90,6 %  $\pm$  8,1 % in der Kontrollgruppe.

Die Amplitude der SEP bei NMO 1 nahm um 35,5 % auf 64,5 %  $\pm$  13,2 % ab. In der Kontrollgruppe betrug die Amplitude 117,1 %  $\pm$  33,8 % des Ausgangswertes (Abb. 15).



**Abbildung 15: Auswertung Latenz (A) und Amplitude (B) SEP NMO 1 und Kontrolle**

In Versuchsgruppe NMO 2 und der entsprechenden Kontrollgruppe zeigten sich bzgl. der relativen Leitungslatenz ebenfalls nur eine geringe Veränderungen. Die Messpunkte P1 und N1 lagen zu Versuchsende bei 112,0 %  $\pm$  11,0 % und 98,7 %  $\pm$  10,2 % (NMO 2) bzw. 107,3 %  $\pm$  6,1 % und 111,3 %  $\pm$  16,8 % (Kontrolle) des Ausgangswertes.

Bei Gruppe NMO 2 sank die SEP-Amplitude zwischen P1 und N1 auf 23,2 %  $\pm$  7,4 % des Ausgangswertes, in der entsprechenden Kontrolle jedoch nur auf 68,3 %  $\pm$  24,1 % (Abb. 16).

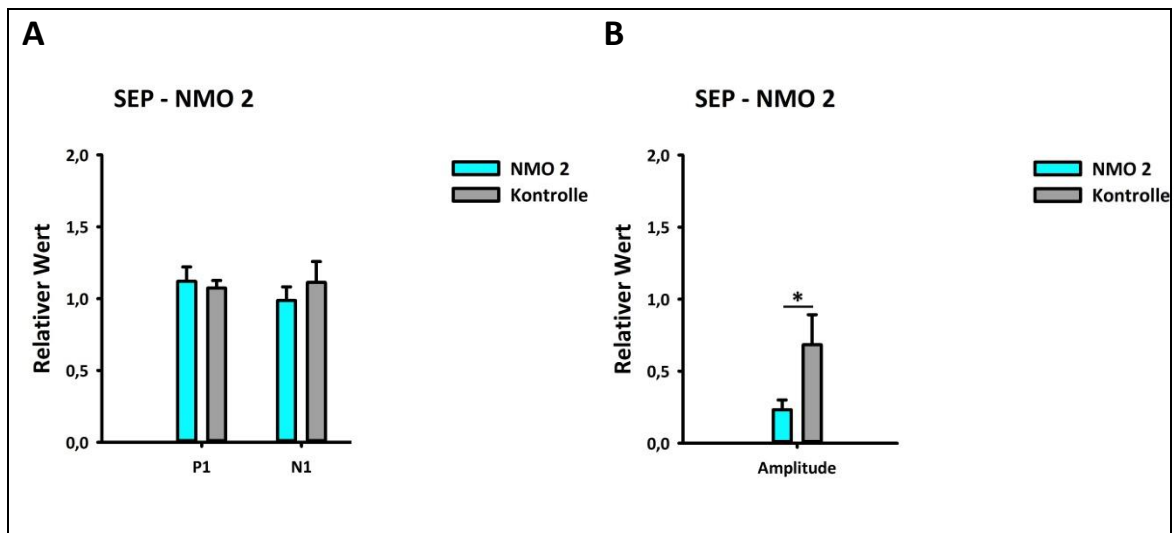


Abbildung 16: Auswertung der Latenz (A) und Amplitude (B) SEP NMO 2 und Kontrolle

### 3.2.2. Auswertung der MEP

Bei den MEPs wurde die Latenz zwischen Stimulus und Fußpunkt N1 bestimmt. Der Ausgangswert nach kranialer Schraubenimplantation wurde wie bei den SEP in Relation zum Endwert vor Gewebeentnahme gesetzt. Aufgrund der variablen Amplitude der Muskelantwort, was durch die invasive Messung mittels Nadelelektroden bedingt ist, wurde auf eine Auswertung der Amplitude verzichtet.

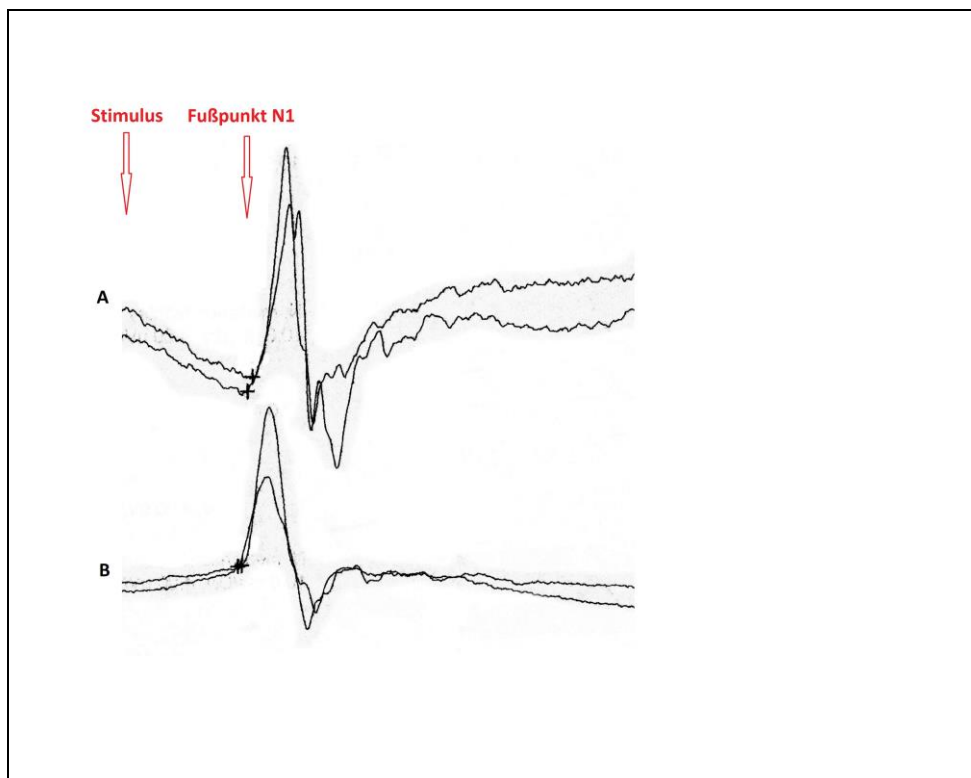


Abbildung 17: Ableitung MEP

Abbildung 17 zeigt eine Beispielaufnahme der MEPs. Der motorische Kortex des Versuchstieres wurde über die kranial implantierten Schrauben jeweils zweimal auf der rechten Seite (Abb. 17A) sowie auf der linken Seite (Abb. 17B) stimuliert und die Reizantwort über eine Nadelelektrode im Muskulus tibialis anterior abgeleitet.

Die relative Latenz der MEPs in der Versuchsgruppe NMO 1 am Ende des Versuches betrug  $95,9 \% \pm 6,5 \%$  des Ausgangswertes vor der ersten Injektion. Die Kontrollgruppe erzielte einen Wert von  $92,2 \% \pm 6,3 \%$  (Abb. 18).

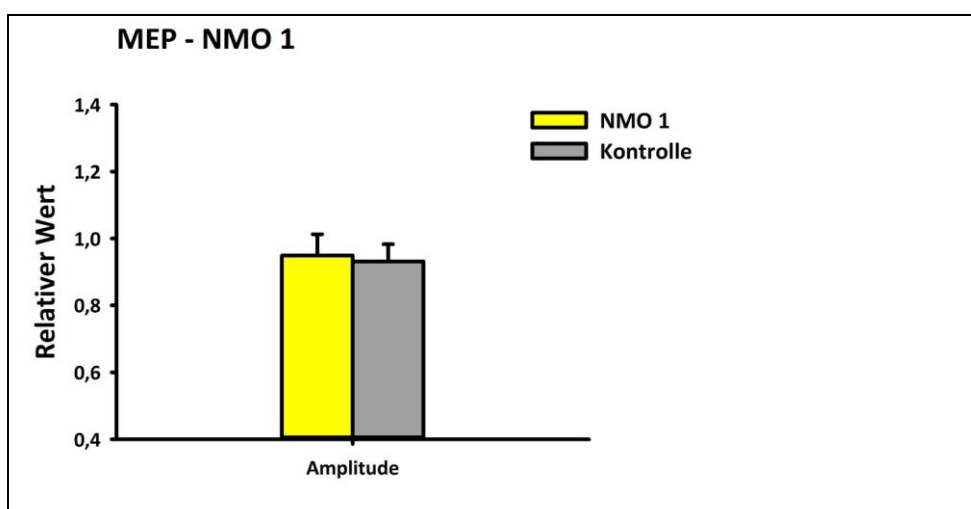


Abbildung 18: Auswertung MEP NMO 1

In Versuchsgruppe NMO 2 zeigte sich am Ende des Versuches ebenfalls kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Die relative Latenz lag bei  $97,0 \% \pm 14,1 \%$ , bei der Kontrollgruppe bei  $87,3 \% \pm 3,0 \%$  (Abb. 19).

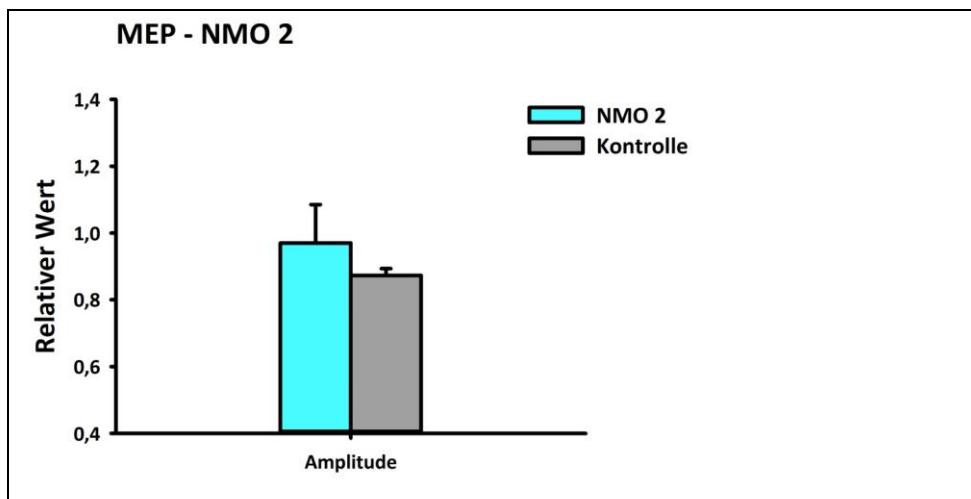


Abbildung 19: Auswertung MEP NMO 2

### 3.3. Auswertung der Bildgebung

Die MR-Bildgebung wurde an ausgewählten Versuchstieren der Versuchgruppen NMO 2 und NMO 3 durchgeführt und es wurde besonderes Augenmerk auf die Aufnahme des Kontrastmittels Gadofluorin im Bereich des Myelons gelegt. Hierbei zeigten sich zentromedulläre Kontrastmittel aufnehmende Läsionen im Bereich des thorakolumbalen Übergangs im Bereich der Katheterspitze, hier exemplarisch an Versuchstieren der Gruppen NMO2 und 3 gezeigt (Abb. 20).

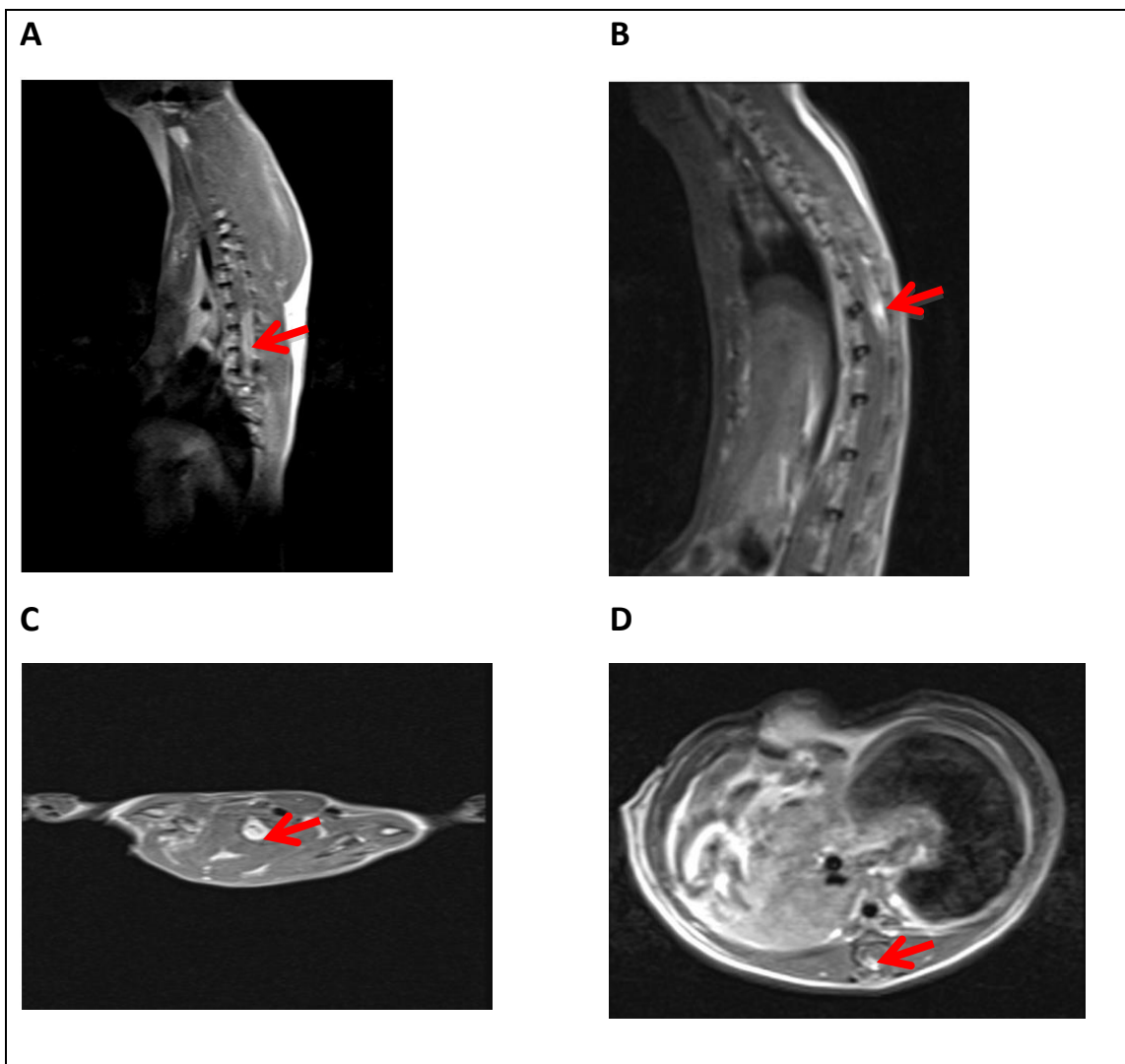


Abbildung 20: Beispiel Kontrastmittelanreicherung in axialen und sagittalen Aufnahmen des Rückenmarks



Versuchsgruppe	Tiernummer	EAN-Score	MRT-Befund
NMO 2	5	3,5	KMA knapp über Katheter
NMO 2	6	2	KMA an Katheterspitze
NMO 2	9	3,5	KMA 1 cm über Katheterspitze
NMO 3	2	7,5	KMA zervikal + Katheterspitze
NMO 3	3	3	KMA Katheterspitze

**Tabelle 4: exemplarische Übersicht über die Bereiche mit Kontrastmittelanreicherung (KMA)**

### *3.4. Auswertung der Einzelfärbungen*

Nach Versuche wurde das Myelon präpariert und für immunhistochemische Färbungen aufbereitet. Die Rückenmarkschnitte der Versuchstiere wurden gemäß 2.5.2.1. gefärbt und anschließend in 10facher Vergrößerung aufgenommen. Zur Auswertung der Farbintensität wurden Auswertungsareale der Größe  $250 \mu\text{m}^2$  festgelegt und im Bereich der weißen Substanz des Vorder- und Hinterhorns sowie in der grauen Substanz von Vorder- und Hinterhorn positioniert.

#### **3.4.1. Auswertung Human-IgG-Färbung**

Die Gewebeproben der Rückenmäre der Versuchstiere wurden gemäß 2.5.2.1. mit einem anti-human-IgG AK gefärbt und mittels DAB-Färbung entwickelt. Die Ergebnisse der Färbintensität der verschiedenen Versuchsgruppen sind im Folgenden dargestellt. Umschriebene Areale mit einer hohen anti-human-IgG-Dichte wurden als Läsionsbereich definiert (Abb. 21).

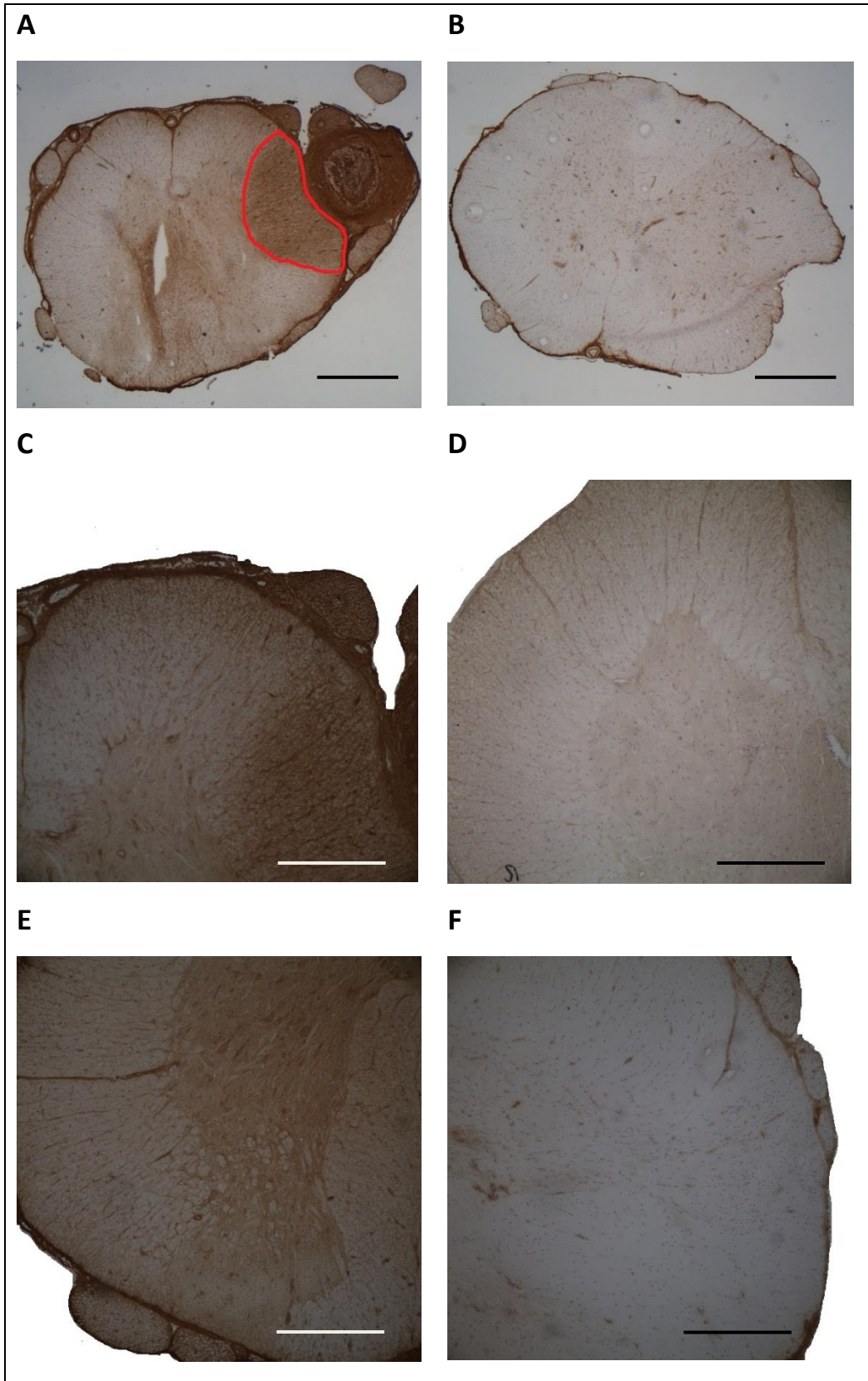


Abbildung 21: Beispiele NMO-IgG-DAB-Färbung, NMO 1 10fach vergrößert (Maßstab 300 µm) mit Läsionsareal (rot) (A), Kontrolle 10fach (B), Vorderhorn NMO 1 20fach (Maßstab 200 µm) mit Läsionsareal (C), Vorderhorn Kontrolle 20fach (D), Hinterhorn NMO 1 (E) und Hinterhorn Kontrolle 20fach (F)

### 3.4.1.1. NMO-IgG und Kontroll-IgG

In den NMO Versuchsgruppen zeigte sich definitionsgemäß die höchste Farbintensität in den Läsionsarealen. Die verschiedenen Gruppen erzielten hierbei Werte von  $198,0 \pm 2,6$  (NMO1),  $179,0 \pm 2,5$  (NMO3) und  $168,2 \pm 0,3$  (NMO4) (Abb. 22 A-C). In der Kontrollgruppe zeigten sich keine Areale erhöhter Anreicherung von Anti-Human-IgG (Abb. 22D). Des Weiteren war in allen Versuchsgruppen die graue Substanz intensiver angefärbt als die weiße Substanz. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei NMO 4. Die graue Substanz erreichte eine durchschnittliche Färbintensität von  $156,3 \pm 0,7$  gegenüber der weißen Substanz mit  $151,2 \pm 0,8$ . In den Versuchsgruppen NMO 1 und NMO 3 betragen die Färbintensitäten von grauer und weißer Substanz  $176,4 \pm 3,4$  und  $167,4 \pm 3,5$  bzw.  $154,6 \pm 1,1$  und  $151,7 \pm 1,3$ . In der Kontrollgruppe zeigten sich Werte von  $166,4 \pm 3,9$  für die graue und  $152,8 \pm 1,6$  für die weiße Substanz (Abb. 22).

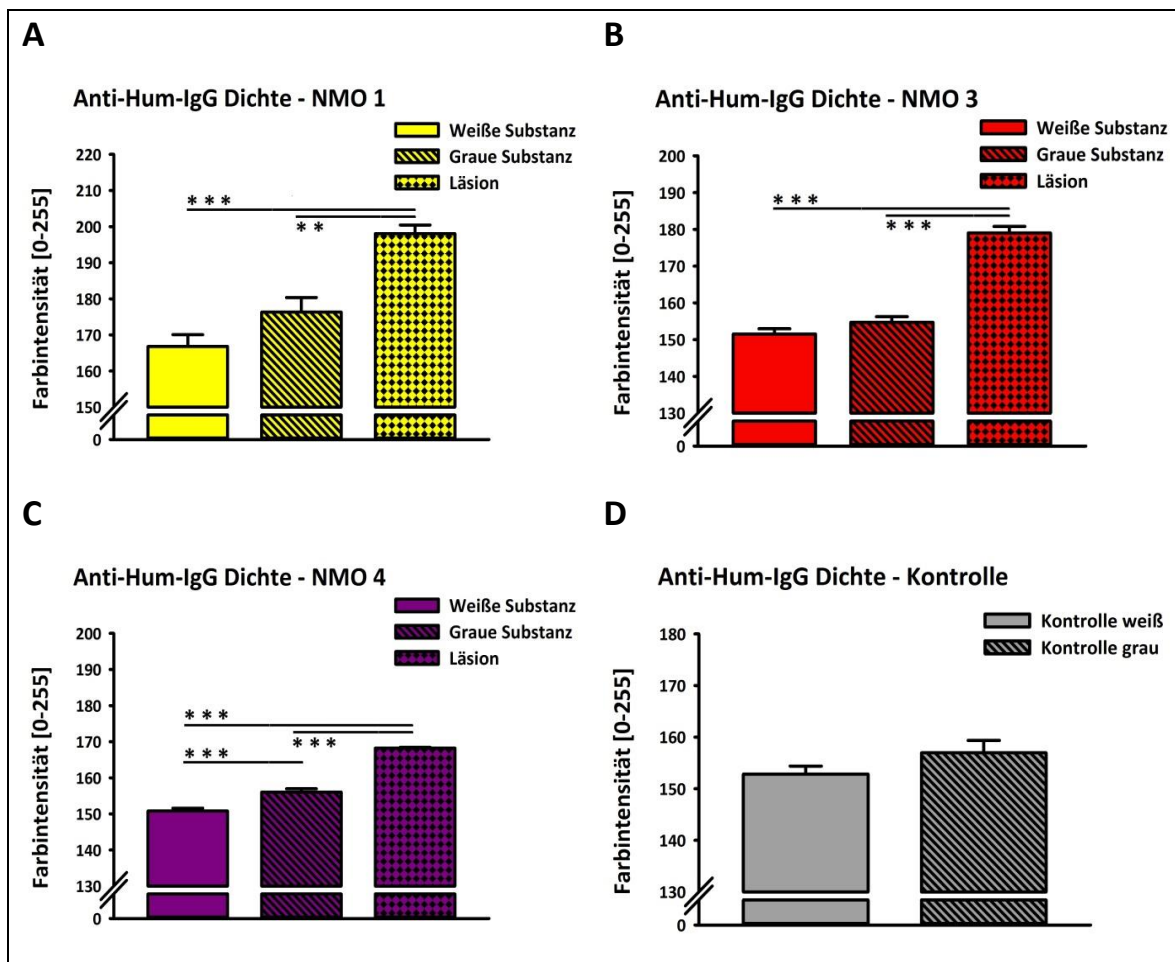


Abbildung 22: Dichte Human-IgG NMO-IgG und Kontrollgruppe

Aufgrund der überwiegenden Lokalisation der human-IgG positiven Läsionen in der weißen Substanz der NMO-Tiere wurden diese mit der weißen Substanz der Kontrollgruppe verglichen.

Es zeigt sich eine deutlich signifikante erhöhte Anreicherung von Anti-Human-IgG in den Läsionsarealen von NMO 1 ( $198,0 \pm 2,69$ ), NMO 3 ( $179,0 \pm 2,5$ ) und NMO 4 ( $168,2 \pm 0,3$ ) gegenüber der weißen Substanz der Kontrollgruppe ( $152,8 \pm 1,6$ ) (Abb. 23).

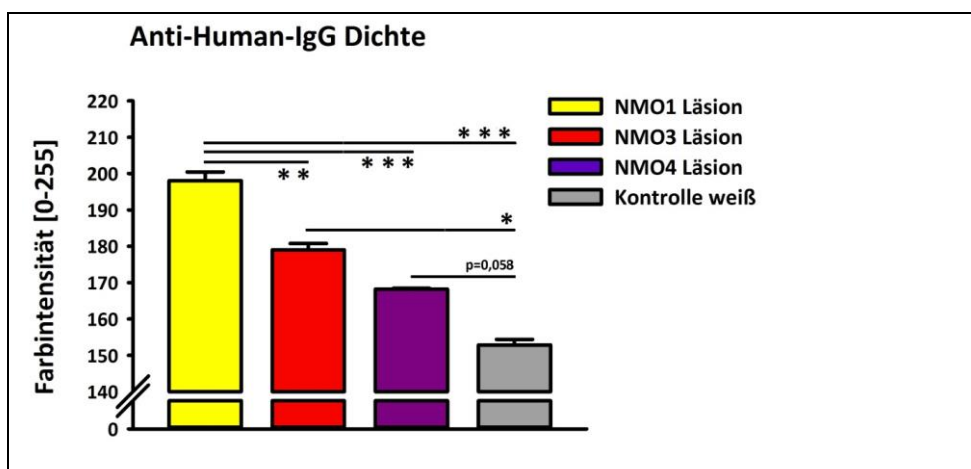


Abbildung 23: Dichte Human-IgG Läsion NMO versus weiße Substanz Kontrollgruppe

### 3.3.1.2. $rAB^{AQP4}$ und $rAB^{Kontrolle}$

Bei den Versuchsgruppen  $rAB^{AQP4}$  und  $rAB^{Kontrolle}$  zeigten sich keine umschriebenen Areale mit erhöhter Dichte von anti-human-IgG.

Die weiße Substanz von  $rAB^{AQP4}$  war mit  $153,9 \pm 0,7$  etwas stärker gefärbt als die graue Substanz mit  $152,7 \pm 0,7$ . Im Vergleich der beiden Gruppen war  $rAB^{Kontrolle}$  signifikant weniger stark gefärbt. Die weiße Substanz erzielte eine Farbintensität von  $148,3 \pm 1,0$ , die graue einen Wert von  $149,2 \pm 0,8$  (Abb. 24).

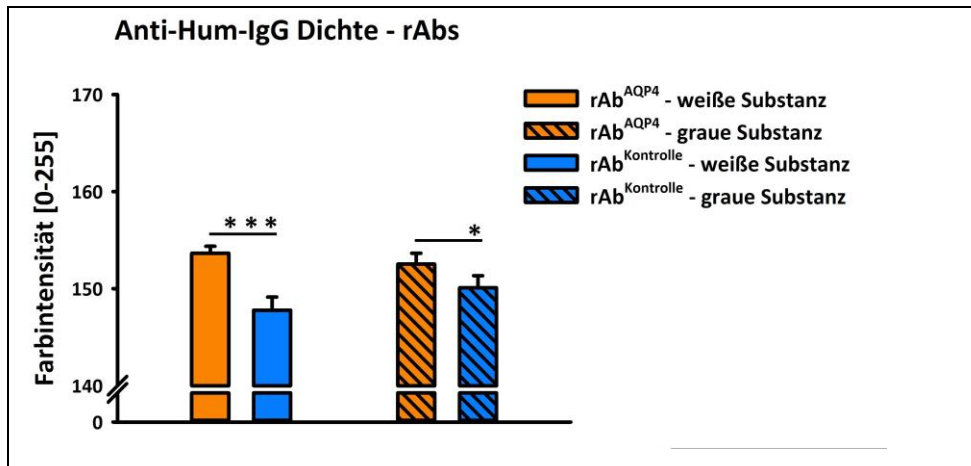


Abbildung 24: Dichte Human-IgG rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

### 3.4.2. Auswertung AQP4-Färbung

Im nächsten Schritt wurden die Gewebeproben des Rückenmarks der Versuchstiere mit einem polyklonalen AK gegen AQP4 gefärbt. Die Ergebnisse der Färbintensität der verschiedenen Versuchsgruppen sind im Folgenden dargestellt. Die über die anti-human-IgG-Färbung definierten Läsionsbereiche wurden neben der Auswertung der weißen und grauen Substanz des Rückenmarks gesondert betrachtet (Abb. 25).



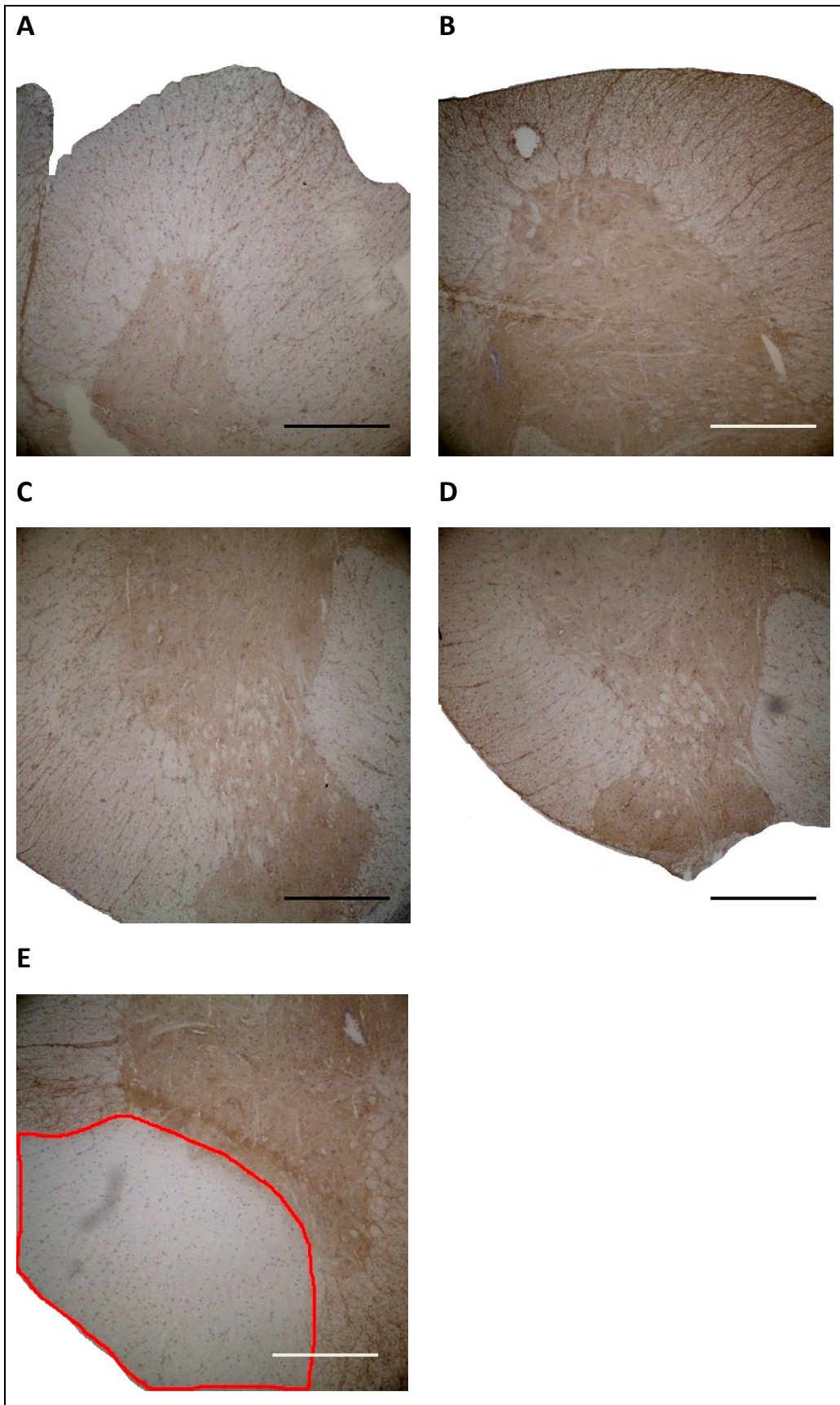


Abbildung 25: Beispiele AQP4-DAB-Färbung, Vorderhorn NMO 1 20fach (Maßstab 200 µm) vergrößert (rot) (A), Vorderhorn Kontrolle 20fach (B), Hinterhorn NMO 1 20fach (C), Hinterhorn Kontrolle 20fach (D), Vorderhorn NMO 1 mit Läsion (rot) (E)

### 3.4.2.1. NMO-IgG und Kontroll-IgG

Entsprechend der Verteilung von AQP4 wies in allen Versuchsgruppen die graue Substanz eine höhere Färbintensität auf als die weiße Substanz. Signifikant war dieser Unterschied bei NMO 1 (Abb. 26A), NMO4 (Abb. 26C) und der Kontrollgruppe (Abb. 26D). Die durchschnittlichen Intensitätswerte für graue und weiße Substanz liegen bei  $110,6 \pm 2,1$  bzw.  $103,8 \pm 1,8$  (NMO 1),  $107,5 \pm 1,6$  bzw.  $102,9 \pm 1,4$  (NMO 4) und  $111,9 \pm 1,3$  bzw.  $104,1 \pm 1,0$  (Kontrolle). In der Versuchsgruppe NMO 3 war die graue Substanz ebenfalls intensiver gefärbt gegenüber der weißen Substanz ( $109,5 \pm 5,5$  bzw.  $102,2 \pm 5,3$ ), jedoch war der Unterschied hier nicht signifikant (Abb. 26B).

Die niedrigsten Färbintensitäten wurden in den Läsionsarealen beobachtet. So zeigten sich Werte von  $94,6 \pm 4,4$  (NMO 1),  $96,4 \pm 16,5$  (NMO 3) und  $96,4 \pm 16,5$  (NMO 4) (Abb. 26).

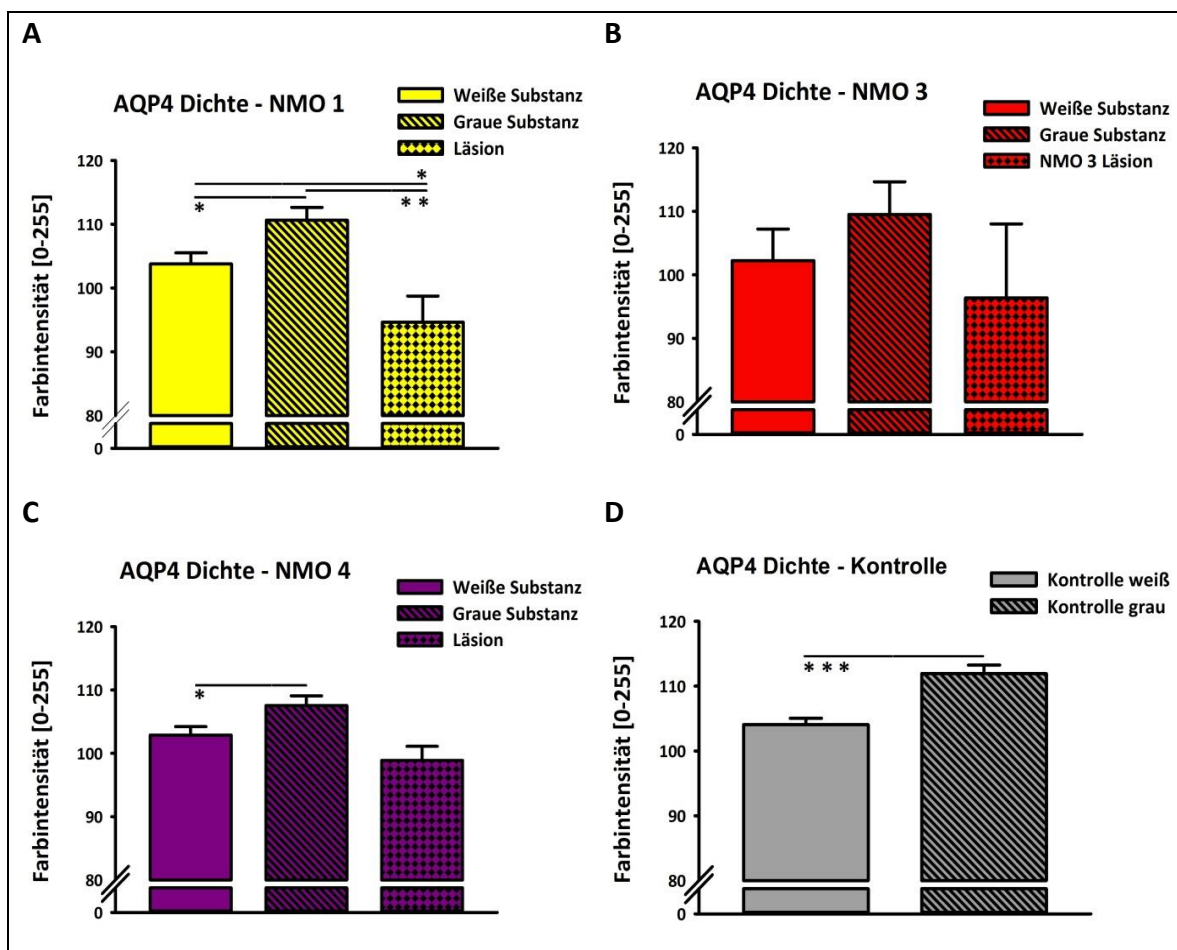


Abbildung 26: Dichte AQP4 NMO-IgG und Kontrollgruppe

Aufgrund der Lokalisation der sichtbaren Läsionen in Regionen der weißen Substanz wurden diese mit der weißen Substanz der Kontrollgruppe verglichen. Hierbei zeigte sich eine signifikant verminderte Färbintensität der Läsionen von NMO 1 ( $94,6 \pm 4,4$ ) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $104,1 \pm 1,0$ ). In den Läsionsarealen der Gruppen NMO 3 und NMO 4 waren die Färbintensitäten mit  $96,4 \pm 16,5$  bzw.  $98,9 \pm 3,1$  ebenfalls vermindert jedoch nicht signifikant (Abb. 27).

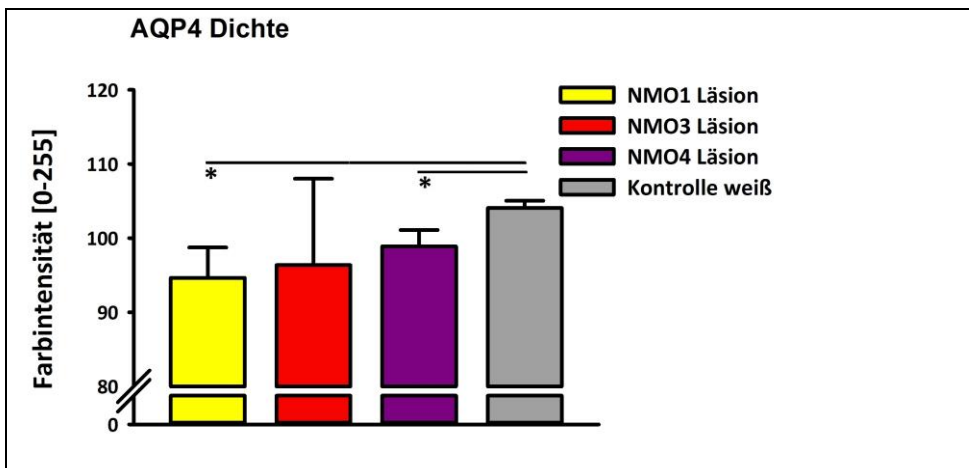


Abbildung 27: Vergleich Dichte AQP4 Läsionen versus weiße Substanz Kontrollgruppe

### 3.4.2.2. $rAB^{AQP4}$ und $rAB^{Kontrolle}$

Es zeigte sich in der grauen Substanz von  $rAB^{AQP4}$  und  $rAB^{Kontrolle}$  eine höhere Farbintensität der AQP4-Färbungen ( $113,6 \pm 1,3$  bzw.  $113,7 \pm 3,1$ ) als in der jeweils weißen Substanz ( $108,5 \pm 1,4$  bzw.  $106,7 \pm 2,4$ ) (Abb. 28). Signifikante Gruppenunterschiede bestehen nicht.



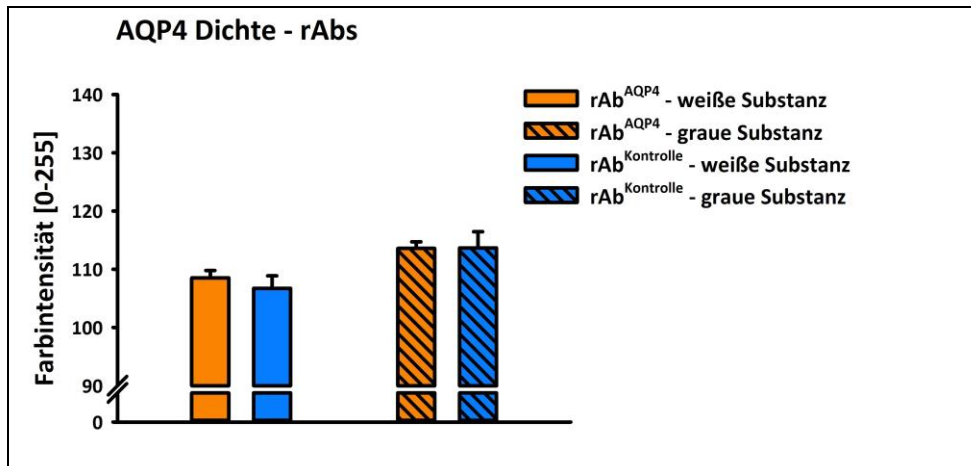
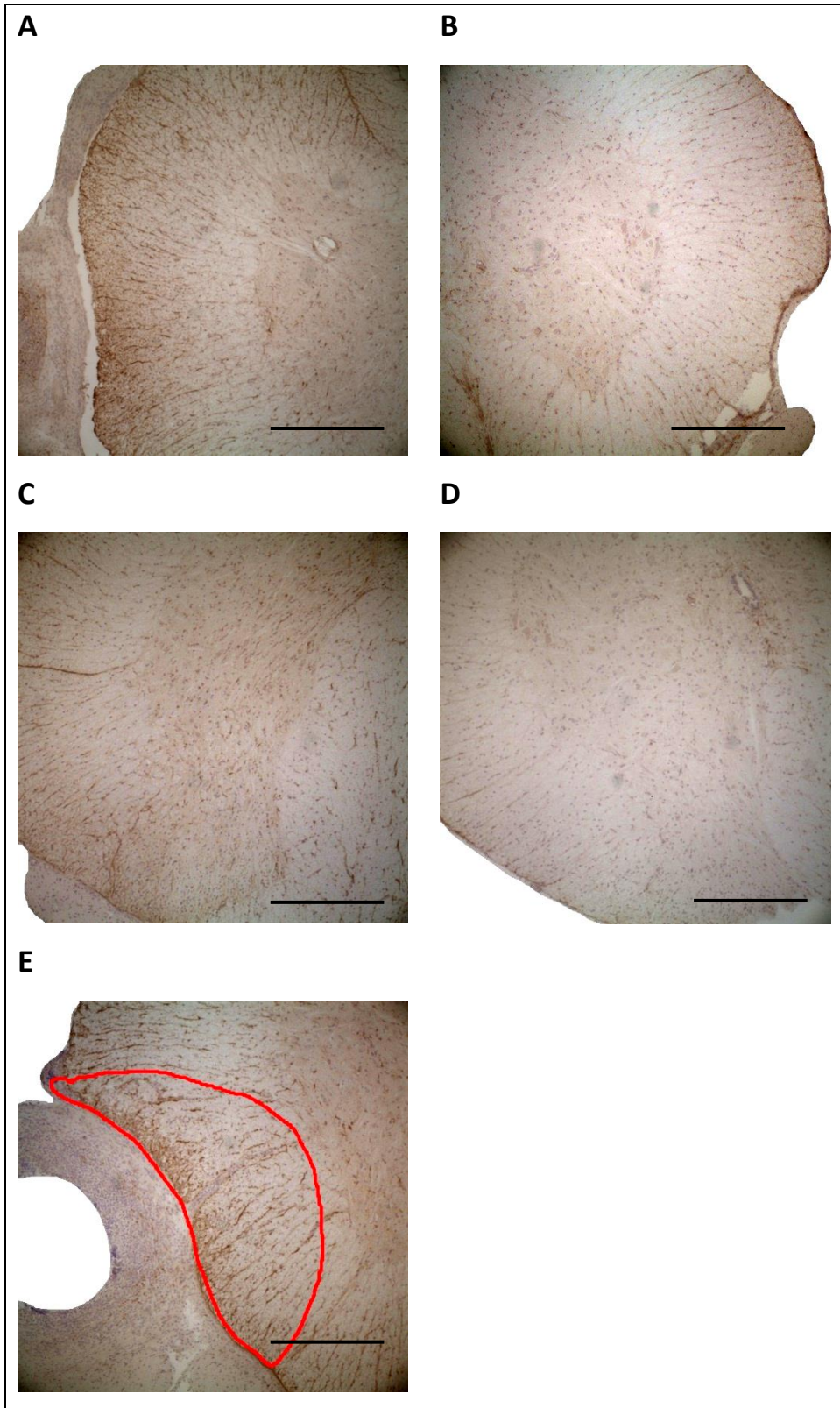


Abbildung 28: Vergleich Dichte AQP4 rAb<sup>AQP4</sup> und rAb<sup>Kontrolle</sup>

### 3.4.3. Auswertung GFAP-Färbungen

Die Gewebeproben des Rückenmarks der Versuchstiere wurden mit dem Astrozytenmarker GFAP gefärbt. Es wurde die Färbeintensität der Astrozyten in einem definierten Messareal ( $65423 \mu\text{m}^2$ ) analysiert. Zudem wurden die gefärbte Astrozytenfläche und die Anzahl von sichtbaren Astrozyten bestimmt. Umschriebene Läsionsareale wurden mit der weißen und grauen Substanz des Rückenmarks der jeweiligen Versuchsgruppe sowie der weißen Substanz der Kontrollgruppe verglichen (Abb. 29).



**Abbildung 29: Beispielen GFAP-DAB-Färbung, Vorderhorn NMO 1 20fach (Maßstab 300 µm) vergrößert (rot) (A), Vorderhorn Kontrolle 20fach (B), Hinterhorn NMO 1 20fach (C), Hinterhorn Kontrolle 20fach (D), Vorderhorn NMO 1 mit Läsion (rot) (E)**

### 3.4.3.1. NMO-IgG und Kontroll-IgG

#### 3.4.3.1.1. Auswertung Dichte GFAP

In den NMO-Versuchsgruppen zeigte sich die höchste Farbintensität der Astrozytenfärbung in den Läsionsarealen. Im Vergleich zu der weißen Substanz war diese bei NMO 3 signifikant höher. So zeigten sich hier in den Läsionsarealen ein Wert von  $129,3 \pm 0,9$ , in der grauen und weißen Substanz Werte von  $117,8 \pm 3,2$  bzw.  $119,6 \pm 1,8$  (Abb. 30B). Bei NMO 1 und NMO 4 waren die Läsionsareale ebenfalls intensiver GFAP gefärbt als die jeweilige graue und weiße Substanz. NMO 1 erzielte Intensitätswerte von  $128,3 \pm 3,5$  (Läsion),  $122,6 \pm 1,6$  (graue Substanz) und  $126,5 \pm 1,6$  (weiße Substanz) (Abb. 30A). Bei NMO 4 zeigten sich Werte von  $121,5 \pm 3,4$  (Läsion),  $116,2 \pm 1,6$  (graue Substanz) und  $119,9 \pm 1,4$  (weiße Substanz) (Abb. 30C). Die Kontrollgruppe wies eine intensivere Färbung der grauen Substanz ( $119,5 \pm 1,2$ ) im Vergleich zu der weißen Substanz ( $118,0 \pm 1,3$ ) auf (Abb. 30D).

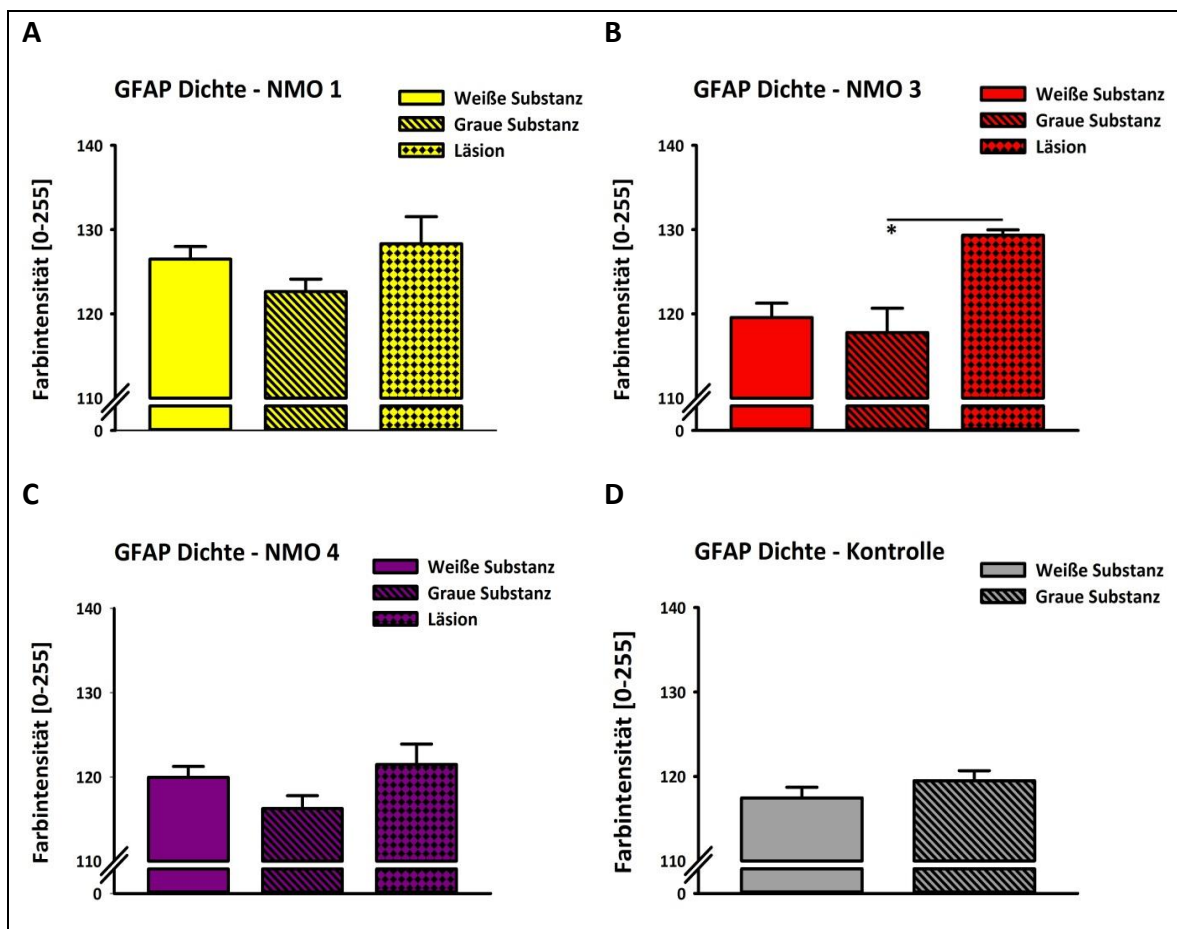


Abbildung 30: Dichte GFAP NMO-IgG und Kontrollgruppe

Im Vergleich der Farbintensität der Läsionsareale der verschiedenen Versuchsgruppen mit der der weißen Substanz der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikant höhere GFAP Dichte bei NMO 1 ( $129,3 \pm 0,9$ ) und NMO 3 ( $129,3 \pm 0,9$ ). Bei NMO 4 zeigte sich mit  $121,5 \pm 3,4$  ebenfalls eine höhere Farbintensität als in der Kontrollgruppe mit  $118,0 \pm 1,3$  die jedoch nicht signifikant war (Abb. 31).

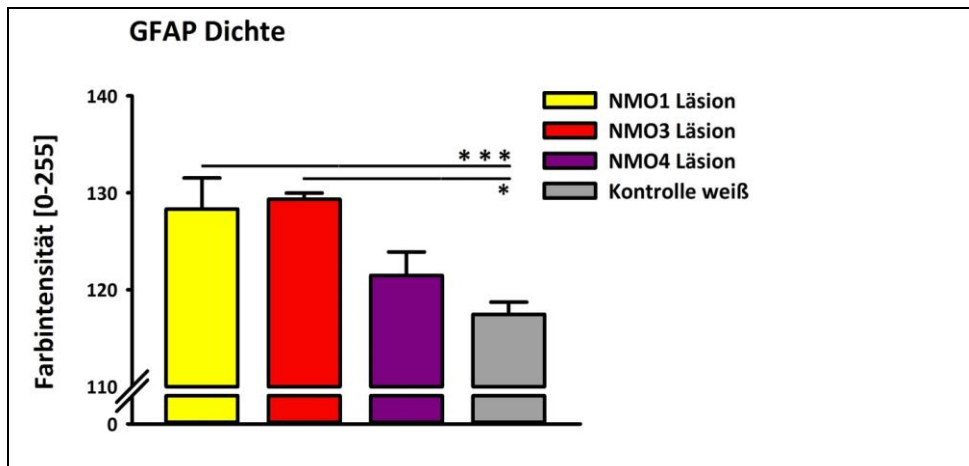


Abbildung 31: Vergleich Dichte GFAP Läsionen versus weiße Substanz Kontrolle

Einschränkend muss gesagt werden, dass bei der GFAP Färbung die Farbdichte ein relativ ungenaues Maß zur Beurteilung der Astrozyten ist. Deswegen erfolgte hier auch eine quantitative Auswertung der Anzahl und der Fläche der Astrozyten.

#### 3.4.3.1.2. Auswertung Astrozytenanzahl

In den NMO-Versuchsgruppen zeigte sich jeweils eine signifikant höhere Astrozytenanzahl im Bereich der Läsionen im Vergleich zur grauen und weißen Substanz. So fanden sich bei NMO 1 durchschnittlich  $57 \pm 6,3$  Astrozyten im Läsionsareal,  $41,8 \pm 4,4$  in der grauen und  $22,1 \pm 3,2$  in der weißen Substanz (Abb. 32A). Bei NMO 3 waren es  $54,5 \pm 7,8$ ,  $34,0 \pm 2,2$  bzw.  $25,4 \pm 2,5$  (Abb.32B). Die Versuchsgruppe NMO 4 erzielte durchschnittliche Werte von  $54,5 \pm 9,2$ ,  $38,9 \pm 2,1$  und  $19,9 \pm 2,9$  (Abb.32C).

In der Kontrollgruppe zeigte sich erwartungsgemäß aufgrund der anatomischen Verteilung auch eine signifikant höhere Anzahl von Astrozyten in der weißen Substanz ( $26,7 \pm 2,3$ ) im Vergleich zu der grauen Substanz ( $15,5 \pm 1,7$ ) (Abb. 32D).

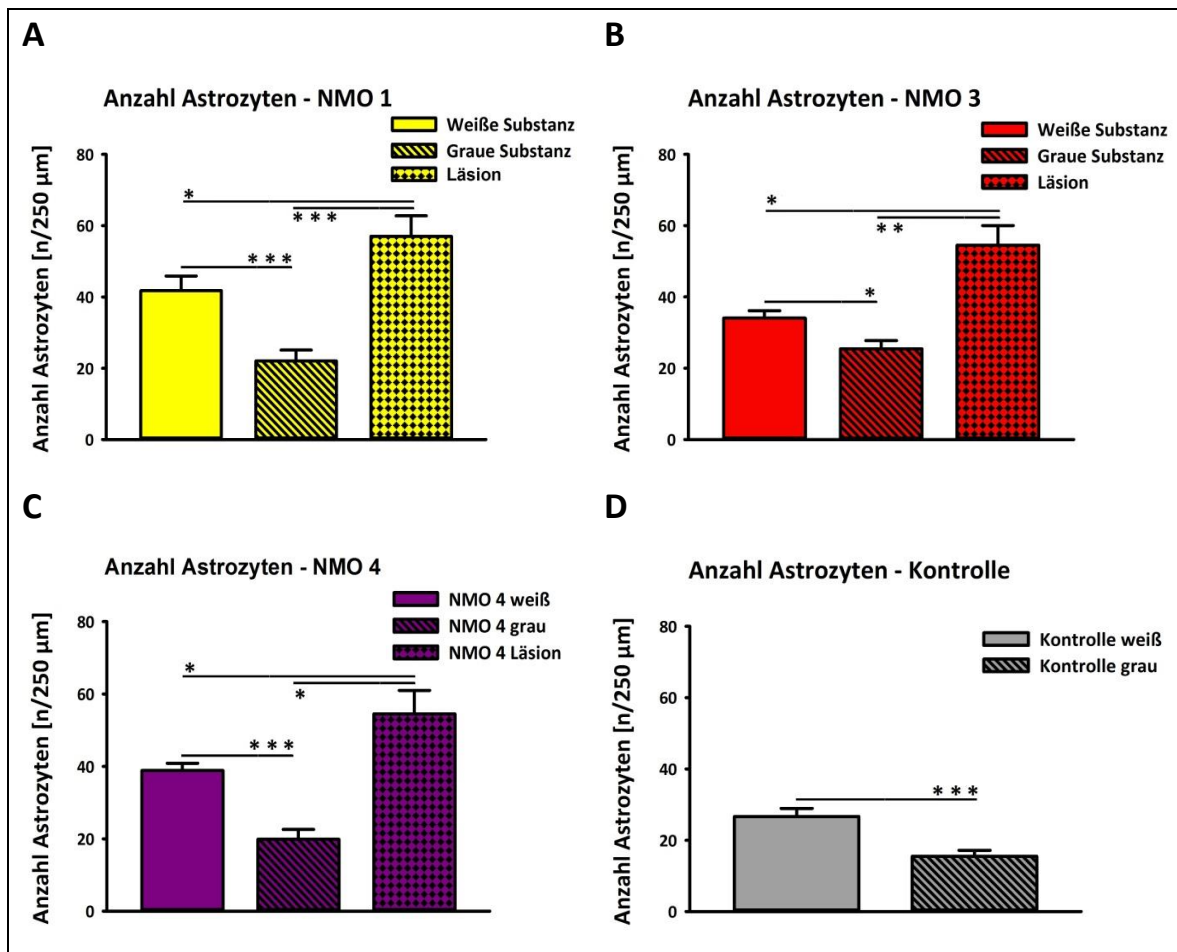


Abbildung 32: Anzahl Astrozyten NMO-IgG und Kontrollgruppe

Im Vergleich der Läsionsareale der verschiedenen Versuchsgruppen mit der weißen Substanz der Kontrollgruppe zeigten sich zunächst ähnliche Astrozytenanzahlen bei NMO 1 ( $57 \pm 6,3$ ), NMO 3 ( $54,5 \pm 7,8$ ) und NMO 4 ( $54,5 \pm 9,2$ ). Diese waren signifikant höher als die Astrozytenanzahl von  $26,7 \pm 2,3$  in der Kontrollgruppe (Abb. 33).

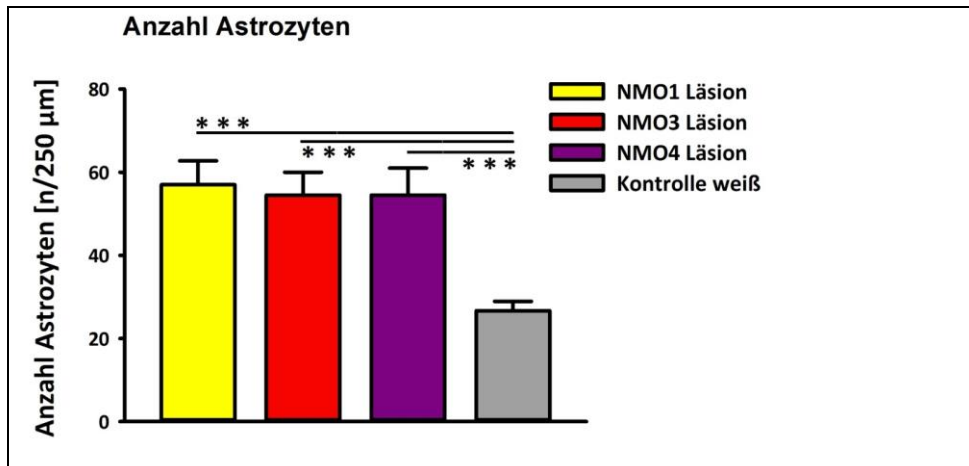


Abbildung 33: Vergleich Anzahl Astrozyten NMO-IgG versus weiße Substanz Kontrollgruppe

#### 3.4.3.1.3. Auswertung der Astrozytenfläche

In der Versuchsgruppe NMO 1 zeigte sich eine gefärbte Astrozytenfläche von  $3744,5 \mu\text{m}^2 \pm 590,0 \mu\text{m}^2$  in der weißen und  $1612,3 \mu\text{m}^2 \pm 363,8 \mu\text{m}^2$  in der grauen Substanz. Im Vergleich zur grauen Substanz wurde in den Läsionsarealen mit  $5351,0 \mu\text{m}^2 \pm 887,1 \mu\text{m}^2$  eine signifikant höhere Astrozytenfläche angefärbt (Abb. 34A).

Bei NMO 3 zeigte sich ebenfalls eine signifikant größere Färbefläche der Astrozyten in der weißen Substanz ( $2983,2 \mu\text{m}^2 \pm 465,8 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zu der grauen Substanz ( $1712,1 \mu\text{m}^2 \pm 232,1 \mu\text{m}^2$ ). Die größte Fläche wiesen die Läsionsareale mit  $8752,9 \mu\text{m}^2 \pm 3710,7 \mu\text{m}^2$  auf (Abb. 34B). NMO 4 zeigte wie die vorangegangenen Versuchsgruppen die größte Astrozytenfläche in den Läsionsarealen ( $5103,1 \mu\text{m}^2 \pm 1696,5 \mu\text{m}^2$ ) gefolgt von der weißen Substanz ( $3627,4 \mu\text{m}^2 \pm 329,8 \mu\text{m}^2$ ) und der grauen Substanz ( $1261,9 \mu\text{m}^2 \pm 258,0 \mu\text{m}^2$ ) (Abb. 34C). In der Kontrollgruppe zeigte sich erwartungsgemäß ebenfalls eine größere Fläche an gefärbten Astrozyten in der weißen Substanz ( $1944,8 \mu\text{m}^2 \pm 225,3 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zu der grauen Substanz ( $904,9 \mu\text{m}^2 \pm 126,1 \mu\text{m}^2$ ) (Abb. 34D).



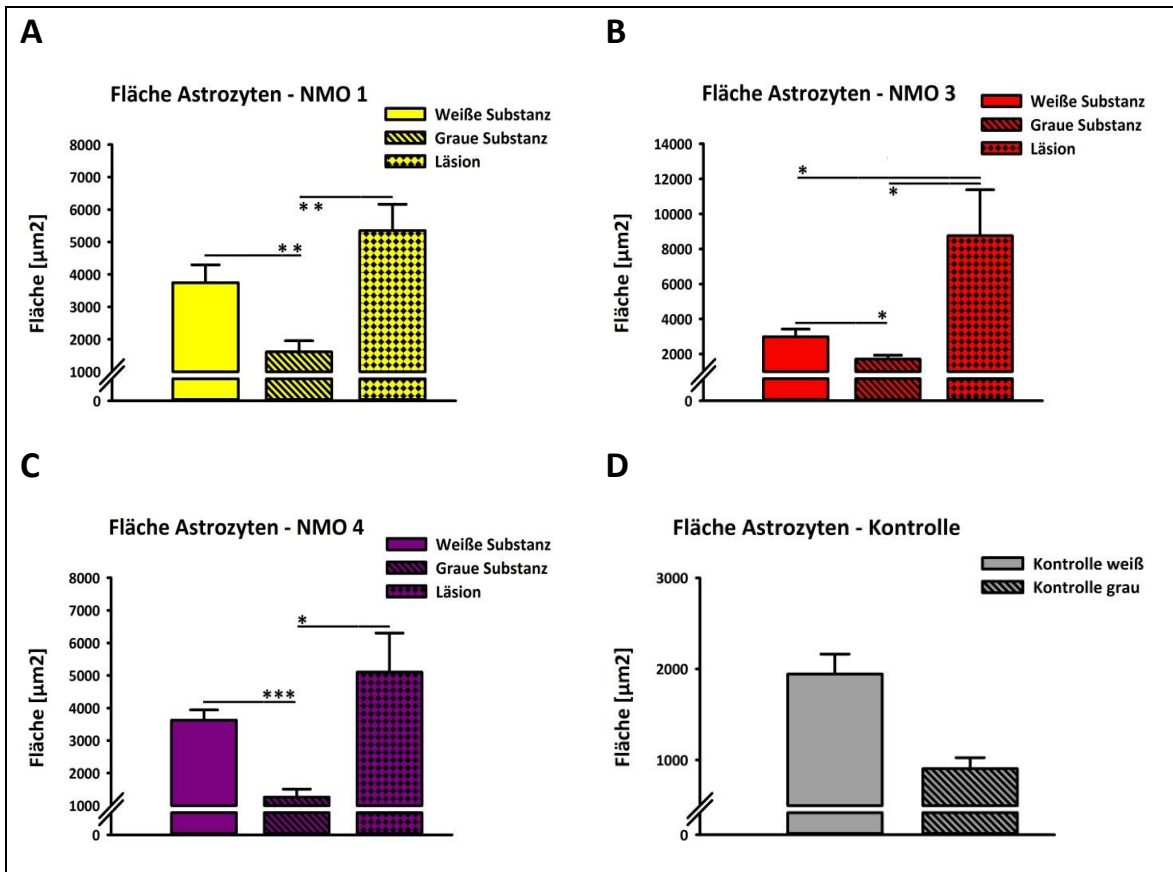


Abbildung 34: Fläche Astrozyten NMO-IgG und Kontrollgruppe

Im Vergleich der Läsionen der NMO-Gruppen zur weißen Substanz der Kontrollgruppe zeigte sich jeweils eine signifikant größere Fläche gefärbter Astrozyten (Abb. 35).

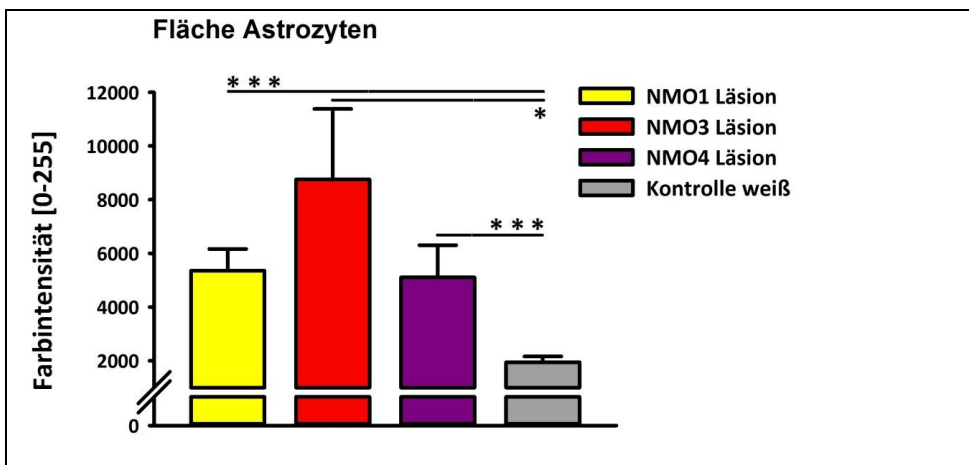


Abbildung 35: Vergleich Fläche Astrozyten NMO-IgG versus weiße Substanz Kontrollgruppe

### 3.4.3.2. rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

#### 3.4.3.2.1. Auswertung Dichte GFAP

In der Gruppe rAB<sup>AQP4</sup> zeigte sich eine etwas höhere Dichte der GFAP-Färbung im Bereich der weißen Substanz mit  $120,3 \pm 2,9$  im Vergleich zur grauen Substanz mit  $117,7 \pm 2,9$ . Bei rAB<sup>Kontrolle</sup> hingegen ist die graue Substanz mit  $119,3 \pm 1,4$  intensiver gefärbt als die weiße mit  $115,5 \pm 2,2$  (Abb. 36), jeweils ohne signifikante Unterschiede.

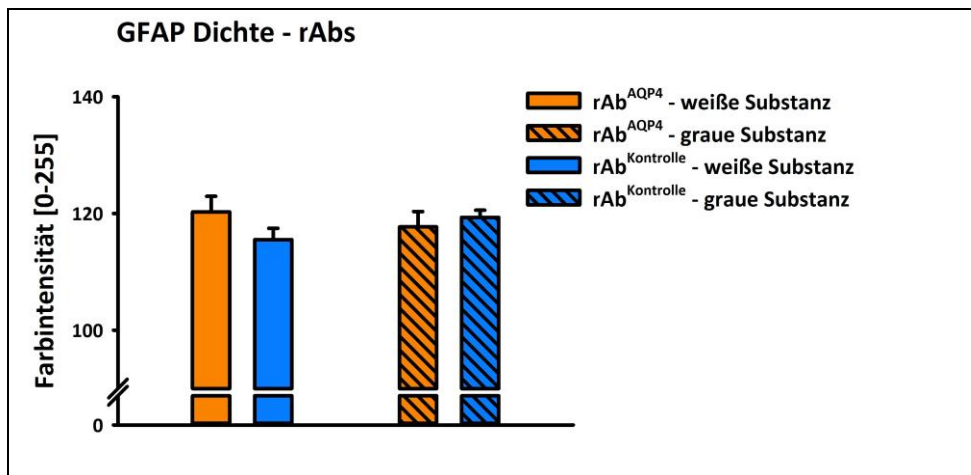


Abbildung 36: Dichte GFAP rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

#### 3.4.3.2.2. Auswertung Astrozytenanzahl

Die Anzahl der Astrozyten sowohl bei rAB<sup>AQP4</sup> also auch bei rAB<sup>Kontrolle</sup> in der weißen Substanz war mit  $30,7 \pm 2,1$  bzw.  $27,1 \pm 2,4$  höher als in der entsprechenden grauen Substanz mit  $16,1 \pm 1,7$  bzw.  $19,3 \pm 3,3$  (Abb. 37).



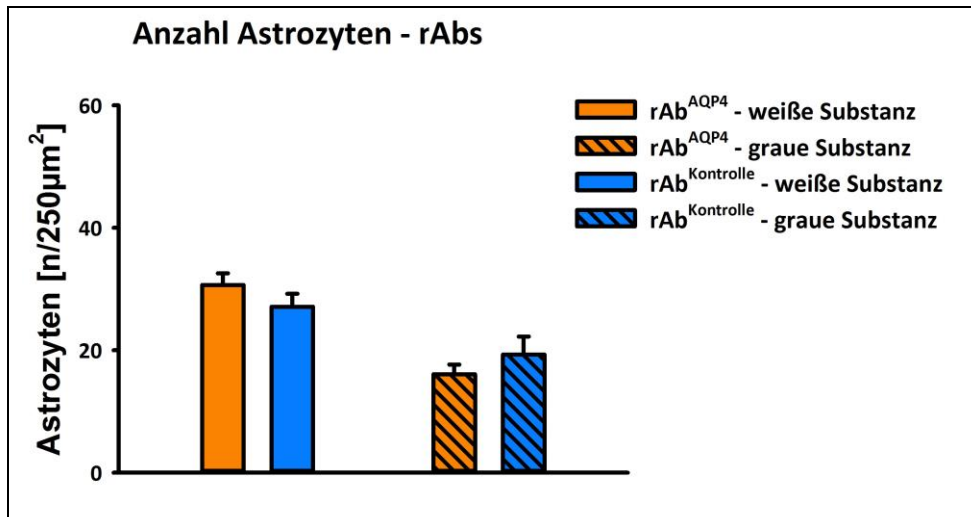


Abbildung 37: Anzahl Astrozyten rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

### 3.4.3.2.3. Auswertung der Astrozytenfläche

In der Versuchsgruppe rAB<sup>AQP4</sup> zeigte sich eine durchschnittlich gefärbte Astrozytenfläche von  $2209,4\mu\text{m}^2 \pm 232,8\mu\text{m}^2$  in der weißen und  $877,4\mu\text{m}^2 \pm 127,0\mu\text{m}^2$  in der grauen Substanz. Die Kontrollgruppe rAB<sup>Kontrolle</sup> erzielte Werte von  $1865,63\mu\text{m}^2 \pm 236,0\mu\text{m}^2$  bzw.  $1248,2\mu\text{m}^2 \pm 260,0\mu\text{m}^2$  (Abb. 38).

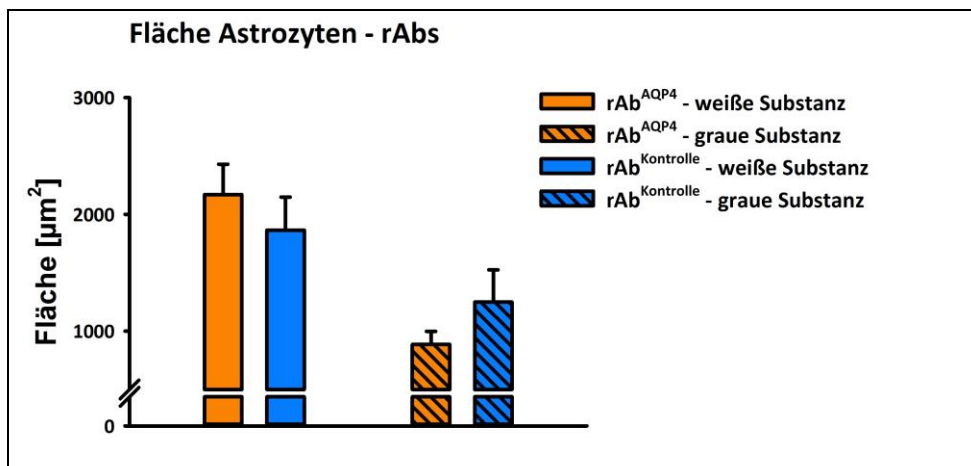
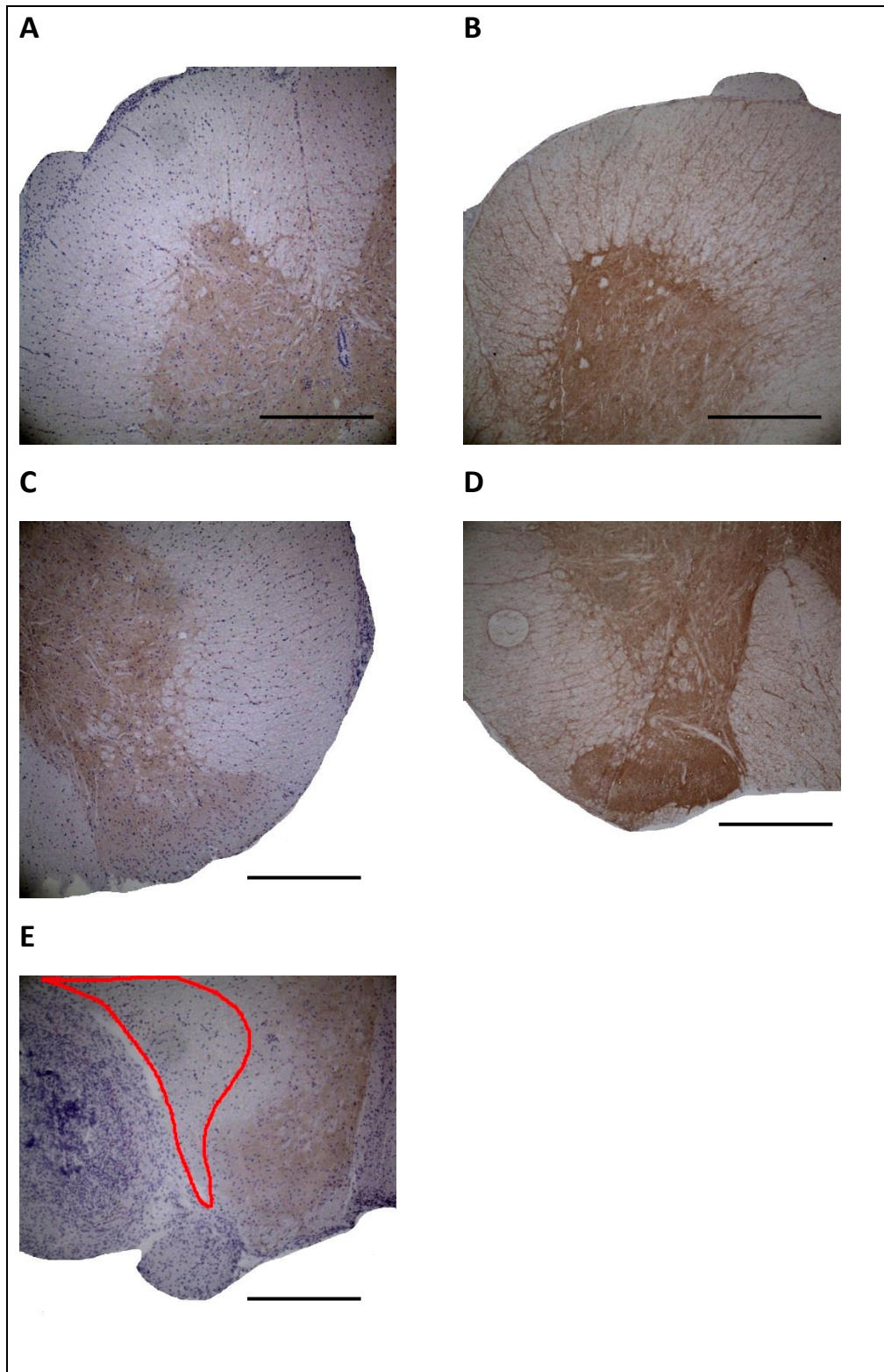


Abbildung 38: Astrozytenflächen rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

### 3.4.4. Auswertung EAAT2-Färbung

Die Gewebeproben der Rückenmäre der Versuchstiere wurden gemäß 2.5.2.1. mit einem EAAT2-AK gefärbt. Die Ergebnisse der Färbintensität der verschiedenen Versuchsgruppen sind im Folgenden dargestellt. Die über die anti-human-IgG-Färbung

definierten Läsionsbereiche wurden neben der weißen und grauen Substanz des Rückenmarks gesondert betrachtet (Abb. 39).



**Abbildung 39: Beispiele EAAT2-DAB-Färbung, Vorderhorn NMO 1 20fach (Maßstab 300 µm) vergrößert (rot) (A), Vorderhorn Kontrolle 20fach (B), Hinterhorn NMO 1 20fach (C), Hinterhorn Kontrolle 20fach (D), Hinterhorn NMO 1 mit Läsion (rot) (E)**

#### **3.4.4.1. NMO-IgG und Kontroll-IgG**

In Versuchsgruppe NMO 1 zeigte sich gemäß der Verteilung von EAAT2 eine höhere Färbeintensität von EAAT2 in der grauen Substanz mit  $127,8 \pm 1,7$  gegenüber der weißen Substanz mit  $121,4 \pm 2,2$ . Die Läsionsareale wiesen dagegen eine reduzierte Färbeintensität von  $112,2 \pm 4,0$  auf (Abb.40A).

Versuchsgruppe NMO 3 zeigte mit  $124,9 \pm 1,3$  ebenfalls eine höhere Farbintensität in der grauen Substanz als in der weißen mit  $122,6 \pm 1,3$ . Die Läsionsareale erreichten einen Wert von  $120,9 \pm 6,9$  (Abb. 40B).

Auch die graue Substanz bei NMO 4 war intensiver gefärbt als die weiße. Erstere erreichte einen Wert von  $127,1 \pm 1,3$ , letztere einen Wert von  $120,7 \pm 0,8$ . Die Läsionsareale zeigten hier eine deutlich reduzierte Farbintensität von  $109,6 \pm 3,4$  (Abb. 40C). Die Kontrollgruppe erreichte in der grauen Substanz einen Mittelwert der Färbeintensität von  $128,1 \pm 2,4$  und in der weißen Substanz einen Wert von  $121,7 \pm 2,1$  (Abb. 40D)

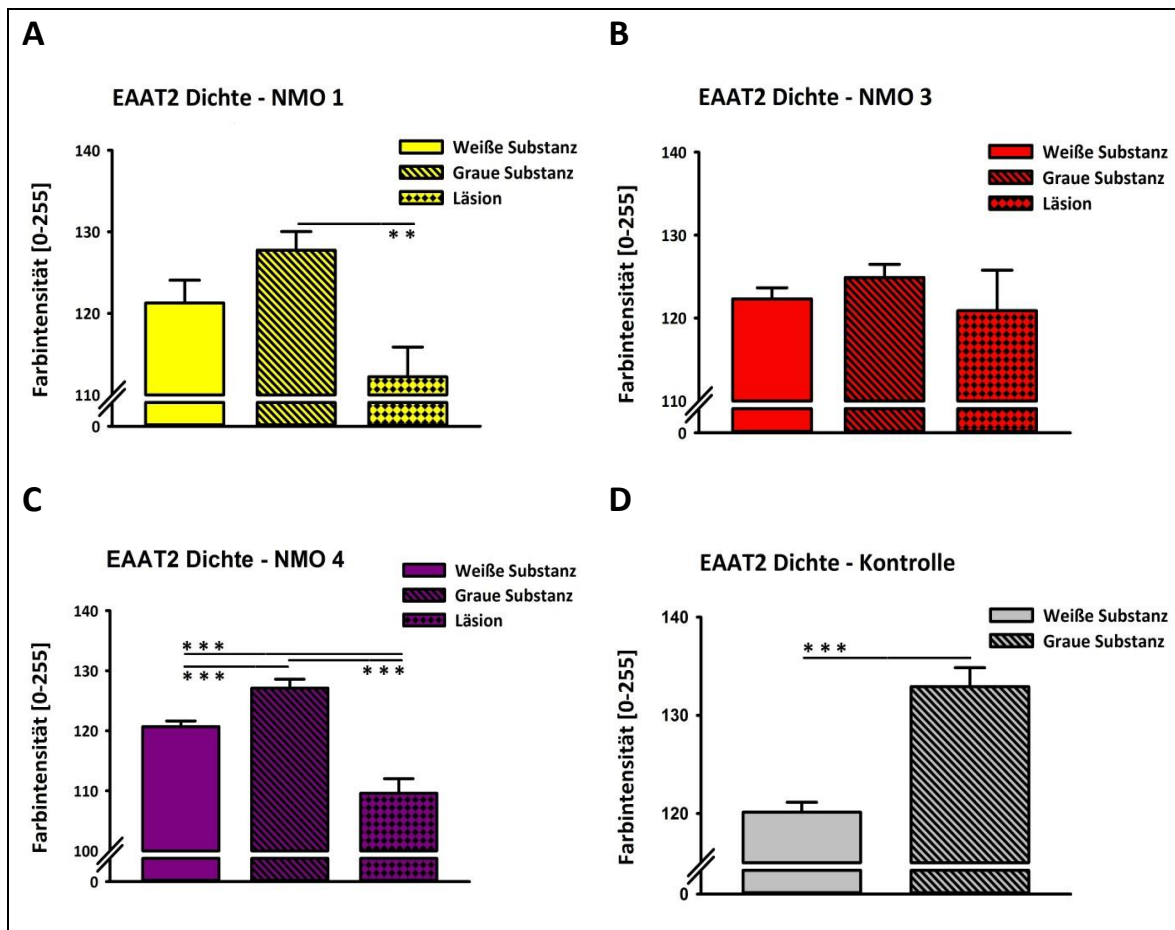


Abbildung 40: Dichte EAAT2 NMO-IgG und Kontrollgruppe

Im Vergleich der Läsionsareale der NMO Gruppen mit der weißen Substanz der Kontrollgruppe zeigten sich bei NMO 1 und NMO4 signifikante Unterschiede. Die niedrigste Farbintensitäten fanden sich bei NMO 4 ( $109,6 \pm 3,4$ ) und NMO 1 ( $112,2 \pm 4,0$ ). NMO 3 erzielte einen Wert von  $120,9 \pm 6,9$  und lag knapp unterhalb der Kontrollgruppe, die eine durchschnittliche Farbintensität von  $121,7 \pm 2,1$  in der weißen Substanz aufwies (Abb. 41).

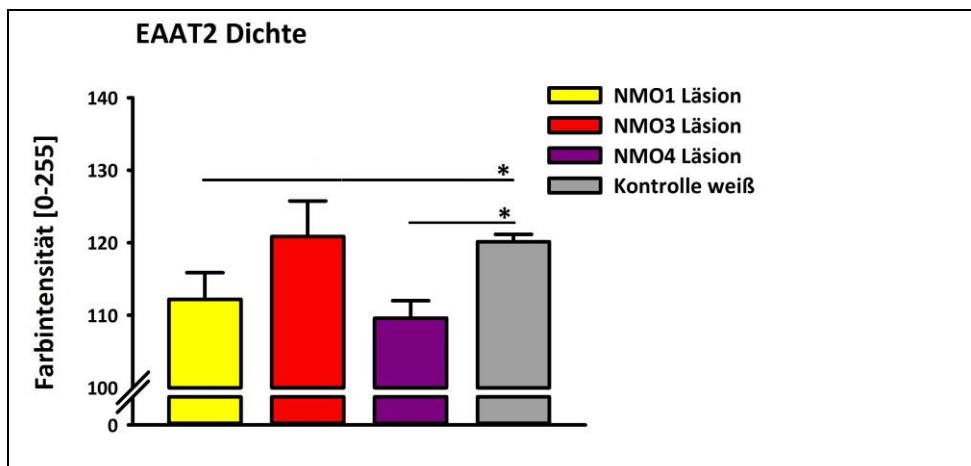


Abbildung 41: Dichte EAAT2 Läsion NMO versus weiße Substanz Kontrollgruppe

### 3.3.4.2. rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

Im Vergleich der weißen Substanzen zeigte sich bei rAB<sup>AQP4</sup> ( $122,2 \pm 0,9$ ) eine nahezu identische Färbintensität von EAAT2 wie bei rAB<sup>Kontrolle</sup> ( $122,9 \pm 0,9$ ). Die graue Substanz war bei rAB<sup>AQP4</sup> mit  $127,9 \pm 1,4$  ebenfalls ähnlich gefärbt wie bei rAB<sup>Kontrolle</sup> mit  $127,3 \pm 0,7$  (Abb. 42).

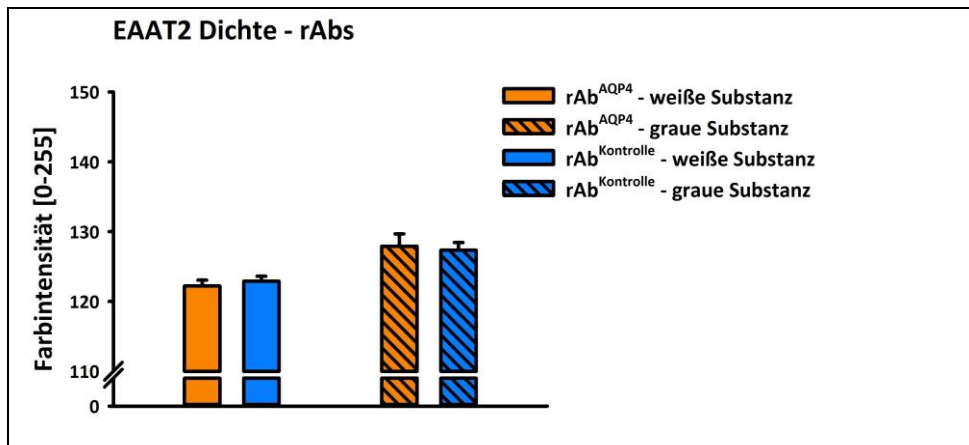


Abbildung 42: Dichte EAAT2 rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>

### 3.4.5. Auswertung Komplement-Färbung

Es wurden exemplarisch Gewebeproben der Rückenmäcker der Versuchsgruppe NMO 1,3 und 4 gemäß 2.5.2.1. mit einem C9neo-AK gefärbt. Es zeigte sich lediglich eine leichtgradige, vorwiegend perivaskuläre Bindung des Komplement-AKs. Großflächige Areale mit aktiviertem Komplement oder neuronal gebundenes Komplement fanden sich nicht. Weiterhin zeigten sich keine Areale mit offensichtlicher Zellnekrose oder intraspinaler Anreicherung von Entzündungszellen.

## 4. Diskussion

Der Effekt von NMO-IgG und rekombinanten AK gegen AQP4 wurde in verschiedenen in-vitro und in-vivo Versuchsmodellen untersucht. In-vitro konnte in AQP4-transfizierten HEK293-Zellen und in kortikalen Maus-Astrozyten-Kulturen eine spezifische Bindung von NMO-IgG an AQP4 nachgewiesen werden (Hinson et al. 2007; Saadoun et al. 2010; Ratelade et al. 2011). Bei zusätzlicher Gabe von aktivem Komplement bewirkte sowohl NMO-IgG als auch rekombinante AK gegen AQP4 als IgG1-Subtyp einen Zelluntergang. Auch in akut präparierten Rückenmarks-Schnittkulturen zeigte sich die zelldestruierende Wirkung von NMO-IgG zusammen mit aktivem Komplement (Zhang et al. 2011). In systemischen passiv-Transfer-Modellen bei gleichzeitiger artifizieller Öffnung der Blut-Hirn-Schranke konnten NMO-typische histopathologische Läsionen mit Verlust von AQP4, Anreicherung von Komplement und Einwanderung von Entzündungszellen nachgewiesen werden. Die intraperitoneale Injektion der Immunglobuline führte zu einer recht unspezifischen Exazerbation der Krankheitszeichen einer gleichzeitig induzierten EAE (Bennett et al. 2009; Bradl et al. 2009). Die pathologische Rolle von NMO-IgG konnte im Mausmodell mittels direkter intrazerebraler Co-Injektion mit humanen Komplementfaktoren weiter verifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass anti-AQP4-Ak auch ohne vorbestehende Entzündung des ZNS Läsionen mit Astrozytenverlust und Reduktion von AQP4 induzierten (Saadoun et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnten weitere offene Fragen zum in-vivo-Effekt der AK gegen AQP4 untersucht werden. Mit Hilfe eines intrathekalen passiv-Transfer Rattenmodells konnte auf eine begleitende generalisierte ZNS-Entzündung zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke verzichtet werden. Dieses Modell bietet im Gegensatz zu dem Tiermodell mit intrazerebraler Injektion zum einen die Möglichkeit, repetitive Applikationen durchzuführen und das Verhalten der Versuchstiere über einen längeren Zeitraum zu beobachten, zum anderen wird auch das bei der humanen Erkrankung v.a. betroffene Rückenmark untersucht und nicht das Gehirn, was bei der NMO eher gering betroffen ist. Es wurden aufgereinigte IgG-Fractionen von Plasmapheresematerial anti-AQP4-AK positiver Patientenserum und zur weiteren Spezifizierung der pathologischen

Effekte rekombinante AK gegen AQP4 untersucht. Ausgewertet wurden sowohl das Verhalten der Versuchstiere, als auch histopathologische Veränderungen spezifischer astrozytärer Markersubstanzen. Zusätzlich wurden in Untergruppen MR-tomographische Untersuchungen des Rückenmarks und in-vivo elektrophysiologische Messungen durchgeführt.

#### *4.1. Beurteilung der Verhaltenstestung*

Zur Beurteilung des Verhaltens der Versuchstiere wurden vorwiegend motorische Auffälligkeiten mit Hilfe des NMO-Punktescores bewertet. Ergänzt wurde diese Untersuchung durch die wöchentliche Testung der Laufleistung, die in Relation zur Ausgangsleistung gesetzt wurde.

Aufgereinigtes NMO-IgG von Patienten führte in den Experimenten zu einer signifikanten klinischen Verschlechterung der NMO-Versuchstiere im Gegensatz zu der Kontrollgruppe. So zeigte sich initial vorwiegend ein breitbeiniges, ataktisches Gangbild, mit später progredienten, unterschiedlich ausgeprägten Paresen v.a. der Hinterbeine. Bei einzelnen Versuchstieren konnten ausgeprägte Paresen der hinteren Extremität bis hin zu einer Paraplegie beobachtet werden. Entsprechend dieser klinischen Beobachtungen wiesen die Versuchsgruppen mit NMO-IgG im Vergleich zu den Gruppen mit Kontroll-IgG einen durchschnittlich deutlich erhöhten Punktwert im NMO-Score auf. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die quantitative Erfassung der Laufleistung der Versuchstiere im RotaRod-Test. So fiel die relative Laufleistung der NMO-Tiere bis auf ein Viertel der Ausgangsleistung ab, während sich bei der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert zeigte.

Zur Überprüfung der Spezifität von NMO-IgG wurden monoklonale AK gegen AQP4 (rAB<sup>AQP4</sup>) eingesetzt (Bennett et al. 2009; Skorstad et al. 2009). Diese führten im passiv-Transfer-Modell ebenfalls zu einer klinischen Verschlechterung der Versuchstiere im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe.

Insgesamt zeigte sich im Vergleich zu monoklonalen AK gegen AQP4 ein größerer Effekt von NMO-IgG aus den aufgereinigten Patientenproben auf das klinische Erscheinungsbild der Versuchstiere. Aufgrund der spezifischen Affinität der monoklonalen AK war eigentlich von einer höheren spezifischen Wirksamkeit auszugehen. Die stärker ausgeprägten Effekte durch NMO-IgG sind allerdings durch mehrere Gründe gut erklärt. So wurden die monoklonalen AK in einer 100fach geringeren Konzentration eingesetzt. Außerdem wurde im Fall der monoklonalen AK eine andere Applikationsart, nämlich die langsam kontinuierliche Infusion mit osmotischen Pumpen anstelle der repetitiven Injektion von IgG gewählt, die zu einem jeweils kurzzeitigen sehr hohen Konzentrationsgradienten an der Katheterspitze führt. Mögliche Reizeffekte durch eine manuelle Injektion in den NMO-IgG Gruppen sind allerdings eher als nachrangig zu betrachten, da sich im Vergleich der Kontrollgruppen (Kontroll-IgG und rAB<sup>Kontrolle</sup>) nur ein geringfügiger Unterschied im NMO-Score zeigte. Auch die relative Laufzeit dieser beiden Gruppen war auf einem vergleichbaren Niveau.

Bisher wurde eine pathologische Rolle von NMO-IgG im EAE-Tiermodell nachgewiesen (Bradl et al. 2009). Hierbei führte die systemische Applikation von NMO-IgG nach EAE-Induktion zu einer vorzeitigen Gewichtsabnahme und zu einem höheren Punktwert im EAE-Score der Versuchstiere. Eine weitere Arbeit untersuchte den Effekt einer intracerebralen Co-Injektion von NMO-IgG und Komplement im Tiermodell. Die rechtshemisphärische Injektion führte in der Verhaltenstestung zu einer häufigeren Wahl des rechten Weges im Y-Lauftest als Zeichen für eine induzierte Inflammation durch NMO-IgG und Komplement im Injektionsbereich (Saadoun et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit ist es nun gelungen den pathologischen Effekt von NMO-IgG auf das klinische Erscheinungsbild der Versuchstiere in einem chronischen Krankheitsmodell zu verifizieren. Die Applikation von NMO-IgG führte somit nicht nur in einem generalisierten Entzündungsmodell kurzfristig zu einer Exazerbation sondern wie auch in einem chronischen Tiermodell ohne EAE zum Auftreten von Symptomen.



#### *4.2. Beurteilung der elektrophysiologischen Untersuchungen und MR-tomographischen Bildgebung*

Die elektrophysiologischen Untersuchungen dienten zur Überprüfung der sensiblen und motorischen Leitungsbahnen im Rückenmark der Versuchstiere. In der vorliegenden Arbeit konnten in zwei Versuchsgruppen nach intrathekaler Applikation von NMO IgG elektrophysiologische Veränderungen im Rückenmark nachgewiesen werden. Während sich die Latenz der evozierten Potentiale nicht veränderte, zeigte sich ein deutlicher Abfall der Amplituden der somatosensibel evozierten Potentiale. Diese Befunde deuten eher auf einen axonalen Prozess hin, weniger auf eine im Vordergrund stehende Demyelinisierung. Die beobachtete Amplitudenreduktion kann entweder durch einen destruktiven Prozess bedingt sein oder durch eine funktioneller Übertragungsstörung. Diese Ergebnisse sind auch in guter Übereinstimmung mit der Literatur über elektrophysiologische Veränderungen bei Patienten mit NMO. So werden bei der NMO im Vergleich zur MS weniger Latenzverzögerungen als vielmehr reduzierte Amplituden nachgewiesen (Watanabe et al. 2009).

Die elektrophysiologischen Ergebnisse wurden durch die exemplarisch durchgeführte Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie bestätigt. Hier zeigte sich eine vorwiegend zentromedulläre Kontrastmittelanreicherung im Rückenmark vorwiegend im Bereich der Katheterspitze. Typisch für die NMO sind langstreckige, kontrastmittelaufnehmende Läsionen im Rückenmark. In unserem Modell sind die Läsionen auch über mehrere, allerdings maximal über drei Wirbelkörpersegmente ausgedehnt. Dies ist durch das Tiermodell mit intrathekaler Applikation erklärbar, da es hierbei zu einer deutlichen Konzentrationsspitze des IgG Gradienten im Bereich der Auslassstelle der Katheteröffnung kommt und dadurch IgG-induzierte Effekte an dieser Stelle besonders ausgeprägt sind. Außerdem ist davon auszugehen, dass es im Bereich der Katheteröffnung auch mechanisch zu einer Störung der Liquor-Gewebeschanke kommt, so dass der Eintritt von IgG ins Parenchym hier besonders ausgeprägt ist.

#### *4.3. Beurteilung der histologischen Ergebnisse*

Mehrere humanpathologische Studien haben beschrieben, dass NMO-typische Läsionen gefäßassoziierte Ablagerungen von Immunglobulinen mit aktiviertem Komplement zeigen (Misu et al. 2007; Roemer et al. 2007). Zusätzlich zeigt sich hier ein Verlust von AQP4 und des Astrozytenmarkers GFAP. Neben diesen sicherlich dominierenden komplementinduzierten Läsionen im Myelon, die auch das Ausmaß der klinischen Ausfälle bestimmen, wurde kürzlich in einer humanpathologischen Studie in kortikalen Gewebeschnitten von NMO-Patienten ein komplementunabhängiger Verlust von AQP4 ohne Astrozytendegeneration nachgewiesen (Saji et al. 2013). Somit gibt es auch bei der humanen Erkrankung erstmals Hinweise, dass es neben dem dominierenden komplementinduzierten Verlust von Astrozyten zusätzlich auch durch komplementunabhängige AK-bedingte Mechanismen zu einer verminderten Expression von AQP4 kommen könnte.

Der komplementinduzierte AQP-4-Verlust durch Depletion von Astrozyten wird auch in Zellkulturmodellen, in Rückenmarksschnittkulturen und nach intrazerebraler Injektion bei Mäusen beschrieben (Saadoun et al. 2010). Neben der humoralen Reaktion in entzündlichen NMO-Läsionen zeigen sich auch Ansammlungen von Granulozyten und Makrophagen und ausgeprägte kavitäre Destruktionen (Lucchinetti et al. 2002). Des Weiteren werden bei Autopsiestudien von NMO Patienten aber auch Bereiche beschrieben, die keine Komplementaktivierung und keinen Astrozytenverlust aufweisen, die allerdings mit Verlust an AQP4-Expression einhergehen (Roemer et al. 2007; Saji et al. 2013). In weiteren Studien wird auch eine verminderte Expression des Glutamattransporters EAAT2 in NMO Läsionen erwähnt (Hinson et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden Rückmarksschnitte der Versuchstiere systematisch histopathologisch aufgearbeitet und bezüglich der Expression von AQP4, GFAP, EAAT2 und einer möglichen Komplementaktivierung vor allem in Läsionsbereichen analysiert. Da NMO-typische Läsionsareale theoretisch über das komplette Myelon verteilt sein konnten wurde vor allem das Areal um die Katheterspitze histologisch aufgearbeitet in der Annahme, dass hier aufgrund der höheren NMO-IgG-Konzentration entsprechend

häufiger Läsionen vorliegen könnten. Diese Hypothese wurde exemplarisch durch MRT-Untersuchungen gestützt, die die Gadofluorine-M-Kontrastmittelaufnahme und somit die vermutete Läsion jeweils im Bereich der Katheterspitze zeigte.

#### **4.3.1. Verminderte AQP4-Expression**

Die Ergebnisse der Färbungen gegen humanes IgG zur Darstellung der intrathekal injizierten IgG Fraktionen (NMO-IgG und monoklonalen anti-AQP4-AK) stimmte mit dem in der Literatur beschriebenen Verteilungsmuster von AQP4 im Myelon überein. Pia mater und gefäßnahe Areale wiesen eine hohe Farbintensität auf, die graue Substanz wurde insgesamt stärker angefärbt als die weiße und Neurone wurden nicht angefärbt (Jung et al. 1994; Nielsen et al. 1997). Läsionsareale in der weißen Substanz des Rückenmarks zeigten sich als umschriebene Areale erhöhter Anti-human-IgG-Bindungsdichte. Insgesamt wurde in 10 von 28 mit NMO-IgG behandelten Versuchstieren eine deutlich umschriebene Läsion im Bereich der Katheterspitze nachgewiesen. In der Kontrollgruppe zeigten sich keine Läsionen. Bei den mit osmotischer Pumpe kontinuierlich mit monoklonalen AK behandelten Versuchstieren konnten keine umschriebenen Läsionsareale nachgewiesen werden. Dies ist am ehesten auf die niedrigere Konzentration der injizierten IgG Fraktionen und auf die unterschiedliche Injektionstechnik zurückzuführen.

Die Anti-human-IgG-Darstellung wurde mit AQP4-Färbungen korreliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Bindung von NMO-IgG mit einer verminderten Expression von AQP4 einhergeht. In autopsierten Nervengewebe von NMO-Patienten wurde ein Verlust von AQP4 beschrieben (Lucchinetti et al. 2002). Auch in-vivo konnte im systemischen passiv-Transfer Modell mit EAE und nach intrazerebraler Injektion von AK gegen AQP4 zusammen mit Komplement eine verminderte Expression von AQP4 gezeigt werden (Bennett et al. 2009; Bradl et al. 2009). Die Reduktion von AQP4 in diesen Fällen ist allerdings durch eine komplement-induzierte Lyse der Astrozyten bedingt. In AQP4 exprimierenden HEK-Zellen und in Astrozytenkulturen wurde nach Bindung von NMO-IgG an AQP4 eine verringerte Expression des Kanals nachgewiesen (Hinson et al. 2007; Hinson et al. 2008). Eine

kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte eine signifikant verminderte AQP4-Expression in autopsierten, kortikalen Gewebeschnitten von NMO-Patienten nach, wobei diese Reduktion von AQP4 interessanterweise nicht durch eine Astrozytendepletion bedingt war (Saji et al. 2013).

Hier konnten wir allerdings erstmals zeigen, dass es auch in einem chronischen Tiermodell mit rein intrathekaler Applikation der pathogenen AK gegen AQP4 komplement-unabhängig zu einer signifikanten Verminderung der Expression von AQP4 kommt. Dieses Färbemuster erscheint ähnlich zu dem, was jetzt bei NMO Patienten im Kortex beschrieben wurde (Saji et al. 2013).

#### **4.3.2. Verminderte EAAT2-Expression**

Die Rolle des Glutamattransporters EAAT2 bei der NMO wird in der Literatur kontrovers diskutiert. AQP4-AK waren in-vitro in der Lage sowohl die Expression von AQP4 also auch membrangebundene Anteile von EAAT2 in Astrozyten und transfizierten Zellen herabzuregulieren (Hinson et al. 2008; Marignier et al. 2010). Daraufhin wurde eine Kopplung von AQP4 und EAAT2 in Form eines Membrankomplexes postuliert.

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte jedoch keinen Hinweis auf eine relevante Internalisierung von EAAT2 nach Bindung von NMO-IgG an Astrozyten (Ratelade et al. 2011). Es wurde vermutet, dass der Verlust von EAAT2 in den Tiermodellen und bei humanen NMO-Läsionen darin begründet liegt, dass es zu einer Komplement-vermittelten Lyse der Astrozyten und somit zu einem verminderten Nachweis der astrozytären Proteine AQP4 und EAAT2 kommt.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich im Vergleich der grauen und weißen Substanz in Rückenmarksschnitten ohne Nachweis von Ablagerungen von humanem IgG der NMO-IgG- und Kontrollgruppe keine Unterschiede in der Expressionsdichte von EAAT2 zwischen den Versuchsgruppen. Allerdings zeigten sich im Bereich der Läsionsareale mit Anreicherung von humanem IgG deutlich niedrigere Farbintensitäten gegenüber

entsprechenden Arealen der weißen Substanz der Kontrollgruppe. Dieses überraschend deutliche Ergebnis zeigt einen direkten Effekt der intrathekal applizierten AK gegen AQP4 auf die Expression von EAAT2. Es ist in diesem Zusammenhang wichtig zu betonen, dass dieser Effekt unabhängig von der Komplementaktivierung und Depletion der Astrozyten zu sein scheint. Der Mechanismus ist bislang nicht geklärt, eine Hypothese ist die Internalisierung von AQP4 mit EAAT2 von der Membran der Astrozyten (Hinson et al. 2008), allerdings kann diese Hypothese mit den vorliegenden Daten weder weiter erhärtet noch verworfen werden. Dies könnte in der Folge zu einer verminderten astrozytären Wiederaufnahme von Glutamat führen und damit zu einer begleitenden Exzitotoxizität (Hinson et al. 2008).

#### **4.3.3. Kein Astrozytenverlust durch NMO-IgG Bindung**

Um die oben dargelegte Hypothese zu prüfen, ob die Reduktion der AQP4 und EAAT2 Immunreaktivität lediglich durch eine Depletion der Astrozyten bedingt ist, wurden die Astrozyten in den Rückenmarksschnitten mit Hilfe einer Färbung von GFAP dargestellt. Im Fokus der Auswertung standen hierbei sowohl die Färbeintensität, die Anzahl gefärbter Astrozyten sowie deren Dichte in einem definierten Messareal. Gemäß der histologisch-anatomisch Verteilung der Astrozyten im Rückenmark wurde die weiße Substanz intensiver gefärbt als die graue Substanz. Die detaillierten quantitativen Auswertungen der GFAP-Färbungen ergaben interessanterweise keinen Verlust an Astrozyten. Überraschenderweise kam es in den Gruppen mit intrathekaler NMO-IgG Applikation in den Läsionsbereichen (positive Anfärbung mit humanem IgG) sogar zu einer Vermehrung der GFAP Immunreaktivität. Sowohl die Anzahl an Astrozyten als auch die relativ gefärbte Fläche waren signifikant höher in den Läsionen der NMO-Gruppen als in der entsprechenden weißen Substanz der Kontrollgruppe.

Bei der Analyse der Versuchsgruppen mit monoklonalen AK zeigte sich kein Unterschied in der Färbeintensität der Astrozyten zwischen der grauen und weißen Substanz von rAB<sup>AQP4</sup> und rAB<sup>Kontrolle</sup>. Die Auszählung der Astrozyten ergab jedoch einen signifikant höheren Wert in der weißen Substanz von rAB<sup>AQP4</sup> als bei rAB<sup>Kontrolle</sup>.

So zeigt sich auch bei den monoklonalen AQP4-AKn kein Astrozytenverlust sondern sogar eine Erhöhung der Anzahl an Astrozyten.

Somit kommt es hier wie auch in einem anderen Modell mit systemischen passiv-Transfer von NMO-IgG nach artifizieller Blut-Hirnschrankenöffnung (Chan et al. 2012) und im Tiermodell nach einmaliger intrazerebraler Injektion (Saadoun et al. 2010) ohne zusätzliche Komplementgabe nicht zu einer Depletion der Astrozyten. In kortikalen Gewebeschnitten von NMO-Patienten zeigte sich im Bereich verminderter AQP4-Expression eine ansteigende Astrozytenanzahl im Sinne einer erhöhten GFAP-Färbeintensität (Saji et al. 2013). Eine Komplementaktivierung wurde hierbei ebenso nicht beobachtet. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da die oben beschriebenen Effekte auf die Expression von AQP4 und EAAT2 somit nicht durch eine einfache Depletion der Astrozyten bedingt sind, sondern für eine spezifische, intrinsische pathogene Wirkung der AK gegen AQP4 sprechen. Theoretisch könnten in dem chronischen Tiermodell die beobachteten hypertrophen Astrozyten auch neu gebildet oder regeneriert sein, nachdem es schon in früheren Stadien zu einer Astrozytendepletion gekommen war. In einzelnen Versuchstieren wurde deshalb bereits eine Gewebeentnahme zu früheren Zeitpunkten durchgeführt (nach 5 und nach 10 intrathekalen Injektionen von NMO-IgG), bei denen sich allerdings ebenfalls keine Depletion der Astrozyten finden ließ.

#### **4.3.4. NMO-IgG und Komplementaktivierung**

NMO-IgG zählt zur IgG1 Untergruppe und ist somit fähig, Komplement zu aktivieren. Der hauptsächliche Pathomechanismus, der der NMO zugrunde liegt, ist trotz der oben beschriebenen Befunde sicherlich auch weiterhin die Aktivierung von Komplement und die nachfolgende Destruktion des Gewebes. Dementsprechend ist ein wesentliches Charakteristikum bei humanpathologischen Untersuchungen Komplementablagerungen in den NMO Läsionen (Lucchinetti et al. 2002). In-vitro wurde eine Aktivierung der klassischen Komplementkaskade mit anschließender Lyse der Zielzelle nach Bindung von NMO-IgG beobachtet (Hinson et al. 2007; Sabater et al. 2009). Um Pathomechanismen zu untersuchen, die eventuell durch Aktivierung von Spezies-

eigenen Komplement (Ratte) nach intrathekalen Applikation von NMO-IgG entstehen könnten und die intrinsischen Wirkungen der AK beeinflussen könnten, wurden die Rückenmarksschnitte histologisch auch auf die Aktivierung von Ratten-Komplement überprüft. Hierbei zeigte sich allenfalls eine milde, vorwiegend perivaskuläre Komplementaktivität. Massive Komplementablagerungen und Gewebsdestruktionen wie bei humanen NMO-Läsionen oder in den Tiermodellen mit zusätzlicher Komplement-Applikation fanden sich nicht. Die hier vorliegenden Befunde beschreiben somit prinzipiell eine mögliche intrinsische pathogene Funktion der AK gegen AQP4, wobei bislang nicht geklärt ist, ob diese Mechanismen eine zusätzliche krankheitsrelevante Wirkung bei Patienten mit NMO haben. Erste Hinweise kommen von der Beobachtung, dass NMO Patienten auch kognitive Einschränkungen haben, die den erwähnten, komplement-unabhängigen kortikalen Veränderungen zugeschrieben werden (Saji et al. 2013).

#### *4.4. Schlussfolgerung und Ausblick*

In den Experimenten zeigte sich bei den Versuchstieren, denen wiederholt intrathekal AK gegen AQP4 appliziert wurde, in standardisierten Verhaltenstests ein Abfall der motorischen Fähigkeiten. Elektrophysiologische Untersuchungen deuteten auf axonale Veränderungen oder Übertragungsstörungen durch NMO-IgG hin. Exemplarisch konnte MR-tomographisch eine spinale Kontrastmittelaufnahme verifiziert werden. Histopathologische Untersuchungen zeigten Läsionsbereiche, die durch eine Anreicherung an intrathekal verabreichtem humanem NMO-IgG und durch einen Verlust von AQP4 und EAAT2 gekennzeichnet waren. Eine Depletion von Astrozyten sowie eine relevante Komplementaktivierung mit Gewebedestruktion wurden nicht beobachtet, im Gegenteil, es kam zu einer Hypertrophie und Vermehrung der Astrozyten im Läsionsareal. Zusammengefasst lassen diese Befunde auf pathophysiologisch relevante, intrinsische und komplement-unabhängige Wirkungen von AK gegen AQP4 schließen. Eine Herabregulierung der Oberflächenexpression des Glutamat-Transporters EAAT2 auf Astrozyten mit nachfolgender Exzitotoxizität im Gewebe kann ein Erklärungsansatz sein. Diese Hypothese muss in weiteren Experimenten erhärtet oder widerlegt werden. Hierbei sollte nicht nur die Expression,

sondern auch die Funktion des Transporters untersucht werden. Elektrophysiologische Analysen des EAAT2 Transporterstroms in Astrozyten, z.B. im Schnittpräparat oder in der Zellkultur wären eine Möglichkeit.

Eine Schwäche dieser Arbeit bleibt die unterschiedliche Applikationsart der monoklonalen AQP4-AK. Aufgrund dieser methodischen Beschränkung und aufgrund der stark unterschiedlichen IgG Konzentrationen sind die Ergebnisse mit aufgereinigtem Patienten NMO-IgG und den monoklonalen AK nicht direkt vergleichbar. Weitere Versuchsserien mit repetitiver Applikation der monoklonalen AK werden erfolgen, um diese methodischen Limitationen zu umgehen. Des Weiteren bleibt die Rolle einer Komplementaktivierung in diesem Tiermodell zu untersuchen. Durch die implantierten intrathekalen Katheter können zusätzlich zur IgG Applikation Injektionen von externem humanen Komplement erfolgen.

Interessant ist sicherlich auch die immunhistologische Aufarbeitung der gewonnenen N. optici, da diese neben dem Rückenmark den primären Manifestationsort der NMO darstellen und durch eine hohe AQP4-Expression gekennzeichnet sind.



## 5. Zusammenfassung

Die Neuromyelitis optica (NMO) ist eine schwerwiegende autoimmune Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die mit rezidivierenden Optikusneuritiden und Querschnittsmyelitiden einhergeht. Als serologischer Biomarker wurden Autoantikörper gegen Aquaporin 4 (anti-AQP4-AK) identifiziert. Mit Hilfe eines passiv-Transfer Rattenmodells mit implantierten intrathekalen Kathetern wurden aufgereinigte IgG Fraktionen (NMO-IgG) von Plasmapheresematerial anti-AQP4-AK positiver NMO Patienten verabreicht. Zum Nachweis der Antigen-Spezifität wurden in weiteren Versuchsgruppen rekombinante IgG-AK gegen AQP4 appliziert. Die repetitive Injektion von NMO-IgG oder anti-AQP4-AK führte zu einer signifikanten Erkrankung mit reduzierter motorischer Leistungsfähigkeit der Versuchstiere im Vergleich zu Kontrollen. Mittels Magnetresonanztomographie konnten exemplarisch Kontrastmittel-aufnehmende Läsionsareale im Rückenmark der Versuchstiere im Bereich der Katheterspitze detektiert werden. Histopathologisch zeigte sich in diesen Läsionsbereichen eine Anreicherung von intrathekal applizierten humanen IgG sowie ein Verlust der Expression von AQP4 und des Glutamattransporters EAAT2. Im Gegensatz zu der bisher bekannten Komplement-induzierten Gewebedestruktion bei NMO-Patienten mit entzündlichen Läsionen wurde hier keine Depletion von Astrozyten oder Komplementaktivierung beobachtet. Stattdessen kam es in den hier beschriebenen Arealen mit IgG-Ablagerung zu einer Hypertrophie und Vermehrung der GFAP-positiven Astrozyten. Die Ergebnisse lassen auf eine pathophysiologisch relevante, intrinsische und Komplement -unabhängige Wirkung von anti-AQP4-AK schließen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Allbutt, T. C. (1871). *On the use of the ophthalmoscope in diseases of the nervous system and of the kidneys : also in certain other general disorders.* London ; New York, MacMillan.
- Amiry-Moghaddam, M. and O. P. Ottersen (2003). "The molecular basis of water transport in the brain." *Nat Rev Neurosci* 4(12): 991-1001.
- Bendszus, M., G. Ladewig, L. Jestaedt, B. Misselwitz, L. Solymosi, K. Toyka and G. Stoll (2008). "Gadofluorine M enhancement allows more sensitive detection of inflammatory CNS lesions than T2-w imaging: a quantitative MRI study." *Brain* 131(Pt 9): 2341-2352.
- Bennett, J. L., C. Lam, S. R. Kalluri, P. Saikali, K. Bautista, C. Dupree, M. Glogowska, D. Case, J. P. Antel, G. P. Owens, D. Gilden, S. Nessler, C. Stadelmann and B. Hemmer (2009). "Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica." *Ann Neurol* 66(5): 617-629.
- Boettger, M. K., A. Weishaupt, C. Geis, K. V. Toyka and C. Sommer (2010). "Mild experimental autoimmune encephalitis as a tool to induce blood-brain barrier dysfunction." *J Neural Transm* 117(2): 165-169.
- Bradl, M., T. Misu, T. Takahashi, M. Watanabe, S. Mader, M. Reindl, M. Adzemovic, J. Bauer, T. Berger, K. Fujihara, Y. Itoyama and H. Lassmann (2009). "Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo." *Ann Neurol* 66(5): 630-643.
- Chan, K. H., R. Zhang, J. S. Kwan, V. Y. Guo, P. W. Ho, J. W. Ho and A. C. Chu (2012). "Aquaporin-4 autoantibodies cause asymptomatic aquaporin-4 loss and activate astrocytes in mouse." *J Neuroimmunol* 245(1-2): 32-38.
- Cree, B. A., S. Lamb, K. Morgan, A. Chen, E. Waubant and C. Genain (2005). "An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica." *Neurology* 64(7): 1270-1272.
- Devic, E. (1894). "Myélite subaigue compliquée de névrite optique. ." *Bull Med* 8: 1033.
- Doi, H., T. Matsushita, N. Isobe, T. Matsuoka, M. Minohara, H. Ochi and J. I. Kira (2009). "Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin-4 antibody." *Mult Scler* 15(3): 304-310.
- Geis, C., A. Weishaupt, B. Grunewald, T. Wultsch, A. Reif, M. Gerlach, R. Dirx, M. Solimena, D. Perani, M. Heckmann, K. V. Toyka, F. Folli and C. Sommer (2011). "Human stiff-person syndrome IgG induces anxious behavior in rats." *PLoS One* 6(2): e16775.

- Geis, C., A. Weishaupt, S. Hallermann, B. Grunewald, C. Wessig, T. Wultsch, A. Reif, N. Byts, M. Beck, S. Jablonka, M. K. Boettger, N. Uceyler, W. Fouquet, M. Gerlach, H. M. Meinck, A. L. Siren, S. J. Sigrist, K. V. Toyka, M. Heckmann and C. Sommer (2010). "Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition." *Brain* 133(11): 3166-3180.
- Hinson, S. R., S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, S. F. Roemer, J. P. Fryer, T. J. Kryzer and V. A. Lennon (2007). "Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica." *Neurology* 69(24): 2221-2231.
- Hinson, S. R., S. F. Roemer, C. F. Lucchinetti, J. P. Fryer, T. J. Kryzer, J. L. Chamberlain, C. L. Howe, S. J. Pittock and V. A. Lennon (2008). "Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2." *J Exp Med* 205(11): 2473-2481.
- Holmoy, T., A. B. Fredriksen, K. M. Thompson, A. L. Hestvik, B. Bogen and F. Vartdal (2005). "Cerebrospinal fluid T cell clones from patients with multiple sclerosis: recognition of idiotopes on monoclonal IgG secreted by autologous cerebrospinal fluid B cells." *Eur J Immunol* 35(6): 1786-1794.
- Jung, J. S., R. V. Bhat, G. M. Preston, W. B. Guggino, J. M. Baraban and P. Agre (1994). "Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 13052-13056.
- Keegan, M., A. A. Pineda, R. L. McClelland, C. H. Darby, M. Rodriguez and B. G. Weinshenker (2002). "Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response." *Neurology* 58(1): 143-146.
- Lennon, V. A., T. J. Kryzer, S. J. Pittock, A. S. Verkman and S. R. Hinson (2005). "IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel." *J Exp Med* 202(4): 473-477.
- Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima and B. G. Weinshenker (2004). "A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis." *Lancet* 364(9451): 2106-2112.
- Lucchinetti, C. F., R. N. Mandler, D. McGavern, W. Bruck, G. Gleich, R. M. Ransohoff, C. Trebst, B. Weinshenker, D. Wingerchuk, J. E. Parisi and H. Lassmann (2002). "A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica." *Brain* 125(Pt 7): 1450-1461.
- Marignier, R., A. Nicolle, C. Watrin, M. Touret, S. Cavagna, M. Varrin-Doyer, G. Cavillon, V. Rogemond, C. Confavreux, J. Honnorat and P. Giraudon (2010). "Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury." *Brain* 133(9): 2578-2591.

- McDonald, J. W., J. M. Levine and Y. Qu (1998). "Multiple classes of the oligodendrocyte lineage are highly vulnerable to excitotoxicity." *Neuroreport* 9(12): 2757-2762.
- Misu, T., K. Fujihara, A. Kakita, H. Konno, M. Nakamura, S. Watanabe, T. Takahashi, I. Nakashima, H. Takahashi and Y. Itoyama (2007). "Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis." *Brain* 130(Pt 5): 1224-1234.
- Morgan, B. P. and P. Gasque (1996). "Expression of complement in the brain: role in health and disease." *Immunol Today* 17(10): 461-466.
- Nielsen, S., E. A. Nagelhus, M. Amiry-Moghaddam, C. Bourque, P. Agre and O. P. Ottersen (1997). "Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain." *J Neurosci* 17(1): 171-180.
- Pittock, S. J., V. A. Lennon, K. Krecke, D. M. Wingerchuk, C. F. Lucchinetti and B. G. Weinshenker (2006). "Brain abnormalities in neuromyelitis optica." *Arch Neurol* 63(3): 390-396.
- Ratelade, J., J. L. Bennett and A. S. Verkman (2011). "Evidence against cellular internalization in vivo of NMO-IgG, aquaporin-4, and excitatory amino acid transporter 2 in neuromyelitis optica." *J Biol Chem* 286(52): 45156-45164.
- Roemer, S. F., J. E. Parisi, V. A. Lennon, E. E. Benarroch, H. Lassmann, W. Bruck, R. N. Mandler, B. G. Weinshenker, S. J. Pittock, D. M. Wingerchuk and C. F. Lucchinetti (2007). "Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis." *Brain* 130(Pt 5): 1194-1205.
- Saadoun, S. and M. C. Papadopoulos (2010). "Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema." *Neuroscience* 168(4): 1036-1046.
- Saadoun, S., P. Waters, B. A. Bell, A. Vincent, A. S. Verkman and M. C. Papadopoulos (2010). "Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice." *Brain* 133(Pt 2): 349-361.
- Sabater, L., A. Giralt, A. Boronat, K. Hankiewicz, Y. Blanco, S. Llufrui, J. Alberch, F. Graus and A. Saiz (2009). "Cytotoxic effect of neuromyelitis optica antibody (NMO-IgG) to astrocytes: an in vitro study." *J Neuroimmunol* 215(1-2): 31-35.
- Saji, E., M. Arakawa, K. Yanagawa, Y. Toyoshima, A. Yokoseki, K. Okamoto, M. Otsuki, K. Akazawa, A. Kakita, H. Takahashi, M. Nishizawa and I. Kawachi (2013). "Cognitive impairment and cortical degeneration in neuromyelitis optica." *Ann Neurol* 73(1): 65-76.

- Skorstad, G., B. Vandvik, F. Vartdal and T. Holmoy (2009). "MS and clinically isolated syndromes: shared specificity but diverging clonal patterns of virus-specific IgG antibodies produced in vivo and by CSF B cells in vitro." *Eur J Neurol* 16(10): 1124-1129.
- Sommer, C., A. Weishaupt, J. Brinkhoff, L. Biko, C. Wessig, R. Gold and K. V. Toyka (2005). "Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin." *Lancet* 365(9468): 1406-1411.
- Spiller, O. B., G. Moretto, S. U. Kim, B. P. Morgan and D. V. Devine (1996). "Complement expression on astrocytes and astrocytoma cell lines: failure of complement regulation at the C3 level correlates with very low CD55 expression." *J Neuroimmunol* 71(1-2): 97-106.
- Takahashi, T., K. Fujihara, I. Nakashima, T. Misu, I. Miyazawa, M. Nakamura, S. Watanabe, Y. Shiga, C. Kanaoka, J. Fujimori, S. Sato and Y. Itoyama (2007). "Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre." *Brain* 130(Pt 5): 1235-1243.
- Vincent, T., P. Saikali, R. Cayrol, A. D. Roth, A. Bar-Or, A. Prat and J. P. Antel (2008). "Functional consequences of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment." *J Immunol* 181(8): 5730-5737.
- Watanabe, A., T. Matsushita, H. Doi, T. Matsuoka, H. Shigeto, N. Isobe, Y. Kawano, S. Tobimatsu and J. Kira (2009). "Multimodality-evoked potential study of anti-aquaporin-4 antibody-positive and -negative multiple sclerosis patients." *J Neurol Sci* 281(1-2): 34-40.
- Wingerchuk, D. M., V. A. Lennon, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti and B. G. Weinshenker (2006). "Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica." *Neurology* 66(10): 1485-1489.
- Wingerchuk, D. M. and B. G. Weinshenker (2003). "Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival." *Neurology* 60(5): 848-853.
- Witebsky, E. and N. R. Rose (1963). "Autoimmunity and its relationship to thyroid diseases." *N Y State J Med* 63: 56-59.
- Yang, C., J. L. Jones and S. R. Barnum (1993). "Expression of decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 in the human astrogloma cell line, D54-MG, and primary rat astrocytes." *J Neuroimmunol* 47(2): 123-132.
- Zhang, H., J. L. Bennett and A. S. Verkman (2011). "Ex vivo spinal cord slice model of neuromyelitis optica reveals novel immunopathogenic mechanisms." *Ann Neurol* 70(6): 943-954.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meiner Betreuerin, Frau Professor Dr. med. Claudia Sommer für die interessante Themenstellung und die Betreuung der vorliegenden Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen. Die Unterstützung zu jedem Zeitpunkt des Projektes möchte ich besonders hervorheben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Geis für die intensive Betreuung und die vielen Anregungen im Verlauf des Projektes bedanken. Er unterstützte mich zu jedem Zeitpunkt des Projektes und gab mir stets konstruktive und inspirierende Hilfestellungen.

Bei Frau Lydia Biko und Helga Brünner möchte ich mich herzlich für die Hilfe und die wertvollen Ratschläge beim Umgang mit den Versuchstieren und bei der Gewebeentnahme bedanken. Frau Barbara danke ich für die intensive Unterstützung beim Anfertigen der Rückenmarksschnitte und der immunhistochemischen Färbungen.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Großeltern Erika und Gerald Dahle und meinen Eltern Dagmar und Gunter Ritter, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mir jederzeit unterstützend zur Seite standen.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Christian Ritter  
Adresse: Vogelsangerstr. 120  
50823 Köln  
Alter: 29 Jahre, geb. am 12.11.1983 in Coburg  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

2005 - 2011 Studienrichtung: Humanmedizin (Universität Würzburg)  
2011 Abschluss : 2. Staatsexamen (2,0)  
2004 - 2005 Studienrichtung: Chemie (Universität Würzburg)  
1994 - 2003 Gymnasium Ernestinum Coburg  
2003 Abschluss: Abitur  
1990 - 1994 Pestalozzi Grundschule Coburg

### Zivildienst

2003 – 2004 Klinikum Coburg

### Berufliche Erfahrung

Seit 12/2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Forschungszentrum Jülich  
Seit 06/2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Arzt) an der Neurologischen Universitätsklinik Köln  
08/2010-07/2011 Absolvierung des Praktischen Jahres:  
1.Tertial: Chirurgie (England/Leopoldina Schweinfurt)  
2.Tertial: Innere Medizin (Leopoldina Schweinfurt)  
3.Tertial: Neurologie (Uniklinikum Würzburg)

03/2010	Famulatur Innere Medizin (Moshi/Tansania)
09/2009	Famulatur Orthopädie (Orthopädische Praxis am Rosengarten/Coburg)
09/2009	Famulatur HNO (Uniklinikum Würzburg)
03/2009	Famulatur Neurologie (Uniklinikum Würzburg)
04/2008	Famulatur Anästhesiologie (Uniklinikum Würzburg)

Köln, 2. Mai 2013