

Aus der Anatomischen Anstalt, Lehrstuhl II – Neuroanatomie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Waschke

**Translationale histopathologische Charakterisierung
von Aquaporin 4 im Kontext neuroinflammatorischer
Erkrankungen mittels digitaler Bildanalyse**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Sven Olaf Rohr
aus Heidelberg

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp
PD Dr. med. Rupert Egensperger

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Matthias Brendel
Dr. Sabine Liebscher

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: _____

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2022

Für meine Familie in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Hintergrund	1
1.1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.2	Neuromyelitis optica	4
1.2	Ziele der Arbeit	6
2	METHODEN.....	7
2.1	Murine Präparate	7
2.1.1	Versuchstiere und Haltung	7
2.1.2	Behandlung von Versuchstieren mit Cuprizone (CUP)	7
2.1.3	Induktion experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE)	7
2.1.4	Behandlung von Versuchstieren mit Cuprizone in Kombination mit EAE (CUP-EAE)	9
2.1.5	Gewinnung von Untersuchungsmaterial	9
2.1.6	Paraffineinbettung von Gehirn- und Rückenmarkspräparaten	10
2.1.7	Versuchsgruppen Mausepräparate	11
2.2	Humane Präparate	12
2.3	Histologische und immunhistochemische Färbungen	13
2.3.1	Entparaffinierung und Dehydrierung von Paraffinschnitten	13
2.3.2	HE-Färbung	13
2.3.3	LFB-PAS-Färbung	14
2.3.4	Immunhistochemie (IHC)	15
2.3.5	Immunfluoreszenz-Färbungen (IF)	17
2.3.6	Naphthol AS-D-Esterase Färbung	19
2.4	AQP4 – ELISA	20
2.5	Mikroskopie und Erstellung digitaler histologischer Schnitte	21
2.6	Automatisierte Bildanalyse mittels digitaler Histologie	21
2.6.1	Softwareumgebung	21
2.6.2	Ablauf Programm „Digital Histology Processor“	21
2.6.3	Häufig genutzte Tools	23
2.6.4	Funktion Maxima.Capillary.Count	23
2.6.5	Funktion Area.Density	24
2.6.6	Funktion Focal.Concentric.Density	24
2.7	Statistische Auswertung	26
3	ERGEBNISSE	27
3.1	Verhalten von AQP4 in demyelinisierten Gehirnarealen	27
3.1.1	AQP4 in der grauen Substanz der Maus nach Cuprizone-Behandlung	27
3.1.2	AQP4 in der weißen Substanz der Maus nach Cuprizone-Behandlung	30
3.1.3	AQP4 in der weißen Substanz von humanen MS-Gehirnschnitten	33

3.2	Perivaskuläre Infiltrate in Cup-EAE	35
3.2.1	Auswirkung von Cuprizone auf das Auftreten perivaskulärer Infiltrate	35
3.2.2	Einfluss perivaskulärer Infiltrate auf Astrozyten und AQP4	37
3.3	Vergleichende Untersuchungen zu Aspekten der NMO	43
3.3.1	Anti-AQP4 Antikörper im Blutserums von Versuchstieren.....	43
3.3.2	Neutrophile Granulozyten im Cup-EAE Modell	46
3.4	Grafische Synopsis der Ergebnisse	48
4	DISKUSSION	49
4.1	Diskussion der Ergebnisse	49
4.1.1	Charakterisierung von AQP4 in der Pathogenese der MS	49
4.1.2	Charakterisierung von Cup-EAE-Läsionen im Kontext der MS und der NMO	54
4.2	Ausblick	58
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	60
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	65
8	ANHANG	67
8.1	Reagenzien.....	67
8.2	Laborutensilien	68
8.3	Material Tierhaltung	68
8.4	Bedingungen Tierhaltung.....	69
9	EIGENE PUBLIKATIONEN	70
9.1	Fachzeitschriften	70
9.2	Kongressbeiträge.....	70
9.3	Eigenanteil an den Publikationen.....	71
10	DANKSAGUNGEN	72
11	AFFIDAVIT	73

1 EINLEITUNG

1.1 Hintergrund

1.1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS, auch Enzephalomyelitis disseminata) ist eine schwerwiegende, chronisch demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Die MS ist durch eine dauerhafte Schädigung der Myelinscheiden von Axonen aufgrund inflammatorischer Prozesse charakterisiert (Kipp et al. 2012). In Europa beträgt die Prävalenz der MS ca. 100–200/100.000 (Ebers 2008). Der Häufigkeitsgipfel liegt bei 28–31 Jahren und tritt bei Frauen ca. 5 Jahre früher als bei Männern ein. Neben Traumafolgen ist die MS damit die häufigste Ursache für permanente Behinderung im jungen Erwachsenenalter (Ramagopalan und Sadovnick 2011). Die Lebenserwartung von Patienten mit MS ist gegenüber der Allgemeinbevölkerung um 7–14 Jahre reduziert (Scalfari et al. 2013). Bei der bei 80–90% der Patienten vorkommenden schubförmigen MS (engl. *relapsing-remitting* MS, RRMS) kommt es periodisch zu Schüben der Erkrankung (Vollmer 2007). Zu häufigen Symptomen der MS zählen Störungen des sensorischen und motorischen Systems, Gesichtsfeldausfälle und Doppelbilder, Ataxie und Gangstörungen, Schmerz sowie vegetative Störungen (Richards et al. 2002). Die RRMS geht oft nach 10–20 Jahren in die sekundär-progressive MS (SPMS) über. Diese ist durch eine schleichende Verschlechterung gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu beginnt die primär-progressive MS (PPMS) direkt mit einem chronisch progredienten Krankheitsverlauf ohne vorherige schubförmige Phase (Lublin et al. 2014).

Das pathologische Hauptcharakteristikum der MS sind fokale Demyelinisierungsherde innerhalb des ZNS. Die schon makroskopisch sichtbaren, sklerotischen Plaques der weißen Substanz sind histologisch in verschiedene, teilweise sehr heterogene Subtypen eingeteilt (Lassmann et al. 2001). Die meisten MS-Läsionen sind mit fokaler Inflammation, axonalem Schaden und reaktiver Gliose assoziiert (Kipp et al. 2012). Neben der weißen Substanz wird auch die graue Substanz des ZNS erheblich geschädigt (Geurts und Barkhof 2008). Mit B- und vor allem T-Lymphozyten haben Zellen des adaptiven Immunsystems eine maßgebliche Funktion bei der Entstehung von Läsionen (Noseworthy et al. 2000). Über Zytokine wie Interferon gamma ($\text{INF}\gamma$), Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) und Interleukine haben T-Lymphozyten weitreichenden Einfluss auf die Aktivierung weiterer Effektorzellen wie beispielsweise den Makrophagen (Bauer et al. 2001). Bislang wird die MS als lymphozytär vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen. Bei der auch „outside-in“ genannten Hypothese (Stys et al. 2012) wird primär von gegen körpereigene Myelinproteine gerichteten, autoreaktiven T-Zellen ausgegangen. Die Lymphozyten wandern mutmaßlich über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das ZNS ein (Alvarez et al. 2011). Dort verursachen sie die initiale Demyelinisierung der Axone in der weißen Substanz. Daraus resultiert die weitere Pathologie der weißen und grauen Substanz (Kipp et al. 2012). Die vielfältigen inflammatorischen Prozesse des adaptiven Immunsystems und der *relapsing-remitting* Verlauf der MS scheinen die autoimmune Genese zu bestätigen. Die Hypothese stützt sich zu einem großen Teil auf das klinische Erscheinungsbild und auf Erkenntnisse, die mit dem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE, s.u.) gewonnen wurden (Gold et al. 2006, Lassmann und Bradl 2017).

Im alten und viel genutzten EAE-Tiermodell werden diverse Versuchstiere, u.a. Mäuse, gegen verschiedene Proteine des ZNS immunisiert. Die ersten Experimente dazu wurden bereits 1925 von Koritschoner und Schweinburg an Hasen durchgeführt. Eines der heute verwendeten Modelle nutzt die Mauslinie C57/BL6 in Kombination mit dem Peptid des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins MOG₃₅₋₅₅ (Gold et al. 2006). Nach der Immunisierung der Versuchstiere entwickeln diese eine

spezifische Immunreaktion und zeigen neurologische Ausfallsymptome. Nach ca. 14 Tagen wird die maximale Krankheitsreaktion beobachtet, die mit einem klinischen Score bewertet wird (Kipp et al. 2011). Histologisch finden sich Lymphozyteninfiltrate an postkapillären Venolen im Rückenmark sowie im Cerebellum. Diese Infiltrate werden als *perivascular cuffs* (PVC) bezeichnet. Um die Läsionen herum finden sich Gebiete fokaler Demyelinisierung und axonalen Schadens (Gold et al. 2006). Eine Invasion der Lymphozyten in das Vorderhirn findet nicht im relevanten Ausmaß statt. Die EAE-Immunreaktion verläuft hauptsächlich über die Aktivierung und konsekutive Einwanderung von CD₄⁺ T-Lymphozyten in das ZNS (Gold et al. 2006). Viele Studien zeigen, dass das EAE-Modell nur einen Teil der Pathologie der MS widerspiegelt. Demnach können die Ergebnisse auch nicht uneingeschränkt auf die MS angewendet werden (van der Star et al. 2012, Kipp et al. 2017, Lassmann und Bradl 2017, Hochstrasser et al. 2018).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die MS nicht heilbar. Die momentan vorhandenen Therapieoptionen basieren auf dem Konzept der „outside-in“ Hypothese und richten sich fast ausschließlich gegen RRMS. Die immunsuppressive Therapie des akuten Schubes der RRMS beinhaltet hochdosierte Glukokortikoide mit dem Ziel der kurzfristigen Unterdrückung der Immunantwort. Die verlaufsmodifizierende Therapie nutzt immunmodulatorische Pharmaka zur Verminderung der Krankheitsprogredienz (Gold 2014). Keine der momentan vorhandenen Therapien vermag die Progredienz der Erkrankung gänzlich aufzuhalten. Daher wird versucht, auch über eine symptomatische Therapie zumindest zur Verbesserung der Lebensqualität beizutragen (Gold 2014).

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung sind wesentliche Prozesse der MS-Pathogenese bisweilen unbekannt. Es gibt viele Hinweise darauf, dass das „outside-in“ Modell nicht alle Facetten der sehr heterogenen Pathogenese der MS erklären kann. Bereits Rodriguez und Scheithauer (1994) lieferten Hinweise, dass in frühen MS-Läsionen zunächst die inneren Schichten der Myelinscheide degenerieren. Sie argumentierten, dass dies einen externen Angriff durch eingewanderte Lymphozyten unwahrscheinlich mache. Viele darauf folgende Studien haben gezeigt, dass sich in frühen Läsionen Gebiete mit Demyelinisierung, Oligodendrozytenapoptose und Mikrogliaaktivierung finden lassen, diese aber kaum lymphozytäre Aktivität zeigen (Akassoglou et al. 1998, Lassmann et al. 2001, Barnett und Prineas 2004, Henderson et al. 2009, van Horssen et al. 2012). Zellen des angeborenen Immunsystems, beispielsweise dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, spielen eine wichtige Rolle in der Kommunikation verschiedener neuroinflammatorisch wirksamer Effektorzellen (Kipp et al. 2012). In einem neuartigen, erst kürzlich publizierten MS-Tiermodell konnte erstmals gezeigt werden, dass Lymphozyten vor allem dann das Vorderhirn infiltrieren, wenn zuvor ein gehirnintrinsischer Schaden bestand (Scheld et al. 2016).

Die von Stys et al. (2012) als „inside-out“ bezeichnete und befürwortete Hypothese sieht aufgrund o.g. Befunde eine andere Ursache für die Entstehung der MS. Die Hypothese geht primär von einem gehirnintrinsischen Schaden aus, der also zunächst innerhalb des ZNS selbst entsteht. Durch die Freisetzung von hochgradig autoantigenen Myelinbruchstücken findet erst sekundär eine Immunezellinfiltration mit peripheren Leukozyten statt. Die Stärke der Immunreaktion ist dabei zwischen den Patienten sehr unterschiedlich und bedingt die Heterogenität der MS-Subtypen. Während die Neurodegeneration ungehindert fortschreitet, finden sich aufgelagert wiederholt einzelne Immunschübe. Demnach wird die PPMS als die zugrundeliegende Form von MS angesehen, die nur zwischenzeitlich von der RRMS überlagert wird, bis sie klinisch wieder einen progressiven Verlauf in Form der SPMS zeigt (Stys et al. 2012).

Momentan gibt es keine etablierte Therapiestrategie, die den Ansatz der „inside-out“ Hypothese zugrunde legt (Gold 2014). Falls sich die Hypothese bewahrheiten sollte, hätten entsprechende Therapieansätze ein enormes Potenzial, maßgebliche Verbesserungen für die Patienten zu bewirken.

Möglicherweise könnte auf diesem Weg die MS eines Tages kausal therapiert, oder zumindest das Fortschreiten der Erkrankung gänzlich gestoppt werden.

Trotz vieler neuer Erkenntnisse sind die gehirnintrinsischen Prozesse, die der „inside-out“ Hypothese zugrunde liegen, erst wenig erforscht. Während Oligodendrozyten und Neurone vielfach untersucht wurden, gehören Astrozyten zu den am wenigsten erforschten Zelltypen des ZNS. Astrozyten gehören zu den Gliazellen (Nagelhus und Ottersen 2013) und exprimieren eine Vielzahl von Proteinen, darunter das zytoplasmatische GFAP (engl. *glial fibrillary acidic proteine*), den Glutamattransporter EAAT-2 (engl. *excitatory amino acid transporter*) und den Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4). AQP4 funktioniert als spezifischer, bidirektionaler Wasserkanal des ZNS (Papadopoulos und Verkman 2012). Zu den Funktionen von AQP4 gehört die Regulation des Volumens des extrazellulären Raumes, Kalium-Pufferung, Liquorzirkulation, interstitielle Flüssigkeitsresorption, interzelluläre Kommunikation und nicht zuletzt eine Regulation neuroinflammatorischer Prozesse. AQP4 wird für die Funktion der Retina, des Innenohres und des Geruchssystems benötigt (Papadopoulos und Verkman 2012, Nagelhus und Ottersen 2013). AQP4 ist maßgeblich an der Ausbildung der BHS beteiligt. Diese wird aus einer inneren Endothelschicht, der Basalmembran und einer äußeren Schicht aus astrozytären Fußfortsätzen gebildet.

AQP4 hat wohlmöglich einen entscheidenden Einfluss in der Pathogenese der MS. So konnten Wolburg-Buchholz et al. (2009) im Tiermodell zeigen, dass ein Polarisationsverlust von AQP4 an der BHS mit der Ausbildung von MS-typischen Gehirnödem einhergeht. Um diese entscheidenden Veränderungen von AQP4 an MS-Läsionen weiter zu erforschen, wurde die vorliegende Arbeit durchgeführt. Damit sollten wichtige Erkenntnisse über die Astrozytenpathologie und AQP4 in der Entstehung der MS gewonnen werden. Wir hoffen, auf diesem Weg einen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapieansätze der MS leisten zu können.

Pathologische Untersuchungen der MS werden in der Regel an *post mortem* Autopsien von verstorbenen Patienten durchgeführt. Seltener werden auch Biopsien genutzt (Barnett und Prineas 2004). Es ist zu beachten, dass weltweit nur eine stark limitierte Menge von Untersuchungsmaterial vorhanden ist und die entsprechenden Untersuchungen zumeist in nationalen Zentren erfolgen (Lassmann et al. 2001). Vor diesem Hintergrund entschieden wir uns, für unsere Untersuchungen, zunächst Tiermodelle heranzuziehen. Dafür wählten wir ein Tiermodell, das es ermöglicht, frühe Stadien der MS-Läsionen in Bezug auf das intrinsische Immunsystem zu untersuchen (Kipp et al. 2009). Das auf erstmalig von Carlton (1966) durchgeführten Experimenten basierende, toxische Cuprizone-Modell dient zur Untersuchung gehirnintrinsischer pathologischer Prozesse im ZNS. Versuchstiere werden über mehrere Wochen mit dem Kupfer-Chelator Cuprizone (Oxalsäurebiscyclohexylidenhydrazid) gefüttert. Dieses induziert generalisierte, diffuse Läsionen der weißen und grauen Substanz des Vorderhirns der Versuchstiere (Torkildsen et al. 2008, Goldberg et al. 2015).

Histologisch lässt sich eine Oligodendrozytenapoptose und fokale Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia erkennen (Skripuletz et al. 2013, Praet et al. 2014, Clarner et al. 2015). Die Prädilektionsstelle der vermutlich auf oxidativem Stress zurückführbaren Demyelinisierung ist das Corpus Callosum (Gudi et al. 2014). Bei einer kurzen Behandlungsdauer unter 6 Wochen ist die Demyelinisierung aufgrund intrinsischer Remyelinisierungsprozesse reversibel. Bei längeren Behandlungsdauern von 12 Wochen findet nur noch eine geringfügige Remyelinisierung statt (Kipp et al. 2009). Die T-Zell-vermittelte, autoimmune Komponente der Pathogenese der MS findet in diesem Modell keine Berücksichtigung (Skripuletz et al. 2013). Demzufolge ist eine Erforschung der Astrozytenpathologie im Cuprizone-Modell ohne humanes Korrelat nur eingeschränkt aussagefähig. Um die Ergebnisse der Tiermodelle letztendlich auf humane MS übertragen zu können, entschieden wir uns, Schnitte von Läsionen verstorbener PP- und SPMS Patienten mit in die Untersuchungen einzubeziehen.

Von Scheld et al. (2016) wurde unter dem Namen Cuprizone-EAE Modell (nachfolgend Cup-EAE Modell) ein weiteres, neuartiges Tiermodell etabliert. Es dient dazu, die Interaktion intrinsischer und

autoimmun-adaptiver Aspekte in der Entwicklung früher MS-Läsionen zu untersuchen. Für mehrere Wochen wird zunächst eine Cuprizone-Behandlung durchgeführt. Dann folgt ein zweiwöchiger Zeitraum mit Standardfutter, um eine autonome Weiterentwicklung (engl. *autonomous lesion progression*) der Läsionen zu ermöglichen (Doan et al. 2013). Im Anschluss werden die Versuchstiere gemäß des EAE-Protokolls mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und beim maximalen Krankheitscore getötet (Kipp et al. 2011). Histopathologisch zeigt sich im Cup-EAE Modell im Gegensatz zum reinen Cuprizone- oder EAE-Modell eine Infiltration von Lymphozyten in das Vorderhirn (Scheld et al. 2016). Die Lymphozyten überwinden zunächst das Endothel und dann in einem sekundären Schritt die äußere Schicht der BHS (Owens et al. 2008). Weiterhin finden sich läsionsnah Monozyten und Zeichen einer Demyelinisierung. In der Beschreibung der Läsionen des Cup-EAE Modells wird auf eine zugrundeliegende Astrozytenpathologie mit Veränderungen von AQP4 hingewiesen (Scheld et al. 2016). Diese Veränderungen sollen nun in der vorliegenden Arbeit weitergehend untersucht werden. Da das Cup-EAE Modell intrinsische und autoimmun-adaptive Aspekte der MS-Pathogenese kombiniert, halten wir es für besonders interessant, neben dem Cuprizone-Modell und humanen Läsionen auch das Cup-EAE Modell zu untersuchen.

Eine etablierte und sehr weit verbreitete Methode für die pathologische Untersuchung von MS-Läsionen stellt die Immunhistochemie (IHC) dar. In der IHC werden Gewebsschnitte durch eine Folge von Antikörpern, Enzymen und Färbereagenzien angefärbt (Goldstein, Hewitt et al. 2007). Der resultierende gefärbte Schnitt kann in einem Mikroskop betrachtet werden. Abwandlungen davon finden sich in der Methode der Immunfluoreszenz (IF), die fluoreszierende Färbereagenzien verwendet. Konventionell erfolgt die Bildanalyse mittels Mikroskop als qualitative Beobachtung oder Vermessung von zwei verblindeten Beobachtern. Dabei wird das Fachwissen des Beobachters genutzt, um die Ergebnisse zu interpretieren. Seit einigen Jahren kommen auch vermehrt digitale Bildanalysemethoden zum Einsatz. Diese nutzen softwaregestützte Algorithmen, um die Ergebnisse zu interpretieren.

1.1.2 Neuromyelitis optica

Früher wurde angenommen, dass die MS neben der RRMS, PPMS und SPMS eine weitere wichtige Unterform hat. Die damals auch als *Devic's disease* bezeichnete Neuromyelitis optica (NMO) zeichnet sich vorrangig durch eine Nervenentzündung (Neuritis) des Nervus opticus und rezidivierende Attacken transverser Rückenmarksentzündung (Myelitis) aus. Von Lennon et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass sich in ca. 75% der Patientenfälle ein spezifischer Antikörper im Blutserum der Patienten nachweisen lässt. Dabei handelt es sich um einen IgG-Autoantikörper gegen AQP4, nachfolgend AQP4-IgG genannt (Lennon et al. 2005). Seitdem gilt die NMO als eigenständige, B-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung des ZNS. Der im Vergleich zur MS spätere Häufigkeitsgipfel der NMO liegt bei 39 Jahren, Frauen sind 2–10 mal so häufig betroffen wie Männer. Typische Symptome der NMO sind Sehstörungen, Sensibilitätsstörungen, Paraplegie, und Kontinenzstörungen (Wingerchuk et al. 2007). Bei 80–90% der Patienten zeigt sich ein schubförmiger Verlauf. Das 5-Jahres-Überleben der Patienten mit schubförmigen Verlauf beträgt lediglich 68%. Die häufigste Todesursache bei dieser Patienten ist das Atemversagen (Jasiak-Zatonska et al. 2016).

NMO-Läsionen sind primär durch eine Astrozytopathie mit sekundärer Demyelinisierung der weißen und grauen Substanz gekennzeichnet. NMO-Läsionen können intra- und interindividuell sehr heterogen sein und gehen zumeist mit Komplement- und Immunglobulinablagerungen einher (Misu et al. 2013). In Läsionen der NMO zeigt sich eine Invasion von Granulozyten und Makrophagen (Lucchinetti et al. 2002). Die Pathogenese der NMO unterscheidet sich deutlich von der der MS. Zusammengefasst beschreibt das am weitesten verbreitete Konzept der NMO-Pathogenese den primären Eintritt von AQP4-IgG in das ZNS über die BHS. Dort binden die IgG spezifisch an das oberflächliche AQP4 in

den astrozytären Fußfortsätzen. Die Aktivierung des Komplementsystems führt hauptsächlich zur komplementabhängigen Zytotoxizität und Destruktion des AQP4 und somit zur Störung der AQP4-regulierten Wasserhomöostase der BHS. Aufgrund der erhöhten Permeabilität der BHS und stimulierenden Faktoren folgt die Invasion von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Die Astrozyten gehen über verschiedene Mechanismen inflammatorisch bedingt zu Grunde. Sekundär folgt die Schädigung der Oligodendrozyten, des Myelins und der Neurone (Hinson et al. 2010, Jasiak-Zatonska et al. 2016), vermutlich über einen Funktionsverlust des Glutamat-Transporters EAAT-2 (Hinson et al. 2008).

Mittlerweile ist bekannt, dass es auch innerhalb der NMO zahlreiche Subtypen gibt. Es wird von sogenannten *NMO-spectrum disorders* (NMOsd) gesprochen (Wingerchuk et al. 2007). Dazu gehören u.a. die Patienten, bei denen kein AQP4-IgG Titer nachweisbar ist (Wingerchuk et al. 2015). Insbesondere bei diesen Patienten finden sich Autoantikörper gegen den Wasserkanal Aquaporin-1 (AQP1) oder MOG (Tzartos et al. 2013, Saadoun et al. 2014). Seronegative AQP4-IgG Patienten unterscheiden sich im Krankheitsverlauf von den regulären NMO-Patienten und zeigen oft nur einen Teil der Symptome (Jasiak-Zatonska et al. 2016). Es gibt eine große Vielfalt unterschiedlicher Läsionstypen (Misu et al. 2013). Viele Mechanismen der Pathogenese der NMO sind auch nach der Entdeckung der AQP4-IgG noch nicht verstanden. Ungeklärt ist nicht zuletzt die initiale Ursache für die Immunisierung gegen AQP4 in NMO-Patienten. Weiterhin ist nicht klar, wie die AQP4-IgG im Speziellen von außen über die BHS in das ZNS gelangen.

Die Prävalenz der NMO ist geringer als bei der MS und beträgt 1:100.000 in Westeuropa (Wingerchuk 2010). Es ist ersichtlich, dass die Quantität humanen Untersuchungsmaterials, insbesondere von NMO-Gehirnschnitten, noch stärker limitiert ist als bei der MS. Dementsprechend basieren die Ergebnisse von vielen Studien noch weitaus mehr auf Tiermodellen als bei der MS (Misu et al. 2013). Im von Scheld et al. (2016) untersuchten Cup-EAE Modell werden inflammatorische Läsionen an Gefäßen des Vorderhirns von Versuchstieren erzeugt. Damit verbunden sind Veränderungen von Astrozyten, AQP4 und der BHS, den wichtigsten Charakteristika der Pathogenese der NMO. Die untersuchten Veränderungen von AQP4 in Cup-EAE könnten daher auch in der Erforschung der AQP4-IgG-dominierten NMO von Nutzen sein. Falls sich herausstellen sollte, dass das Cup-EAE Modell auch für die Untersuchung der NMO nutzbar ist, könnte auf diesem Weg ein weiteres Tiermodell für die Untersuchung der bislang nur teilweise verstandenen NMO etabliert werden.

1.2 Ziele der Arbeit

Als einer der Hauptregulatoren der Wasserhomöostase im ZNS wird vermutet, dass das Membranprotein AQP4 eine maßgebliche Rolle an der Entstehung von MS-typischen Gehirnödemen hat (Wolburg-Buchholz et al. 2009). Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, Veränderungen in der Expression und Verteilung von astrozytärem AQP4 in einem neurotoxischen, einem neuartigen toxisch-inflammatorischen MS-Tiermodell, sowie humanen MS-Gehirnpräparaten zu charakterisieren. Daneben sollen die histopathologischen Befunde mit Charakteristiken der NMO verglichen werden. Mit dieser Arbeit sollen neuartige Methoden der digitalisierten, automatisierten Histologie entwickelt werden, um bisher nicht quantifizierbare Effekte in der Verteilung von AQP4 zu untersuchen. Langfristig sollen die Ergebnisse dazu beitragen, ein besseres Verständnis von der Rolle des AQP4 in der Pathogenese der MS und der NMO zu erhalten, um daraus neue Therapieoptionen abzuleiten.

Es ergeben sich folgende Kernthesen, die untersucht werden sollen:

- 1) Die Verteilung und Polarisation von AQP4 ändert sich in Gebieten generalisierter und fokaler Vorderhirnläsionen im Cuprizone- und Cup-EAE-Tiermodell.
- 2) Veränderungen in den Tiermodellen lassen sich in humanen Präparaten von Patienten mit progressiver MS finden.
- 3) Es lassen sich Parallelen zwischen Läsionen des Cup-EAE-Modells und der NMO nachweisen.

2 METHODEN

Details zu den verwendeten Reagenzien finden sich zur besseren Übersichtlichkeit im Anhang.

2.1 Murine Präparate

2.1.1 Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere nutzen wir weibliche C57BL/6 Mäuse von Janvier Labs, Frankreich (Tabelle 1). Die Versuchstiere werden bei einer Tagesphase von je 13h in der Tierhaltung der Anatomischen Anstalt, Schillerstraße 48, gehalten. Die Käfige sind in einem hygienisch isolierten Bereich an eine von der Raumluft abgetrennte Luftversorgung angeschlossen. Die Käfige sind mit Einstreu, Tierhaus und Nestwolle ausgestattet. Futter und Wasser ist *ad libitum* vorhanden. Alle 3 Tage findet ein Käfigwechsel statt. Dazu werden die Versuchstiere unter einem desinfizierten Abzug in eine frische Käfigschale mit frischem Einstreu und Nestwolle gesetzt. Das Tierhaus, der Käfigdeckel mit Gitter und die Trinkflasche werden kontinuierlich verwendet. Die Experimente sind durch einen Tierversuchsantrag bei der Regierung Oberbayern (Referenznummer 55.2-154-2532-73-15) genehmigt. Die Experimente wurden im Zeitraum 2015–2018 durchgeführt.

Tabelle 1: Eigenschaften der Versuchstiere

Mausrasse	C57BL/6 Janvier Labs, Frankreich
Geschlecht	weiblich
Alter zu Versuchsbeginn	8 Wochen
Gewicht zu Versuchsbeginn	18-20g

2.1.2 Behandlung von Versuchstieren mit Cuprizone (CUP)

Für die Cuprizone-Experimente werden Versuchstiere für einen definierten Zeitraum mit 0,25% Cuprizone-Futter gefüttert. Die Versuchstiere jeden Käfigs erhalten über einen definierten Zeitraum täglich 100,25g frisch gemischtes Cuprizone-Futter (Tabelle 2). Der Ansatz wird für 1 Minute unter einem desinfizierten Abzug in einem Standmixer gemischt und anschließend auf je zwei Petrischalen pro Tierkäfig verteilt. Während der Zubereitung hat das Cuprizone keinen Kontakt zu Metallen.

Tabelle 2: Ansatz für 0,25% Cuprizone-Futter

Chemikalie	Menge	Durchführung
Cuprizone	0,25g	Cuprizone bei 4°C lagern. Chemikalien in
Standardfutter	100g	Becherglas für 1 min in Standmixer mischen.

2.1.3 Induktion experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE)

Für die EAE-Experimente werden Versuchstiere in einem definierten Zeitraum gegen das Peptid MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Dazu wird ein Kit von *Hooke Laboratoires* (Tabelle 3) verwendet. An zwei verschiedenen Hautlokalisationen der Versuchstiere wird mit einer Spritze je 0,1ml MOG-Lösung subkutan appliziert. Nach 2h folgt eine subkutane Injektion von 0,1ml PTX-Lösung. An Tag 1 nach der Immunisierung erfolgt eine weitere subkutane Injektion von 0,1ml PTX-Lösung. PTX wird verabreicht, um das Immunsystem der Versuchstiere zu stimulieren. In den folgenden Tagen können die Versuchstiere eine Autoimmunreaktion gegen MOG₃₅₋₅₅ entwickeln und daraus resultierend an experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) erkranken. Die Versuchstiere werden im Krankheitsverlauf nach im Kit vorgegebenen Kriterien klinisch bewertet (*scoring*, Tabelle 4). Die

Versuchstiere werden nach Begutachtung beim maximalen Krankheitsscore getötet. Dieser wird in der Regel innerhalb von 14 Tagen erreicht.

Tabelle 3: Inhalt Hooke Kit™ MOG₃₃₋₅₅ / CFA Emulsion PTX

Lösung	Inhalt
MOG-Lösung	MOG ₃₃₋₅₅ Antigen in CFA (<i>complete freund's adjuvant</i>) gelöst
PTX-Lösung	Lyophilisiertes Pertussis-Toxin in PBS gelöst

Tabelle 4: Scoring Kriterien für EAE-Experimente

Score	Klinische Beobachtungen
0,0	Keine offensichtlichen Veränderungen der motorischen Funktion im Vergleich zu nicht-immunisierten Mäusen. Wenn man die Maus an der Schwanzwurzel hochhebt, so ist der Schwanz gerade und gespannt und rotiert um die Körperachse der Maus („Propeller“). Üblicherweise streckt die Maus die Hinterläufe von sich. Keine Auffälligkeiten im Gang oder der Kopfhaltung.
0,5	Lähmung der Schwanzspitze. Beim Hochheben an der Schwanzbasis hat dieser Spannung, bis auf die Schwanzspitze. Man fühlt die Muskelspannung des Schwanzes, welcher sich weiterhin bewegt.
1,0	Lähmung des kompletten Schwanzes. Beim Hochheben an der Schwanzbasis ist der Schwanz nicht mehr gespannt, sondern fällt schlaff über den Finger. Es können keine Bewegungen des Schwanzes beobachtet werden. Die Maus streckt ihre Hinterbeine üblicherweise auseinander.
1,5	Gelähmter Schwanz und beginnende Lähmung der Hinterbeine. Beim Hochheben an der Schwanzwurzel fällt der ganze Schwanz schlaff über den Finger. Wenn man die Maus auf ein Draht-Gitter (Käfig-Gitter) setzt, dann fällt mindestens ein Hinterbein durch das Gitter. Der Gang ist leicht wackelig.
2,0	Gelähmter Schwanz und Schwäche der Hinterbeine. Beim Hochheben an der Schwanzbasis sind die Hinterbeine nicht auseinander gestreckt, sondern werden nah beieinander gehalten. Die Maus zeigt ein deutlich wackeliges Gangbild. Die Maus kann auf einer Seite die Zehen hinterher schleifen, während das andere Bein keine offensichtlichen Bewegungseinschränkungen zeigt. ODER Die Maus scheint einen <i>Score</i> von 0,0 zu haben, aber beim Laufen zeigt sich ein deutliches Kippen des Kopfes. Das Gleichgewicht ist schlecht.
2,5	Gelähmter Schwanz und Schleifen der Hinterbeine. Beide Hinterbeine bewegen sich noch ein wenig, die Maus zieht aber beide Füße hinter sich her. Die Maus strauchelt. ODER Komplette Lähmung eines Beines, aber normale Bewegung im anderen Bein. ODER Beim Hochheben milde Ausprägung der EAE (Score 0,0 - 1,5), aber deutliche Neigung des Kopfes, aufgrund welcher die Maus gelegentlich umfällt.
3,0	Gelähmter Schwanz und komplette Lähmung der Hinterbeine (am häufigsten). ODER Gelähmter Schwanz und inkomplette Lähmung der Hinterbeine. Die Maus kann zwar mit einem oder beiden Hinterbeinen paddeln, aber keines der beiden Hinterbeine vor die Hüfte bewegen. ODER Gelähmter Schwanz und Lähmung von einem Vorder- und einem Hinterbein. ODER Alle von: <ul style="list-style-type: none"> - Schwerwiegende Kopfneigung - Läuft nur entlang der Ecken des Käfigs - Drückt sich gegen die Käfigwand - Beim Hochheben an der Schwanzwurzel dreht sich die Maus

3,5	<p>Gelähmter Schwanz und komplette Lähmung der Hinterbeine, zusätzlich: Die Maus kann sich im Käfig bewegen. Wenn man sie auf den Rücken dreht, ist sie aber unfähig, sich wiederaufzurichten. Die Hinterbeine sind zusammen auf einer Seite des Körpers. ODER Die Maus bewegt sich im Käfig, aber das hintere Viertel ist flach („wie ein Teller“), was den Anschein eines Höckers an den vorderen Vierteln erweckt.</p>
4,0	<p>Gelähmter Schwanz, komplette Lähmung der Hinterbeine und partielle Lähmung der Vorderbeine. Die Maus bewegt sich kaum im Käfig, erscheint aber wach und frisst noch.</p> <p>Wenn an zwei aufeinanderfolgenden Tagen einen Score von 4,0 beobachtet wird, sollte Euthanasie erfolgen. Mit täglicher s.c. Flüssigkeitsgabe erholen sich die meisten Mäuse (C57BL/6) bis zu einem <i>Score</i> von 3,0 bis 3,5. Wenn die Maus wegen schwerwiegender Lähmungen getötet werden muss, bekommt diese Maus für das Experiment den <i>Score</i> 5,0.</p>
4,5	<p>Komplette Lähmung der Hinterbeine, partielle Lähmung der Vorderbeine. Die Maus bewegt sich nicht im Käfig und ist nicht wach. Es zeigen sich minimale Bewegungen der Vorderbeine, die Maus reagiert jedoch kaum auf Kontakt. Euthanasie empfohlen. Wird die Maus aufgrund schwerwiegender Lähmungen getötet, so erhält sie für das Experiment den <i>Score</i> 5,0.</p>
5,0	<p>Die Maus rollt spontan im Käfig (Euthanasie empfohlen). ODER Die Maus stirbt infolge der Lähmung. ODER Die Maus wird wegen schwerwiegender Lähmung getötet.</p>

Übersetzt nach der Produktbeilage Hooke KitTM MOG₃₅₋₅₅ / CFA Emulsion PTX.

2.1.4 Behandlung von Versuchstieren mit Cuprizone in Kombination mit EAE (CUP-EAE)

Für die CUP-EAE-Experimente werden Versuchstiere zuerst für einen definierten Zeitraum mit Cuprizone behandelt (2.1.2). Nach Ablauf des Zeitraumes kann je nach Versuchsaufbau (2.1.7) ein definierter Zeitraum, in dem die Versuchstiere Standardfutter erhalten, folgen. Im Anschluss werden die Versuchstiere wie in 2.1.3 beschrieben mit MOG₃₅₋₅₅ behandelt und klinisch bewertet. Die Versuchstiere werden beim maximalen *Score* der resultierenden experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis getötet.

2.1.5 Gewinnung von Untersuchungsmaterial

2.1.5.1 Gehirn- und Rückenmarkspräparate

Die Versuchstiere werden nach dem Behandlungszeitraum mit peritoneal applizierter 10 % Chloralhydratlösung (Tabelle 7) narkotisiert und getötet. Das Versuchstier verliert zunächst das Bewusstsein, nach ca. 1–2 Minuten bleibt die Atmung aus. Mit einem Sprühstoß einer Desinfektionsmittel-Sprühflasche auf ein Auge des Versuchstieres wird der Kornealreflex getestet. Das Erlöschen des Reflexes belegt den Hirntod. Der Thorax wird eröffnet. Mit einer Nadel wird in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens gestochen. Mit einer Spritze werden zuerst 1x 20ml kaltes PBS (Tabelle 6) und anschließend 2x 50ml kalte 3,7% Paraformaldehydlösung (Tabelle 8) appliziert. Die Spülung führt zur Fixierung des Gewebes. Die Versuchstiere werden mit chirurgischen Instrumenten präpariert, um die Wirbelsäule und die Schädelkalotte freizulegen. Die Präparate werden 20h bei +4°C in einem Falcon-Tube mit 50ml Paraformaldehydlösung unter Agitation post-fixiert.

Tabelle 5: Ansatz für PBS 10x, 5000ml

Chemikalie	Menge	Durchführung
PBS-Pulver	1 Packung (477,75g)	Chemikalien in Becherglas mit Rührfisch mischen. Raumtemperatur.
Aqua dest.	5000ml	

Tabelle 6: Ansatz für PBS 1x, 5000ml

Chemikalie	Menge	Durchführung
PBS 10x	500ml	Chemikalien in Becherglas mit Rührfisch mischen. pH mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 einstellen. Auf Eis lagern.
Aqua dest.	4500ml	

Tabelle 7: Ansatz für 10% Chloralhydratlösung, 10ml

Chemikalie	Menge	Durchführung
Chloralhydrat	1g	Chemikalien in Becherglas mit Rührfisch mischen. Auf Eis lagern.
PBS 1x	10ml	

Tabelle 8: Ansatz für 3,7% Paraformaldehydlösung, 1000ml

Chemikalie	Menge	Durchführung
Formaldehyd 37%	100ml	Chemikalien in Becherglas mit Rührfisch mischen. pH mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 einstellen. Filtration mit Papierfilter. Auf Eis lagern.
Aqua dest.	900ml	
NaH ₂ PO ₄	4,6g	
Na ₂ HPO ₄	8,0g	

2.1.5.2 Blutproben

Den getöteten Versuchstieren kann vor der Fixation mit einer Spritze venöses Blut aus dem rechten Ventrikel des Herzens entnommen werden. Dieses wird in Gel-Serum Röhrchen abgefüllt, beschriftet und bei 10.000G für 5 Minuten zentrifugiert. Dabei trennt sich das Blutserum vom Blutkuchen. Das Blutserum wird bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert. Pro Versuchstier kann eine Menge von 100–400µl Blutserum gewonnen werden. Die Blutproben werden später mittels ELISA auf AQP4-Antikörper untersucht (siehe Kapitel 2.4).

2.1.6 Paraffineinbettung von Gehirn- und Rückenmarkspräparaten

Nach 20 Stunden post-Fixation bei +4°C in 3,7% Formaldehydlösung (Tabelle 8) wird das Gehirn aus der Schädelkalotte freipräpariert. Entnommenes Rückenmark wird mitsamt der umgebenden Wirbelsäule entkalkt (Tabelle 9, Tabelle 10). Das Gehirn sowie das Rückenmark wird in einer aufsteigenden Alkoholreihe unter Agitation vom hydrophilen zum lipophilen Zustand überführt (Tabelle 11). Die Präparate werden in Metallförmchen mit flüssigem Paraffin umgossen und auf ein Kunststoffhalter aufgeklebt. Von den so hergestellten Präparat-Blöcken werden mittels Schlittenmikrotom Schnitte der Dicke 5µm angefertigt, in ein Wasserbad bei +47°C gegeben und ca. 30sec später auf beschriftete Objektträger aufgezogen. Im Anschluss trocknen die Objektträger für 4 Stunden bei Raumtemperatur und mindestens weitere 8 Stunden bei +48°C. Nach Fertigstellung werden die Paraffin-Schnitte katalogisiert und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 9: Ansatz für 20% EDTA-Lösung, 400ml

Chemikalie	Menge	Durchführung
EDTA	80g	Chemikalien in Becherglas mit Rührfisch mischen. Dabei kurz auf +100°C erwärmen. pH mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 einstellen.
Aqua dest.	400ml	

Tabelle 10: Protokoll Entkalkung Rückenmark mit 20% EDTA-Lösung

Lösung	Dauer	Durchführung
20% EDTA- Lösung	24h	Präparate in beschriftete Einbettkassetten geben.
20% EDTA- Lösung	24h	Die Kassetten dürfen keine Luftblasen enthalten.
Leitungswasser, fließend	12h	Kassetten mit Präparaten in Lösungen geben. Das Präparat darf nicht austrocknen. +37°C.

Tabelle 11: Protokoll Paraffineinbettung mit Alkoholreihe

Lösung	Dauer	Durchführung
Leitungswasser, fließend	5h	Präparate in beschriftete Einbettkassetten geben.
50% Ethanol	über Nacht	Die Kassetten dürfen keine Luftblasen enthalten.
70% Ethanol	40min	Kassetten mit Präparaten in Lösungen geben. Das
70% Ethanol	40min	Präparat darf nicht austrocknen. Agitation ab
96% Ethanol	40min	50% Ethanol auf Horizontalschüttler.
96% Ethanol	40min	Raumtemperatur.
96% Ethanol	40min	
100% Ethanol	40min	
100% Ethanol	60min	
100% Ethanol	60min	
Xylol	40min	
Xylol	40min	
Xylol	40min	
Paraffin	60min	
Paraffin	60min	
Paraffin	mind. 2 Tage	

2.1.7 Versuchsgruppen Mauspräparate

Für die Versuche unterscheiden wir folgende Gruppen. Die Behandlung der Versuchsgruppen erfolgt nach den oben beschriebenen Protokollen.

Tabelle 12: Probenkollektiv Mauspräparate

Gruppenname	Behandlung
CTRL	Standardfutter über gesamtem Zeitraum
S5-EAE	Standardfutter für 5 Wochen, dann MOG ₃₅₋₅₅ -Immunsierung und klinisches Scoring für ca. 2 Wochen
CUP5	5 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone
CUP1-EAE	1 Woche Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann MOG ₃₅₋₅₅ -Immunsierung und klinisches Scoring für ca. 2 Wochen
CUP3-EAE	3 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann MOG ₃₅₋₅₅ -Immunsierung und klinisches Scoring für ca. 2 Wochen
CUP3-S2-EAE	3 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann 2 Wochen Standardfutter, dann MOG ₃₅₋₅₅ -Immunsierung und klinisches Scoring für 14 Tage

2.2 Humane Präparate

In der vorliegenden Arbeit werden anonymisierte *post mortem* Gehirnpräparate verstorbener Patienten mit progressiver MS untersucht. Die Präparate wurden dem Autor über eine Kooperation mit Prof. Sandra Amor (Pathologisches Institut, *VU University Medical Center Amsterdam*, Amsterdam, Niederlande) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Die Präparate wurden unmittelbar nach Todeseintritt der Patienten durch ein Schnellautopsieprotokoll der *The Netherlands Brain Bank* (Koordination Dr. I. Huttinga; www.brainbank.nl) entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Sammlung der Präparate durch die *The Netherlands Brain Bank* ist von der Ethikkommission des *VU University Medical Center Amsterdam* genehmigt (Projektnummer 938, Jahr 2008). Alle am Programm der *The Netherlands Brain Bank* teilnehmenden Patienten oder deren Vertreter gaben Ihre Einwilligung für die Durchführung der Autopsie und für die Verwendung von Gewebe für wissenschaftliche Untersuchungen. Für die vorliegende Arbeit werden Schnitte aus 8 Gewebsblöcken von 7 *post mortem* MS-Gehirnen sowie einem Kontrollgehirn verwendet. Die demographischen Charakteristiken der Patienten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 58,85 Jahre (Mittelwert) \pm 14,3 Jahre (Standardabweichung).

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich anonymisierte Schnitte der oben genannten Präparate verwendet. Die Untersuchungen wurden im Zeitraum 2016 – 2018 durchgeführt.

Tabelle 13: Patientencharakteristika

Patient	Geschlecht	Alter	Zeitverzögerung nach Todeseintritt	Krank- heits- dauer	MS-Typ	Todesursache
1	M	72	8:30 h	26J	MS (PP)	Respiratorische Insuffizienz
2	F	50	5:35 h	14J	MS	Pneumonie
3	F	41	8:25 h	11J	MS (SP)	Natürliche Ursache
4	F	76	6:00 h	22J	MS (SP)	Unbekannt
5	M	47	7:20 h	41J	MS (PP)	Urosepsis und Pneumonie
6	M	49	8:00 h	24J	MS (SP)	Pneumonie
7	F	77	10:00 h	48J	MS (PP)	Euthanasie
CTRL	F	84	4:45 h	n/a	N/A	Herzversagen, Lungenemphysem und Dehydrierung

Einteilung MS-Typen: PP = Primary Progressive, SP = Secondary Progressive; CTRL = Kontrolle. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

2.3 Histologische und immunhistochemische Färbungen

2.3.1 Entparaffinierung und Dehydrierung von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte sind lipophil. Für einige Färbungen ist es erforderlich, die Schnitte temporär in einen hydrophilen Zustand zu überführen. Dazu werden die Schnitte durch eine Xylol-/Alkoholreihe geführt (Tabelle 14). Es folgt die Färbung (s.u.). Zur Lagerung können die Schnitte dehydriert, wieder in einen lipophilen Zustand zurück gebracht (Tabelle 15) und mit einem Deckgläschen abgedeckt werden.

Tabelle 14: Protokoll Entparaffinierung mit Alkoholreihe

Lösung	Dauer	Durchführung
Xylol	10min	Schnitte in Färbeschaukel stecken; diese wird in Kunststoffbehälter (100ml) mit entspr. Lösungen getaucht. Schnitte dürfen nicht austrocknen. Raumtemperatur.
Xylol	10min	
Xylol	10min	
Ethanol / Xylol (1:1)	5min	
100% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
70% Ethanol	3min	
70% Ethanol	3min	
50% Ethanol	3min	
Aqua dest.	3min	

Tabelle 15: Protokoll Dehydrierung mit Alkoholreihe

Lösung	Dauer	Durchführung
Aqua dest.	3min	Schnitte in Färbeschaukel stecken; diese wird in Kunststoffbehälter (100ml) mit entspr. Lösungen getaucht. Schnitte dürfen nicht austrocknen. Raumtemperatur. Zur langfristigen Lagerung Schnitte mit DPX eindeckeln.
50% Ethanol	3min	
70% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
Ethanol / Xylol (1:1)	5min	
Xylol	10min	
Xylol	10min	
Xylol	10min	

2.3.2 HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Standardfärbung der Histologie. Die Schnitte werden nach Entparaffinierung zunächst mit Hämatoxylin gefärbt, dann mit Eosin (Tabelle 16). Eosinophile Strukturen wie Proteine und Kollagen werden mit Eosin rot angefärbt, basophile Strukturen wie DNA und Ribosomen mit Hämatoxylin blau. Die HE-Färbung eignet sich zur übersichtlichen morphologischen Betrachtung eines Schnittes.

Tabelle 16: Protokoll HE-Färbung

Lösung	Dauer	Durchführung
Xylol	10min	Schnitte in Färbeschaukel stecken; diese wird in Glasgefäße mit entspr. Lösungen getaucht. Schnitte dürfen nicht austrocknen. Raumtemperatur. Zur langfristigen Lagerung Schnitte mit DPX eindeckeln.
Xylol	10min	
Ethanol / Xylol (1:1)	5min	
100% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
80% Ethanol	3min	
70% Ethanol	3min	
50% Ethanol	3min	
Aqua dest.	3min	
Mayers Hämatoxylin	7min	
Aqua dest.	10sec	
Leitungswasser, fließend	10min	
Aqua dest.	10sec	
Eosin	5 min	
Aqua dest.	10sec	
70% Ethanol	3min	
80% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
Ethanol / Xylol (1:1)	5min	
Xylol	10min	
Xylol	10min	

2.3.3 LFB-PAS-Färbung

Die *Luxol-Fast-Blue* (LFB) / *Periodic Acidic Schiff* (PAS)-Färbung besteht aus zwei konsekutiven Färbungen. Der Farbstoff *Luxol-Fast-Blue* färbt spezifisch Neurokeratin und Markscheiden blau an. PAS ist eine allgemeine histochemische Färbung für Polysaccharide und Glykoproteine. Die Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin färbt die Zellkerne an. Die Kombination beider Färbungen eignet sich zur Untersuchung von Markscheidenveränderungen unter inflammatorischen Bedingungen.

Tabelle 17: Ansatz für 0,1% Luxol-Fast-Blue-Lösung (LFB-Lösung)

Chemikalie	Menge	Durchführung
Luxol Fast Blue MBS	0,1g	Chemikalien mischen. Raumtemperatur.
96% Ethanol	100ml	
100% Essigsäure	0,5ml	

Tabelle 18: Ansatz für 0,05% Lithiumcarbonat-Lösung

Chemikalie	Menge	Durchführung
Lithiumcarbonat	0,05g	Chemikalien mischen. Raumtemperatur.
Aqua dest.	100ml	

Tabelle 19: Ansatz für 0,5% Perjodsäure

Chemikalie	Menge	Durchführung
Perjodsäure	0,5g	Chemikalien mischen. Raumtemperatur.
Aqua dest.	100ml	

Tabelle 20: Protokoll LFB-PAS Färbung

Lösung/Schritt	Dauer	Durchführung
Xylol	10min	Schnitte in Färbeschaukel stecken; diese wird in Glasgefäße mit entspr. Lösungen getaucht. Schnitte dürfen nicht austrocknen. Raumtemperatur. Die Mikroskopkontrolle dient der Überprüfung des Fortschrittes der LFB-Färbung. Ziel ist eine blau/türkise weisse Substanz und farblose graue Substanz der Gehirnschnitte. Dafür müssen die Schritte Lithiumcarbonatlösung – Mikroskopkontrolle mehrfach wiederholt werden.
Xylol	10min	
Ethanol / Xylol (1:1)	5min	
100% Ethanol	3min	
100% Ethanol	3min	
96% Ethanol	3min	
LFB-Lösung (+56°C)	über Nacht	
96% Ethanol	spülen	
Aqua dest.	spülen	
Aqua dest.	3min	
Lithiumcarbonatlösung	10sec	
70% Ethanol	2min	
Aqua dest	spülen	
Mikroskopkontrolle	-	
Aqua dest.	10sec	
0,5% Perjodsäure	2min	
Aqua dest.	spülen	
Schiffs Reagenz	10min	
Leitungswasser, warm	5min	
Aqua dest.	spülen	
Mayers Hämatoxylin	1min	
Leitungswasser, fließend	5min	
Aqua dest.	spülen	
Dehydrierung	Tabelle 15 ab Schritt 70% Ethanol	

2.3.4 Immunhistochemie (IHC)

Mit einer immunhistochemischen Färbung werden spezifisch subzelluläre Strukturen angefärbt. Im Schnitt vorhandene Antigene werden mit einem hinzugefügten Antikörper markiert und dieser mit einer Farbreaktion sichtbar gemacht (Tabelle 24). Die gefärbten Schnitte werden im Lichtmikroskop untersucht. Es kommen je nach Fragestellung unterschiedliche Reagenzien zum Einsatz (Tabelle 25). Als Negativkontrolle dient bei polyklonalen Antikörpern das Weglassen des primären Antikörpers, bei monoklonalen Antikörpern wird eine Isotyp-Kontrolle verwendet.

Tabelle 21: Ansatz für Citratpuffer, 5000ml

Chemikalie	Menge	Durchführung
Citronensäure	10,5g	Chemikalien in Becherglas mit Rührfisch mischen. pH mit NaOH bzw. HCl auf 6,0 einstellen.
Aqua dest.	5000ml	

Tabelle 22: Ansatz für EDTA-Puffer, 5000ml

Chemikalie	Menge	Durchführung
Tris	6,05g	Chemikalien in Becherglas mit Rührfisch mischen. pH mit NaOH bzw. HCl auf 9,0 einstellen.
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	1,85g	
Aqua dest.	5000ml	

Tabelle 23: Ansatz für 5% Normal Serum, 50ml

Chemikalie	Menge	Durchführung
Normal Serum	2,5ml	Chemikalien mischen und in 1ml Eppendorf-Tubes abfüllen. Bei -20°C lagern.
PBS 1x	47,5ml	

Tabelle 24: Protokoll Färbung Immunhistochemie

Arbeitsschritt	Durchführung
Vorbereitungen	Schnitte in Färbeschaukel stecken; diese wird in Kunststoffbehälter (100ml) mit entspr. Lösungen getaucht. Angesetzte Lösungen werden mit einem Vortexgerät durchmischt. Inkubationen werden in einer nassen Kammer durchgeführt.
Entparaffinierung mit Alkoholreihe ggf. Antigen-Freilegung mit Citrat- oder EDTA-Puffer	s. Tabelle 14 Freie Plätze der Färbeschaukel mit leeren Objektträgern füllen. Färbeschaukel in Kunststoffbehälter mit entspr. Lösung geben. In einer Haushaltsmikrowelle Lösung für 2:40min bei 1200W kochen. Dann 10min bei 150W erhitzen. Dann Behälter 15min in fließendem Wasser abkühlen lassen.
Waschen	5min in PBS 1x, 3 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.
Blockieren mit 5% Normal Serum in PBS	Objektträger mit Zellfaserpapier trocken saugen, Schnitt nicht berühren. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation für 60min bei +25°C.
Inkubation mit primärem Antikörper	Antikörper vor Benutzung für 1min bei 1700G zentrifugieren und Überstand pipettieren. Antikörper in 5% Normal Serum lösen. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation über Nacht bei +4°C.
Waschen	5min in PBS 1x, 3 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.
Peroxidase-Blockierung	Schnitte für 30min in 0,3% H ₂ O ₂ geben. (1ml H ₂ O ₂ + 99ml PBS 1x). Raumtemperatur. Agitation. Abdunkeln.
Waschen	5min in PBS 1x, 3 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.
Inkubation mit sekundärem Antikörper	Objektträger mit Zellfaserpapier trocken saugen, Schnitt nicht berühren. Antikörper vor Benutzung für 1min bei 4000rpm zentrifugieren und Überstand pipettieren. Antikörper in 5% Normal Serum lösen. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation für 60min bei +25°C.
Waschen	5min in PBS 1x, 3 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.
Avidin/HRP-Biotin Reaktion	Objektträger mit Zellfaserpapier trocken saugen, Schnitt nicht berühren. Bestandteil A und B des Vectastain Elite Kit 1:50 in PBS lösen. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation für 60min bei +25°C.
Waschen	5min in PBS 1x, 3 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.

Visualisierung mit DAB	Objektträger mit Zellfaserpapier trocken saugen, Schnitt nicht berühren. DAB Stock Solution 1:50 in DAB Substrate Solution lösen. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation für 10min bei Raumtemperatur. Beenden der Reaktion durch kurzes Tauchen des Schnittes in Leitungswasser.
Waschen	5min in Aqua dest. Raumtemperatur. Agitation.
ggf. Gegenfärbung mit Hämatoxyllin	Schnitte 20sec in Hämatoxyllin tauchen. 5min in fließendem Leitungswasser. 5min in Aqua dest. Raumtemperatur.
Dehydrierung mit Alkoholreihe	s. Tabelle 15
Eindeckeln	Schnitte mit Deckgläschen abdecken. Diesen zuvor mit einem Tropfen DPX bestreichen. Luftbläschen mit Spatel austreichen.

Tabelle 25: Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Einsatz	Primärer Antikörper	Verdünnung	Antigen-Freilegung	Normal Serum	Sekundärer Antikörper
AQP4, IHC Maus	AQP4 (H-80), rabbit, polyclonal (Santa-Cruz sc20812)	1:1000	-	Goat	Goat anti-rabbit, (VECTOR BA-1000)
AQP4, IHC Human	AQP4 (H-80), rabbit, polyclonal (Santa Cruz sc20812)	1:1000	-	Goat	Goat anti-rabbit, (VECTOR BA-1000)
HLA-DR, IHC Human	HLA-DR (LN3), mouse, monoclonal (eBioscience 14-9956)	1:1000	Citrat	Goat	Dako enVision anti-mouse (DAKO 4400). Schritt Avidin/HRP-Biotin entfällt.
PLP, IHC Human	PLP, mouse, monoclonal (Serotec MCA839G)	1:5000	-	Goat	Goat anti-mouse, (VECTOR BA9200)

2.3.5 Immunfluoreszenz-Färbungen (IF)

Eine Immunfluoreszenz-Färbung funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie eine immunhistologische Färbung. Statt der enzymatischen Farbreaktion werden jedoch mit Fluoreszenzfarbstoff markierte sekundäre Antikörper verwendet. Die Zellkerne werden mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) angefärbt. Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die durch unterschiedliche Lichtwellenlängen angeregt werden, ist es möglich, mehrere Färbungen in einem Versuchsansatz durchzuführen. Die gefärbten Schnitte werden im Fluoreszenzmikroskop untersucht (2.5). Es kommen je nach Fragestellung unterschiedliche Reagenzien zum Einsatz (Tabelle 27).

Tabelle 26: Protokoll Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Arbeitsschritt	Durchführung
Vorbereitungen	Schnitte in Färbeschaukel stecken; diese wird in Kunststoffbehälter (100ml) mit entspr. Lösungen getaucht. Angesetzte Lösungen werden mit einem Vortexgerät durchmischt. Inkubationen werden in einer nassen Kammer durchgeführt.
Entparaffinierung mit Alkoholreihe	s. Tabelle 14
ggf. Antigen-Freilegung mit Citrat- oder EDTA-Puffer	Freie Plätze der Färbeschaukel mit leeren Objektträgern füllen. Färbeschaukel in Kunststoffbehälter mit entspr. Lösung geben. In einer Haushaltsmikrowelle Lösung für 2:40min bei 1200W kochen. Dann 10min bei 150W erhitzen. Dann Behälter 15min in fließendem Wasser abkühlen lassen.
Waschen	5min in PBS 1x, 3 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.
Blockieren mit 5% Normal Serum in PBS	Objektträger mit Zellfaserpapier trocken saugen, Schnitt nicht berühren. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation für 60min bei +25°C.
Inkubation mit beiden primären Antikörpern	Antikörper vor Benutzung für 1min bei 1700G zentrifugieren und Überstand pipettieren. Antikörper in 5% Normal Serum lösen. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation über Nacht bei +4°C.
Waschen	5min in PBS 1x, 3 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.
Inkubation mit beiden sekundären Antikörpern	Objektträger mit Zellfaserpapier trocken saugen, Schnitt nicht berühren. Antikörper vor Benutzung für 1min bei 4000rpm zentrifugieren und Überstand pipettieren. Antikörper in 5% Normal Serum lösen. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation für 60min bei +25°C.
Waschen	5min in PBS 1x, 3 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.
DAPI-Zellkernfärbung	Objektträger mit Zellfaserpapier trocken saugen, Schnitt nicht berühren. Bisbenzimid (DAPI) 1:1000 in Aqua dest. lösen. 100µl pro Mausschnitt, 150µl pro humanem Schnitt applizieren. Inkubation für 5min bei +25°C.
Waschen	5min in Aqua dest., 2 Durchgänge. Raumtemperatur. Agitation.
Eindeckeln	Schnitte mit Deckgläschen abdecken. Diesen zuvor mit einem Tropfen FluroPreserv bestreichen. Luftbläschen mit Spatel austreichen. Mit Nagellack die Kanten des Deckgläschens versiegeln. Lagerung bei +4°C.

Tabelle 27: Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen

Einsatz	Primärer Antikörper	Verdünn.	Antigen-Freilegung	Normal Serum	Sekundärer Antikörper	Anmerkung
Doppel-IF Maus mit AQP4 und GFAP	AQP4 (H-80), rabbit, polyclonal (sc20812)	1:500	TRIS	Goat	Alexa Fluor goat anti-rabbit 488 (Life A11008)	Beide primäre Antikörper nacheinander inkubieren. Sekundäre Antikörper in 5% NGS/Triton/PBS lösen.
	GFAP, chicken, polyclonal (ab4674)	1:4000	TRIS	Goat	Alexa Fluor goat anti-chicken 594 (Life A11042)	
Doppel-IF Maus mit AQP4 und LAMP1	AQP4 (H-80), rabbit, polyclonal (sc20812)	1:500	TRIS	Donkey	Alexa Fluor goat anti-rabbit 488 (Life A11008)	-
	LAMP1, monoclonal, mouse (sc20011)	1:100	TRIS	Donkey	Alexa Fluor donkey anti-mouse 594 (Life A21209)	

2.3.6 Naphthol AS-D-Esterase Färbung

Die Naphthol AS-D-Esterase-Färbung (Kit, Sigma-Aldrich) dient dem histologischen Nachweis von neutrophilen Granulozyten im Gewebe. Das Naphthol AS-D Chloracetat wird dabei durch die in den neutrophilen Granulozyten vorkommende spezifische Esterase über eine enzymatische Hydrolyse aufgespalten. Die bei dieser Reaktion freigesetzten Naphtholverbindungen reagieren zusammen mit dem dazugegebenen Diazoniumsalz (*Fast Red Violet*), was als pink-violetter Niederschlag an den Enzymaktivitätsstellen sichtbar wird.

Zunächst wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt. Für die Färbung wurde das *Fast Red Violet* und die Natriumnitritlösung vermischt, gevortext und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Trizmal und das Naphthol AS-D Chloracetat hinzugegeben. Das gesamte Gemisch wurde zum Schluss mit 37°C warmem Aqua dest. Vermischt und vor Licht geschützt aufbewahrt. Die Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend mit 200 µL der Färbelösung bei 37°C für 2 h inkubiert.

Tabelle 28: Inhalt Naphthol AS-D-Esterase Kit

Reagenz	Konzentration
Fast Red Violet LB Standardlösung	15 mg/ml Fast Red Violet in 0,4 mol/l Salzsäure (1:48)
Natriumnitritlösung	0,1 mol/l Natriumnitrit (1:48)
TRIZMAL	1 mol/l Trizma® Maleat (1:9,6)
Naphthol AS-D Chloracetat	8 mg/ml Naphthol AS-D Chloracetat (1:48)
Aqua bidest.	

2.4 AQP4 – ELISA

Der AQP4-ELISA wurde verwendet, um Blutserum der Maus quantitativ auf einen vorhandenen AQP4-Antikörper-Titer zu untersuchen. Dazu wird ein Test der DLD Diagnostika GmbH, Hamburg verwendet. Die untere Nachweisgrenze des Tests liegt bei 0.17U/ml. Im Test binden im Serum vorhandene AQP4-Antikörper an eine mit AQP4 beschichtete 96-well Platte sowie an biotinyliertes AQP4 in Lösung (*bridge-type* ELISA). In einem zweiten Schritt bindet Streptavidin-Peroxidase an das biotinylierte AQP4. Die Peroxidase katalysiert die Reaktion von hinzugefügtem Tetramethylbenzidin (TMB), welche zunächst eine blaue, nach Zugabe einer Stopplösung, eine gelbe Färbung erzeugt. Die im Photometer gemessene Extinktion bei 450nm ist abhängig von der Konzentration des Antikörpers im Serum. Mittels definierten Werten von mitgemessenen Kalibratoren und Positiv-/Negativkontrollen lässt sich die Extinktion in eine Antikörperkonzentration umrechnen. Inhalt und Protokoll des Tests finden sich in Tabelle 29 und Tabelle 30. Neben den Proben wurde zusätzlich ein rekombinant hergestellter Anti-AQP4-Antikörper (AQP4 H-80, rabbit, polyclonal, Santa-Cruz sc20812) in der Verdünnung 1:50 getestet.

Tabelle 29: Inhalt AQP4-ELISA DLD Diagnostika GmbH

Inhalt	Menge
Mit AQP4 beschichtete Wells	96 well-Platte, gebrauchsfertig
Kalibratoren A – E	5x 0,7ml, gebrauchsfertig Konzentrationen der Kalibratoren in U/ml (arbiträre Einheiten) A: 1.5; B: 5; C:20; D:40; E:80 U/ml
Positivkontrolle I und II	2x 0,7ml, gebrauchsfertig
Negativkontrolle	0,7ml, gebrauchsfertig
AQP4-Biotin	3x 1,5ml, lyophilisiert
Rekonstitutionspuffer für AQP4-Biotin	10ml, gebrauchsfertig
Streptavidin-Peroxidase (SA-POD)	0,8ml, 20-fach konzentriert
Verdünnungslösung für SA-POD	15ml, gebrauchsfertig
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	15ml, gebrauchsfertig
Waschpuffer	120ml, 10-fach konzentriert, wird in Aqua dest. verdünnt.

Tabelle 30: Protokoll AQP4-ELISA

Arbeitsschritt	Durchführung
Vorbereitungen	Proben und Reagenzien auf Raumtemperatur auftauen. Rekonstitution von AQP4-Biotin und Verdünnung von SA-POD und Waschpuffer.
Beladung der Platte	Je 2x50µl Serum, Kalibrator, Negativ- und Positivkontrolle in wells pipettieren (Doppelbestimmung). Zwei wells für den Blank-Wert freilassen.
Inkubation AQP4-Biotin	25µl rekonst. AQP4-Biotin pro well, 2h Inkubation bei Raumtemperatur. Agitation auf Horizontalschüttler bei 500rpm.
Waschen	Platte ausleeren, 5min in Waschpuffer spülen, 3 Durchgänge. Platte auf Zellfasertuch ausklopfen.
Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase	100µl SA-POD pro well (außer Blank), 20min Inkubation bei Raumtemperatur. Agitation auf Horizontalschüttler bei 500rpm.
Waschen	Platte ausleeren, 5min in Waschpuffer spülen, 3 Durchgänge. Platte auf Zellfasertuch ausklopfen.

Substratlösung TMB	100µl TMB pro well, 20min Inkubation bei Raumtemperatur. Abdunkeln. Agitation auf Horizontalschüttler bei 500rpm.
Stopplösung	100µl Stopplösung pro well, 5sek schütteln.
Messung	Absorption bei 450 und 405nm messen und vom Blankwert (Substratlösung + Stopplösung) abziehen. Konzentrationen berechnen.

2.5 Mikroskopie und Erstellung digitaler histologischer Schnitte

Schnitte aus histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden mit einem Lichtmikroskop im Hellfeld untersucht. Schnitte aus Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Auswertung wurden die Schnitte fotografiert und als digitales Bild (Dateiformat .tiff) gespeichert. Alle Bilder innerhalb eines Experimentes wurden mit den gleichen Einstellungen fotografiert. Tabelle 31 zeigt die verwendeten Geräte.

Tabelle 31: Verwendete Mikroskope und Kameras

Mikroskop + ggf. Kamera	Einsatz
Olympus CHS	Hellfeld, Färbekontrolle
Nikon ECLIPSE 50i	Hellfeld, manuelle Untersuchungen
Nikon ECLIPSE E200 + DigitalSight DS-2Mv	Hellfeld, Fotografie für digitale Auswertung
Zeiss AXIOPHOT	Fluoreszenz, Färbekontrolle
Zeiss AXIOPLAN + QImaging RETIGA 2000R	Fluoreszenz, manuelle Untersuchungen
Leica DMI 8 + Hamamatsu ORCA-Flash 4.0 Digital CMOS Camera	Fluoreszenz, Fotografie für digitale Auswertung

2.6 Automatisierte Bildanalyse mittels digitaler Histologie

Für die quantitativen Untersuchungen hat der Autor der vorliegenden Arbeit automatisierte digitale Algorithmen zur Auswertung histologischer Schnitte entwickelt. Mit Hilfe dieser sollen die qualitativen Beobachtungen histologischer Veränderungen in statistisch auswertbare Messwerte überführt werden. Die Automatisierung der Prozesse soll dazu genutzt werden, in kurzer Zeit größere Datenmengen zu analysieren.

2.6.1 Softwareumgebung

Als Softwareumgebung wird die etablierte und weit verbreitete Fiji-Distribution (Schindelin et al. 2012) der *open source* Software ImageJ (Rueden et al. 2017) verwendet. Fiji stellt verschiedene Grundwerkzeuge (*tools*) bereit, die Bilddaten auf Basis mathematischer Modelle in Zahlenwerte überführen können. Fiji ermöglicht, Funktionen mit eigenen Analysealgorithmen zu programmieren, um die *tools* logisch miteinander zu verknüpfen. Das Zusammenfassen mehrerer Funktionen zu einem Programm ermöglicht, komplexere Auswertprozesse zu konstruieren.

2.6.2 Ablauf Programm „Digital Histology Processor“

Der „Digital Histology Processor“ ist ein Programm aus 1128 Zeilen Code in *ImageJ Macro Language* bzw. Java und führt unterschiedliche Tools in eine Gesamtanwendung zusammen. Das Programm verwaltet die zu- und abgeführten Daten und ermöglicht es, einzelne Funktionen zu starten. Das Programm generiert ein grafisches Hauptmenü (Abbildung 1), durch welches die Funktionen und einige

Einstellungen vom Benutzer anwählbar sind (Abbildung 2). Die Funktionen beinhalten die Auswertelgorithmen selbst und werden zur Stapelverarbeitung von großen Bilderserien wiederholt. Der Programmablauf erfolgt gemäß folgender Sequenz:

1. Programmstart, Ausführen allgemeiner Hintergrundereinstellungen, Generieren eines grafischen Hauptmenüs für Funktionswahl.
2. Warten auf Auswahl einer Funktion durch den Benutzer.
3. Nach Funktionsauswahl Erstellung eines Fensters für die Angabe des „Input-Ordners“ mit Bildern einer definierten Vergrößerung. Die verwendete Vergrößerung bei der Bilderstellung kann in den Einstellungen angepasst werden.
4. Erstellung eines Fensters für die Angabe des *output*-Ordners, in dem die prozessierten Schnitte sowie Verlaufsdateien und Ergebnisse abgespeichert werden
5. Ausführen der Funktion, welche die Prozessierung aller Bilder im *input*-Ordner durchführt. Innerhalb einer *for*-Schleife wird die gewählte Funktion gestartet und der jeweilige Funktionsablauf für alle Bilder wiederholt.
6. Speichern der berechneten Ergebnisse als .xls Tabelle (Microsoft Excel), Abspeichern der aller Zwischenschritten der Bildanalyse zur Nachkontrolle. Beendigung des Programms.

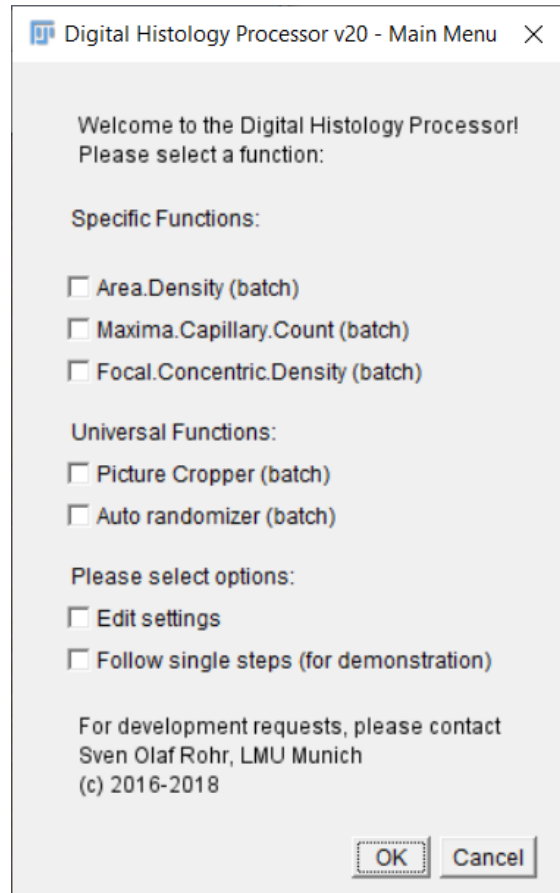


Abbildung 1: Hauptmenü Digital Histology Processor.

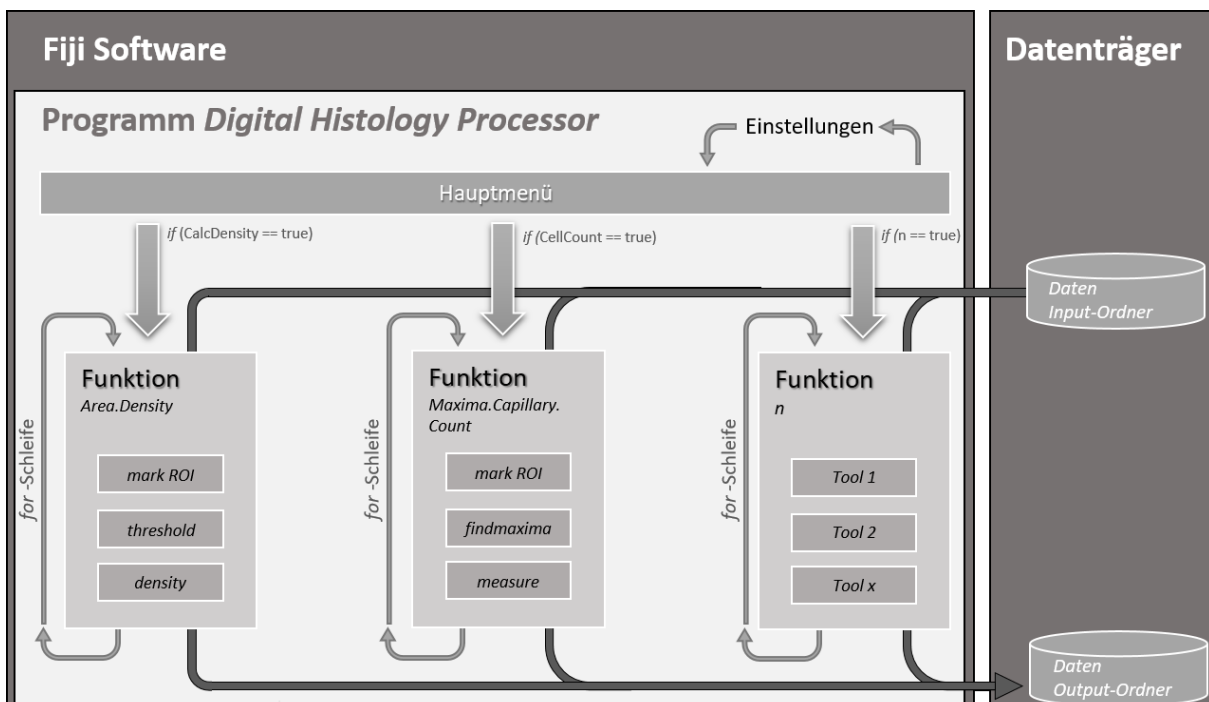


Abbildung 2: Architektur des Programms Digital Histology Processor.

2.6.3 Häufig genutzte Tools

2.6.3.1 Skalierung

Die Seitenlänge eines quadratischen Bildpunktes (Pixel) wird einem definierten Längenwert zugeordnet. Damit erhalten Strukturen auf dem Bild den maßstabgetreuen Größenwert. Die Bestimmung erfolgt mittels Ausmessung einer im Mikroskop fotografierten Mikroskala.

2.6.3.2 Bildmodus 8bit

Die RGB-Bildinformation des Bildes wird auf einen 8-Bit-Datensatz reduziert, der ressourcenintensivere Rechenoperationen ermöglicht.

2.6.3.3 ROI und Area

Mit Hilfe eines Auswahlfensters wird eine *Region of Interest (ROI)* definiert, die eine Fläche einschließt. Die Größe der Fläche kann gemessen werden und wird nachfolgend als *area* bezeichnet.

2.6.3.4 Threshold

Der *threshold*-Wert ist ein Helligkeitswert, der die gesamten Pixel einer *ROI* in zwei Gruppen einteilt. Pixel unterhalb des *threshold*-Wertes erhalten den binären Wert 0, Pixel über dem *threshold*-Wert erhalten den binären Wert 1. Die Berechnung des *threshold*-Wertes erfolgt nach verschiedenen mathematischen Formeln. Für die Analysen wurden die *threshold*-Definitionen *Percentile* und *IsoData* verwendet.

2.6.3.5 Density

Die *density* beschreibt das Verhältnis der Pixel mit Wert 0 zu den Pixeln mit Wert 1 (nach Durchführung des *thresholds*). Der Wert wird in Prozent angegeben.

2.6.3.6 Findmaxima

findmaxima ist ein *tool*, um lokale Färbemaxima in der *ROI* zu markieren. Ausgabewert ist die Anzahl der Maxima. Maxima werden dann gezählt, wenn das lokale Gebiet um das Maximum keinen Punkt mit einem größeren Wert aufweist. Es wird nur ein Maximum pro Gebiet akzeptiert. Die *noise tolerance* wird definiert, um indirekt die Größe des lokalen Gebiets festzulegen.

2.6.4 Funktion Maxima.Capillary.Count

Die Funktion Grid.Capillary.Count (Abbildung 3) dient dazu, immunhistochemisch angefärbte kortikale Kapillaren automatisch auszählen zu lassen. Dazu werden die angefärbten Kapillaren gezählt, die ein lokales Färbemaximum aufweisen. Der Funktionsablauf erfolgt gemäß folgender Sequenz:

1. Allgemeine Einstellungen für die Funktion (Skalierung, *reset* von dynamischen Parametern, Variablendefinitionen).
2. Markieren der zu untersuchenden Fläche mittels variabler *ROI* durch den Benutzer. Es werden nur kortikale Strukturen eingeschlossen, große Gefäße oder Artefakte werden ausgeschlossen.
3. Ausführung des Tools *findmaxima*. Für diese Funktion wurde empirisch der Wert von 45 als *noise tolerance* ermittelt und für die Messung gewählt. Da ein heller Hintergrund vorhanden ist, wurde die Option *light background* gewählt.
4. Messung *area*, Berechnung Kapillardichte (Anzahl Maxima/*area*).

5. Abspeichern der Ergebnistabelle. Exportieren der bearbeiteten Bilddateien und ROIs zur Nachkontrolle.

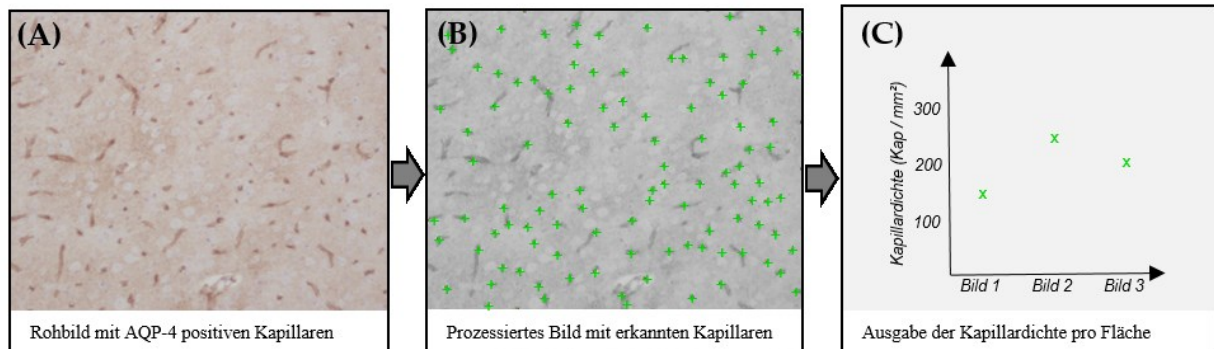


Abbildung 3: Funktionsprinzip Maxima.Capillary.Count. Gefärbte Strukturen (A) werden mit Hilfe des Tools *findmaxima* als lokale Färbemaxima identifiziert (B, grün). Die Kapillardichte (C) wird als Anzahl der Färbemaxima pro Fläche (*area*) angegeben.

2.6.5 Funktion Area.Density

Die Funktion Area.Density (Abbildung 4) dient dazu, Bilder eines definierten Gebietes auf die Dichte der Immunreaktivität nach einer immunhistochemischen Färbung zu untersuchen. Der Funktionsablauf erfolgt gemäß folgender Sequenz:

1. Allgemeine Einstellungen für die Funktion (Skalierung, *reset* von dynamischen Parametern, Variablendefinitionen).
2. Bildbearbeitung mit Bildmodus *8bit* und *threshold percentile*.
3. Markieren der zu untersuchenden Fläche mittels *ROI*, Messung *density*.
4. Abspeichern der Ergebnistabelle. Exportieren der bearbeiteten Bilddateien und *ROIs* zur Nachkontrolle.

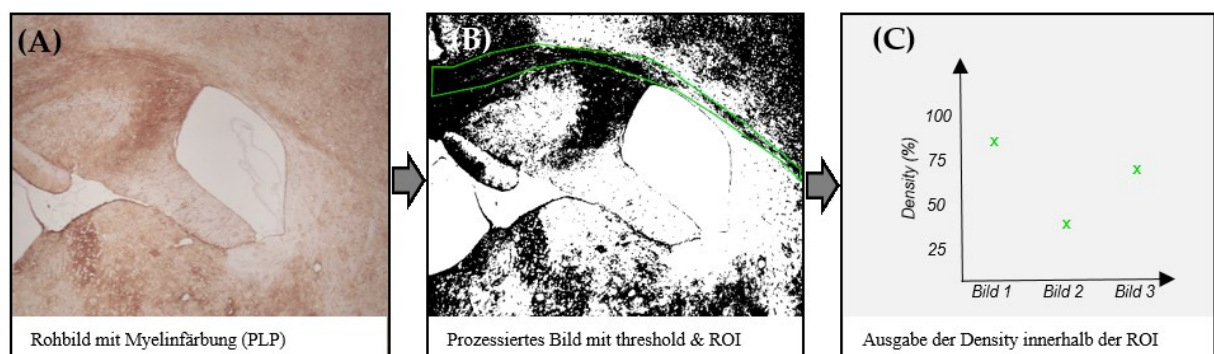


Abbildung 4: Funktionsprinzip Area.Density. Gefärbte Strukturen (A) werden mit Hilfe des Tools *threshold* in gefärbte und ungefärbte Pixel unterteilt (B). Es wird eine *ROI* markiert (grün). Die *density* (C) wird als Anteil der gefärbten Pixel an allen Pixeln innerhalb der *ROI* angegeben.

2.6.6 Funktion Focal.Concentric.Density

Die Funktion Focal.Concentric.Density (Abbildung 5) dient dazu, die unmittelbare Umgebung postkapillärer Venolen hinsichtlich der relativen Dichte der Immunreaktivität nach einer Immunfluoreszenz-Färbung zu untersuchen. Dabei wird die Immunreaktivität in der proximalen Umgebung der Venole in Bezug zur distalen Umgebung gesetzt.

Der Funktionsablauf erfolgt gemäß folgender Sequenz:

1. Allgemeine Einstellungen für die Funktion (Skalierung, *reset* von dynamischen Parametern, Variablendefinitionen).
2. Bildbearbeitung mit *8bit*-Bildmodus und *threshold IsoData* (Abbildung 5A).
3. Markieren der zu untersuchenden Venole mittels ROI durch Benutzer. „ROI 0“ definiert die Ausmaße der Venole, die Glia limitans perivascularis wird eingeschlossen.
4. Berechnung der *Dynamic Enlargement Distance (DED)*, basierend auf dem Mittelwert des minimalen und maximalen *feret*-Durchmessers (kleinster bzw. größter Abstand zweier Punkte) von ROI 0 multipliziert mit einem Verkleinerungsfaktor entsprechend $DED = 16\% * (FeretMax+FeretMin)/2$. Der Verkleinerungsfaktor 16% wurde empirisch gewählt. Die Größe der DED verhält sich proportional zur Größe der Venole. (Abbildung 5B)
5. Erstellung konzentrischer Ringe um ROI 0. Der Radius eines jeden Ringes „ROI 1“ bis „ROI 5“ (Abbildung 5C) errechnet sich aus $r(ROI n) = r(ROI 0) + n * DED$.
6. Messung der *density* für alle konzentrischen Ringe ROI 1 bis ROI 5.
7. Das Ergebnis der Messung von ROI 1 – ROI 4 wird auf den Messwert von ROI 5 normalisiert. Damit erhält ROI 5 (Peripherie) die *density* 100%. ROI 1 – ROI 4 (Umgebung der Venole) erhalten einen *density*-Wert normalisiert zu ROI 5 (Abbildung 5D). Abspeichern der Ergebnistabelle. Exportieren der bearbeiteten Bilddateien und ROIs zur Nachkontrolle.

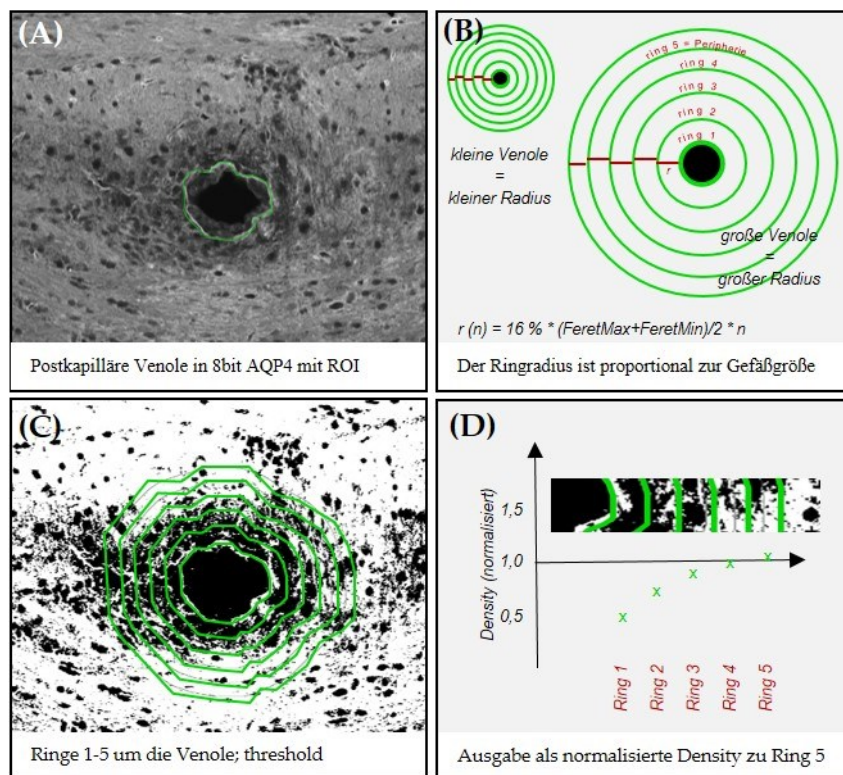


Abbildung 5: Funktionsprinzip Focal.Concentric.Density. (A) Perivaskuläre Immuzellinfiltrate in AQP4-Immunfluoreszenz-Färbung. (B) Die Größe der Venole ist proportional zur Größe der DED (Dynamic Enlargement Distance). (C) 8-Bit Threshold-Bearbeitung des Bildes mit konzentrischen Kreisen. (D) Normalisierung der *density* von ROI 1–4 auf ROI 5. *Modifiziert nach Rohr et al. (2020).*

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit den Programmen MS Office Excel der Firma Microsoft (Version 2013), SAS der gleichnamigen Firma (Version 9.4) sowie Prism der Firma GraphPad (Version 5.0). Zur deskriptiven Statistik wird der Median sowie die Interquartil-Range (IQR) verwendet, sofern nicht anders angegeben. Die statistische Überprüfung einer Hypothese wird mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wird die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen. Die Daten werden explorativ analysiert.

Die statistische Testung der Unterschiede zweier Gruppen mit unverbundenen Stichproben nonparametrischer Verteilung wird mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Testung auf Unterschiede zweier Gruppen mit verbundenen Stichproben und nonparametrischer Verteilung wird mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

In den Experimenten von Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 liegt ein *repeated measures* Design der jeweiligen Experimente vor. Ein Experiment ist so aufgebaut, dass zwei Gruppen mit je 3 Versuchstieren und jeweils 4 Messungen miteinander verglichen werden. Dazu wird jeweils eine *repeated measures* ANOVA über die Ränge der resultierenden 12 Beobachtungen pro Gruppe gerechnet. Die Testung erfolgte unter Prüfung der zugehörigen Vorbedingungen. Das Design wurde so gewählt, um trotz kleiner Stichprobenwahl das Auftreten möglicher Fehler der digitalen Bilderauswertung gering zu halten.

Die Testung mehrerer Gruppen auf Unterschiede mit unverbundenen Stichproben nonparametrischer Verteilung wird mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Tabelle 32: Verwendete statistische Tests

Anzahl Gruppen	Kondition	Test
2	Nonparametrisch, unverbunden	Mann-Whitney-U
2	Nonparametrisch, verbunden	Wilcoxon-Test
2	Repeated Measures Design	Repeated measures ANOVA
2	Post-hoc nach Kruskal-Wallis	Dunn's post-hoc test
3+	Nonparametrisch, unverbunden	Kruskal-Wallis-Test

3 ERGEBNISSE

3.1 Verhalten von AQP4 in demyelinisierten Gehirnarealen

3.1.1 AQP4 in der grauen Substanz der Maus nach Cuprizone-Behandlung

Es wurden die Auswirkungen einer 5-wöchigen Cuprizone-Behandlung auf die kortikale AQP4-Verteilung gegenüber Kontrolltieren untersucht (Tabelle 33). Die Gehirnpräparate wurden entnommen, in Formaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingebettet (2.1.6). Je Gehirnregion wurden zwei Schnitte pro Versuchstier immunhistochemisch mit AQP4-Antikörper gefärbt (2.3.4). Die Schnitte wurden morphologisch beurteilt.

3.1.1.1 *Qualitative Auswertung der AQP4-Polarisation*

Im Lichtmikroskop zeigte sich in beiden Gehirnregionen der Kontrollgruppe (CTRL) ein fokussiertes, heterogenes, AQP4-positives Färbemuster. Perivaskulär war die Immunreaktivität am größten, es zeigte sich ein scharf begrenzter AQP4-positiver Saum (Glia limitans perivascularis). Im Interstitium fand sich eine schwache Immunreaktivität. In der Cuprizonegruppe (CUP5) war die Verteilung diffus und deutlich homogener. Der AQP4-positive Saum war unschärfer und schlechter vom Interstitium abgrenzbar. Es war erkennbar, dass nach einer 5-wöchigen Cuprizone-Behandlung die Verteilung von AQP4 in der grauen Substanz homogener und intensiver war (Abbildung 6).

Tabelle 32: Versuchsgruppen für 3.2.1

Gruppenname	Behandlung	Anzahl Versuchstiere
CUP5	5 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone	3
CTRL	5 Wochen Standardfutter	3

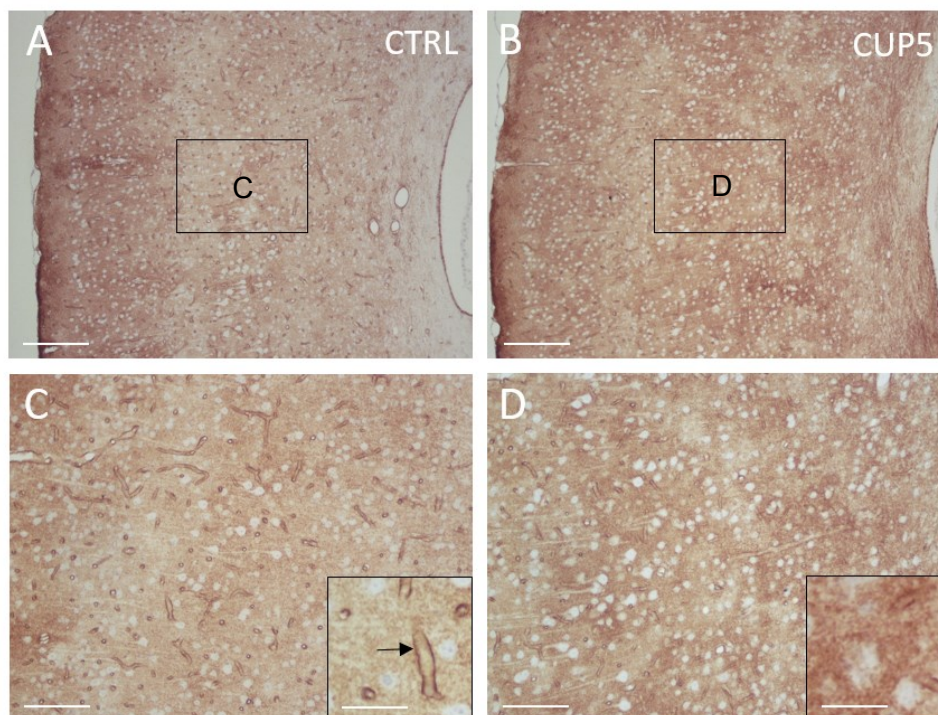


Abbildung 6: AQP4-Verteilung in der grauen Substanz im Cortex der Maus vor und nach Cuprizone-Behandlung. (A,C) AQP4-Färbemuster in Kontrolltieren (CTRL). (B,D) AQP4-Färbemuster in Versuchstieren nach 5 Wochen Cuprizone-Behandlung (CUP5). Vergrößerungen: Zerebrale Kapillaren. Der Pfeil zeigt auf die polarisierte, AQP4-positive Glia limitans perivascularis. Gehirnregion 265. Färbung: AQP4-IHC. Skalierung: (A-B) 180µm (C-D) 90µm, Einsätze 30µm. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

3.1.1.2 Quantitative Auswertung der AQP4-Polarisation

Zur Quantifizierung des Effektes wurde die Funktion Maxima.Capillary.Count (2.6.2) des Digital Histology Processors angewendet. Der gemessene Wert dient als Modell der AQP4-Polarisation des untersuchten Gebietes. Ein hoher Wert (viele gemessene Kapillaren/mm²) repräsentiert somit eine starke Fokussierung des Farbstoffes auf die Kapillaren bei einer relativ schwach gefärbten Umgebung. Ein niedriger Wert (geringe Anzahl gemessener Kapillaren/mm²) repräsentiert eine schwache Fokussierung des Farbstoffes auf die Kapillaren bei einer vergleichbar stark gefärbten Umgebung. Je Gehirnregion wurde pro Versuchstier 2 Schnitte mit je 2 Gehirnhälften untersucht. Es resultierten 4 Bilder einer Gehirnregion pro Versuchstier. Dabei ist zu beachten, dass ein *repeated measures* Design mit 4 Messungen unterschiedlicher Gehirnhälften pro Versuchstier vorliegt. Es wurde jeweils eine *repeated measures* ANOVA über die Ränge der Beobachtungen gerechnet.

In der Betrachtung aller Messwerte der Gehirnregion 215 fanden sich im Median in der Kontrollgruppe 355,5 Cap/mm², in der Cuprizonengruppe 222,8 Cap/mm². Es fand sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Cuprizonengruppe (p=0,1073). In Gehirnregion 265 fanden sich im Median in der Kontrollgruppe 408,2 Cap/mm², in der Cuprizonengruppe 160,7 Cap/mm². Die *repeated measures* ANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und Cuprizonengruppe (p=0,0429). Aus der 5-wöchigen Cuprizonenfütterung resultierte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der erkannten Kapillaren in Gehirnregion 265.

Tabelle 33: Absolute Kapillardichte in Gehirnregion 215 [detektierte Kapillaren/mm²]

	CTRL	CUP5
Minimum	163,3	115,5
25% Perzentile	221,7	157,6
Median	355,5	222,8
Mittelwert (SD)	317,1 (96,56)	213,9 (59,56)
75% Perzentile	388,1	264,8
Maximum	434,1	304,1

Tabelle 34: Absolute Kapillardichte in Gehirnregion 265 [detektierte Kapillaren/mm²]

	CTRL	CUP5
Minimum	366,2	52,86
25% Perzentile	383,5	119,2
Median	408,2	160,7
Mittelwert (SD)	406,5 (27,58)	194,6 (114,1)
75% Perzentile	424,0	312,5
Maximum	455,2	397,1

Tabelle 35: repeated measures ANOVA

Gruppen	p-Wert
Region 215: CTRL vs. CUP5	0,1073 (ns)
Region 265: CTRL vs. CUP5	0,0429 (*)

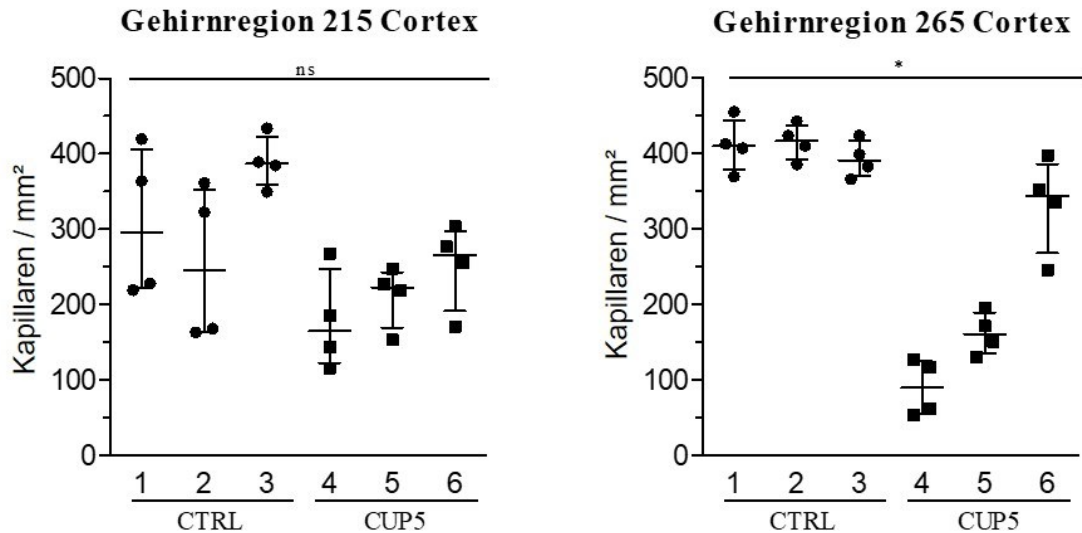


Abbildung 7: Absolute Kapillardichte im Cortex in verschiedenen Gehirnregionen der Maus vor und nach Cuprizonebehandlung. Links: Detektierte Kapillardichte im Cortex in Gehirnregion 215. Rechts: Detektierte Kapillardichte im Cortex in Gehirnregion 265. Darstellung: Dot-plot, Median + IQR. Pro Versuchstier wurden 4 Kortexhälften gemessen. Statistik: repeated measures ANOVA, $n=3$. ns= nicht signifikant, * = $p<0,05$. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

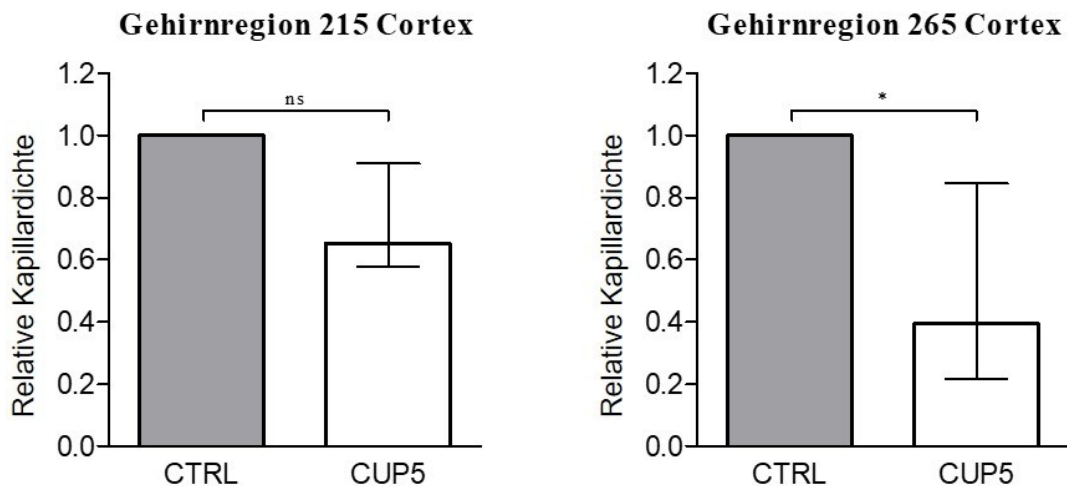


Abbildung 8: Relative Kapillardichte im Cortex in verschiedenen Gehirnregionen der Maus vor und nach Cuprizonebehandlung. Links: Relative Kapillardichte im Corpus Callosum in Gehirnregion 215. Rechts: Relative Kapillardichte im Corpus Callosum in Gehirnregion 265. Darstellung: Median + IQR. Messwerte auf Kontrollniveau (=1,0) normiert. Pro Versuchstier wurden vier Kortexhälften gemessen. Statistik: repeated measures ANOVA, $n=3$. ns= nicht signifikant, * = $p<0,05$. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

3.1.2 AQP4 in der weißen Substanz der Maus nach Cuprizone-Behandlung

Es wurden die Auswirkungen einer 5-wöchigen Cuprizone-Behandlung auf die AQP4-Verteilung in der weißen Substanz untersucht. Die Behandlung der beiden Versuchsgruppen ist in Tabelle 36 beschrieben. Es wurde das Corpus Callosum der Gehirnregionen 215 und 265 nach Sidman medial sowie lateral untersucht. Nach der Entnahme der Gehirnpräparate wurden diese in Formaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingebettet (2.1.6). Je Gehirnregion wurden zwei Schnitte pro Versuchstier immunhistochemisch mit AQP4-Antikörper gefärbt (2.3.4). Die Schnitte wurden morphologisch beurteilt.

3.1.2.1 *Qualitative Auswertung der AQP4-Immunreaktivität*

Im Lichtmikroskop zeigte sich im Corpus Callosum der Kontrollgruppe (CTRL) eine mittelgradig starke Färbung durch den Antikörper. In der Behandlungsgruppe (CUP5) war im Vergleich eine deutlich stärkere Färbung erkennbar. Dieser Effekt war sowohl in der medialen sowie der lateralen Region des Corpus Callosums in Gehirnregion 215 sowie 265 ausgeprägt. Repräsentative Bilder der beurteilten Strukturen finden sich in Abbildung 9.

Tabelle 36: Versuchsgruppen für 3.3.1

Gruppenname	Behandlung	Anzahl Versuchstiere
CUP5	5 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone	3
CTRL	5 Wochen Standardfutter	3

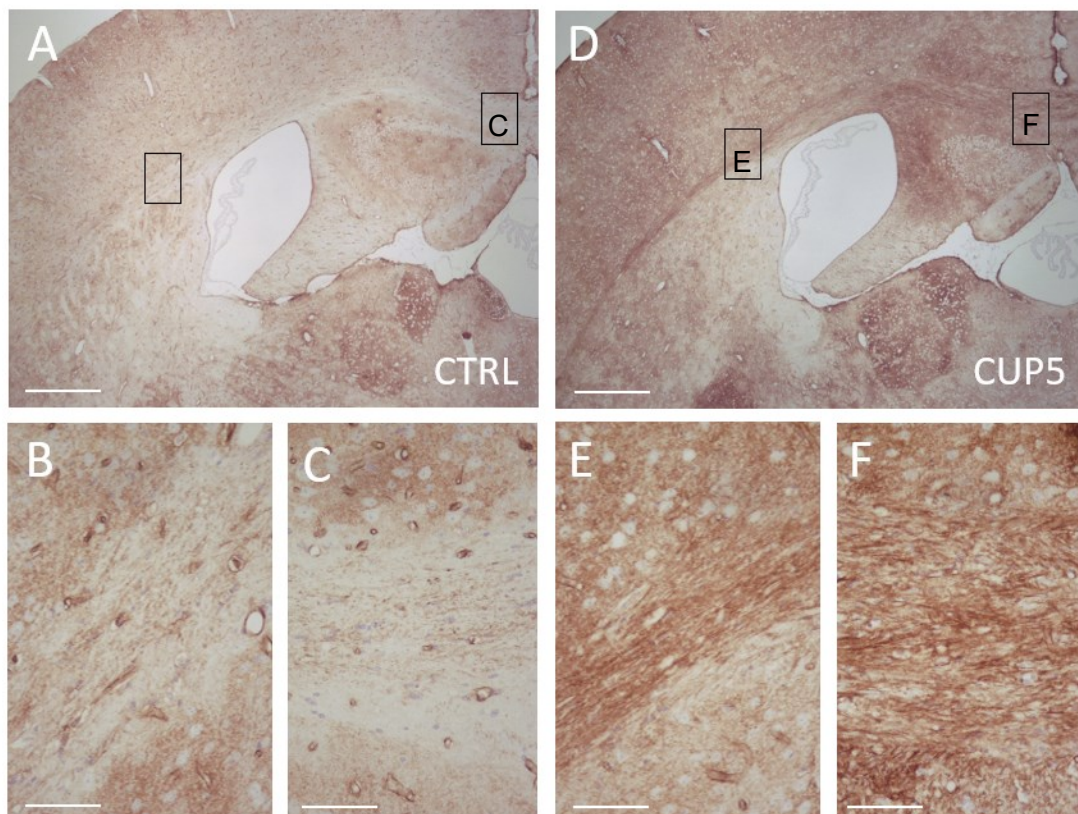


Abbildung 9: AQP4-Immunreaktivität im Corpus Callosum der Maus nach 5 Wochen Cuprizonebehandlung. (A-C) Repräsentative Bilder von Kontrolltieren (CTRL); Vergrößerungen des Corpus Callosums lateral (B) und medial (C). (D-F) Repräsentative Bilder von Versuchstieren mit Cuprizonebehandlung (CUP5); Vergrößerungen des Corpus Callosum lateral (E) und medial (F). Färbung: AQP4-IHC. Skalierung: (A, D) 455µm (B, C, E, F) 45µm. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

3.1.2.2 Quantitative Auswertung der AQP4-density

Zur Quantifizierung wurde die Funktion Area.Density (2.6.5) des Digital Histology Processors verwendet. Die Funktion dient dazu, die Immunreaktivität von AQP4 im Corpus Callosum zu modellieren. Ein hoher *density*-Wert steht für eine hohe Immunreaktivität von AQP4. Von jedem Schnitt wurden 2 Bilder erstellt (1 Bild pro Kortexhälfte). Es resultierten 4 Bilder einer Gehirnregion pro Versuchstier. Es wurde jeweils eine *repeated measures* ANOVA über die Ränge der Beobachtungen gerechnet. Es wurde zwischen medialem und lateralem Corpus Callosum unterschieden.

In der Betrachtung der Messwerte der Gehirnregion 215 ergab sich median in der Kontrollgruppe eine *density* von 15,18% in der Cuprizonengruppe 42,27%. Der *repeated measures* ANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und Cuprizonengruppe ($p=0,0076$). In Gehirnregion 265 medial ergab sich im Median in der Kontrollgruppe eine *density* von 30,79% und 89,7% in der Cuprizonengruppe. Lateral ließ sich im Median eine *density* von 13,77% in der Kontrollgruppe und 51,27% in der Cuprizonengruppe messen. Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und Cuprizonengruppe (265 medial: $p=0,0040$; 265 lateral: $0,0071$).

Tabelle 37: Messwerte der AQP4-density im Corpus Callosum der Gehirnregion 215 der Maus nach 5 Wochen Cuprizonenbehandlung [%]

	CTRL lateral	CUP5 lateral
Minimum	4,095	8,616
25% Perzentile	9,492	35,49
Median	15,18	42,27
Mittelwert (SD)	16,36 (8,781)	43,88 (17,09)
75% Perzentile	22,18	59,81
Maximum	35,74	70,24

Tabelle 38: Messwerte der AQP4-density im Corpus Callosum der Gehirnregion 265 der Maus nach 5 Wochen Cuprizonenbehandlung [%]

	CTRL medial	CUP5 medial	CTRL lateral	CUP5 lateral
Minimum	18,74	67,09	8,898	37,06
25% Perzentile	24,27	81,36	9,448	42,26
Median	30,79	89,7	13,77	51,27
Mittelwert (SD)	34,74 (11,74)	87,56 (9,754)	17,33 (8,829)	51,89 (51,89)
75% Perzentile	43,73	95,43	27,34	63,4
Maximum	56,59	97,41	31,93	65,81

Tabelle 39: repeated measures ANOVA

Gruppen	p-Wert
Region 215 lateral: CTRL vs. CUP5	0,0076 (**)
Region 265 medial: CTRL vs. CUP5	0,0040 (**)
Region 265 lateral: CTRL vs. CUP5	0,0071 (**)

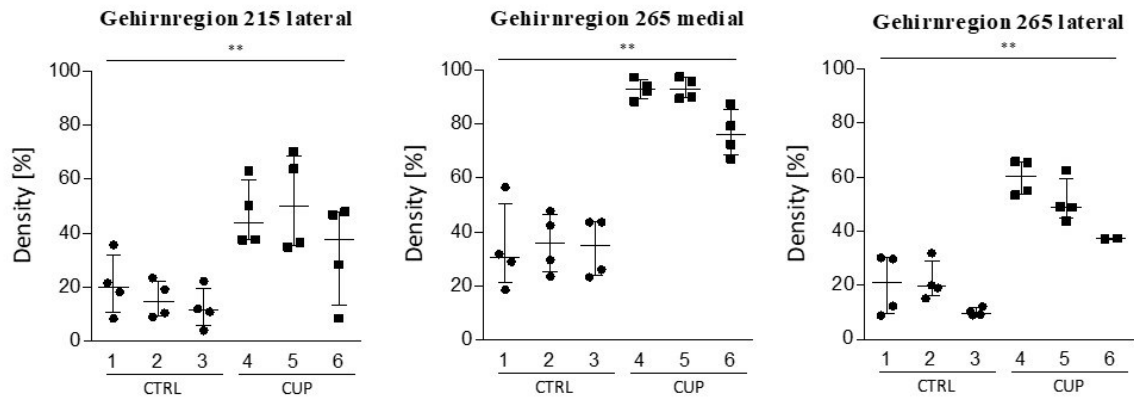


Abbildung 10: Absolute AQP4-Density in 3 Regionen des Corpus Callosum der Maus nach 5 Wochen Cuprizonebehandlung. Links: Corpus Callosum in Gehirnregion 215 lateral. **Mitte:** Corpus Callosum in Gehirnregion 265 medial. **Rechts:** Corpus Callosum in Gehirnregion 265 lateral. *Darstellung: Dot-plot, Median + IQR. Pro Versuchstier wurden 4 Kortexgebiete gemessen. Statistik: repeated measures ANOVA, n=3. ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).*

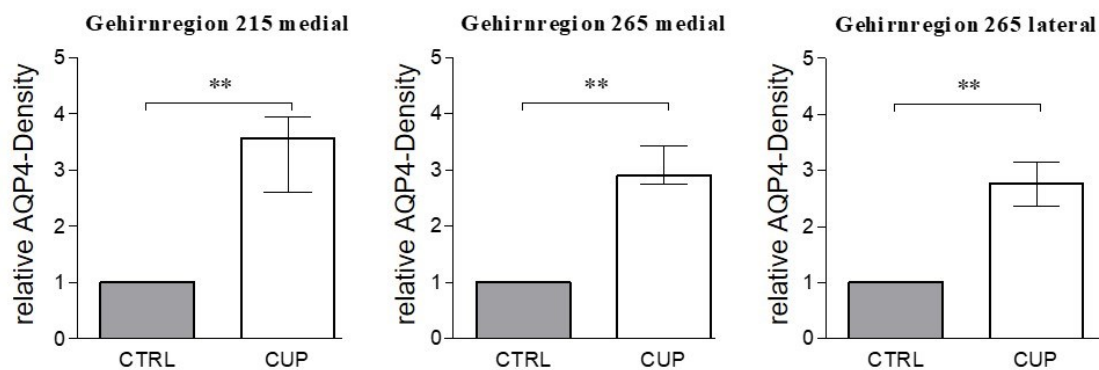


Abbildung 11: Relative AQP4-Density in 3 Regionen des Corpus Callosum der Maus nach 5 Wochen Cuprizonebehandlung. Links: Corpus Callosum in Gehirnregion 215 lateral. **Mitte:** Corpus Callosum in Gehirnregion 265 medial. **Rechts:** Corpus Callosum in Gehirnregion 265 lateral. *Darstellung: Median + IQR, auf Kontrollniveau normiert. Pro Versuchstier wurden 4 Kortexgebiete gemessen. Statistik: repeated measures ANOVA, n=3. ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).*

3.1.3 AQP4 in der weißen Substanz von humanen MS-Gehirnschnitten

Humane Gehirnschnitte wurden auf eine Veränderung der AQP4-Immunreaktivität in der weißen Substanz von chronisch aktiven MS-Läsionen im Striatum untersucht. Die Unterteilung in beide Versuchsgruppen ist aus Tabelle 40 ersichtlich. Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitte (2.2) wurden immunhistochemisch mit AQP4-Antikörper gefärbt (2.3.4). Konsekutive Schnitte wurden immunhistochemisch mit HLA-DR (LN3)- und PLP-Antikörper gefärbt. Unter dem Mikroskop wurden durch zwei Beobachter pro Schnitt jeweils 2 Bereiche mit MS-Läsionen und 2 Kontrollbereiche mit Normal Appearing White Matter markiert. Die Schnitte wurden morphologisch beurteilt. Die Patientendaten finden sich in Kapitel 2.2.

3.1.3.1 Qualitative Auswertung der AQP4-Immunreaktivität

Lichtmikroskopisch zeigte sich in der Läsionsgruppe im Gegensatz zur umliegenden *Normal Appearing White Matter* (NAWM) eine stärkere Immunreaktivität des AQP4-Antikörpers. Dieser Effekt war insbesondere in der Randzone der Läsion ausgeprägt. Abbildung 12 zeigt repräsentative Bilder.

Tabelle 40: Versuchsgruppen für 3.1.3

Gruppenname	Merkmale
LÄSION	Bereich eines Schnittes mit MS-Läsion der weißen Substanz
NAWM	Bereich des gleichen Schnittes mit Normal Appearing White Matter

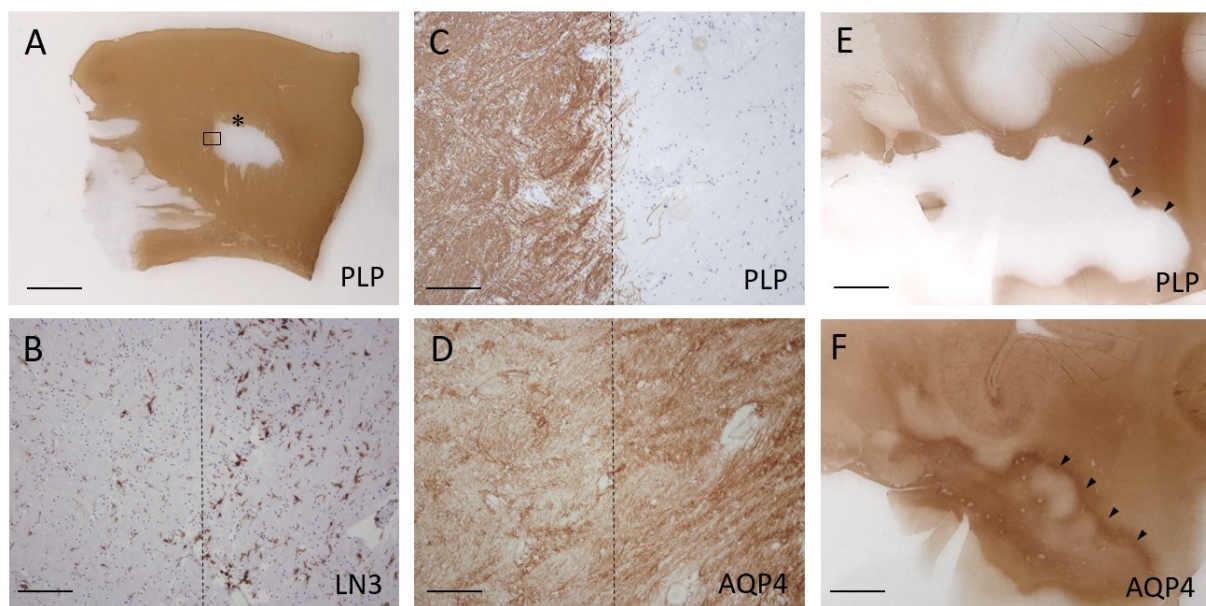


Abbildung 12: AQP4-Immunreaktivität in progressiven MS-Läsionen der weißen Substanz humaner Gehirnschnitte. (A) Repräsentative fokale, demyelinisierte Läsion (*), PLP-IHC. (B-D) Vergrößerung des Läsionsrandes (Kasten in A) konsekutiver Schnitte in LN3, PLP und AQP4-IHC. Der Läsionsrand ist als gestrichelte Linie hervorgehoben. Links: Bereich mit Normal Appearing White Matter (NAWM). Rechts: Läsion. (E-F) Weitere demyelinisierte Läsion in PLP-IHC und AQP4-IHC. Die Pfeilspitzen markieren den Rand der Läsion. Skalierung: (A, E, F) 3mm; (B-D) 180µm. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

3.1.3.2 Quantitative Auswertung der AQP4-Immunreaktivität

Zur Quantifizierung wurden die markierten Bereiche von 7 Läsionen fotografiert, es ergaben sich 4 Bereiche pro Schnitt, die mit der Funktion Area.Density (2.6.5) des Digital Histology Processors gemessen werden. Die Funktion dient dazu, die Immunreaktivität von AQP4 in der weißen Substanz zu messen. Ein hoher *density*-Wert steht für eine hohe Immunreaktivität von AQP4. Zur Auswertung wurde der Mittelwert aus den 2 Beobachtungen pro Versuchsgruppe und Schnitt gebildet. Die Kontrolle (NAWM) war im gleichen Schnitt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die *density*-Werte der Kontrolle auf 100% gesetzt und die relativen Anteile der Läsionsgruppe gebildet.

Es wurden 7 humane MS-Läsionen untersucht. Im Median zeigte sich in der Läsionsgruppe (LÄSION) ein *density*-Wert, der 366,3% des *density*-Wertes der Kontrollgruppe (NAWM) ausmacht. Statistisch zeigte der Wilcoxon-Test einen signifikanten Unterschied beider Gruppen ($p=0,031$). Demnach war die AQP4-Immunreaktivität einer humanen MS-Läsion im Median ca. 4x so groß wie die einer Kontrolle.

Tabelle 41: Absolute density von AQP4 in humanen MS-Läsionen der weißen Substanz im Vergleich zur NAWM [%]

	NAWM	LÄSION
Minimum	10,00	16,58
25% Perzentile	11,00	45,00
Median	18,00	63,00
Mittelwert (SD)	16,17 (4,69)	56,23 (21,62)
75% Perzentile	20,17	72,00
Maximum	21,00	82,00

Tabelle 42: Wilcoxon-Test

Gruppe	p-Wert
NAWM vs. LÄSION	0,031 (*)

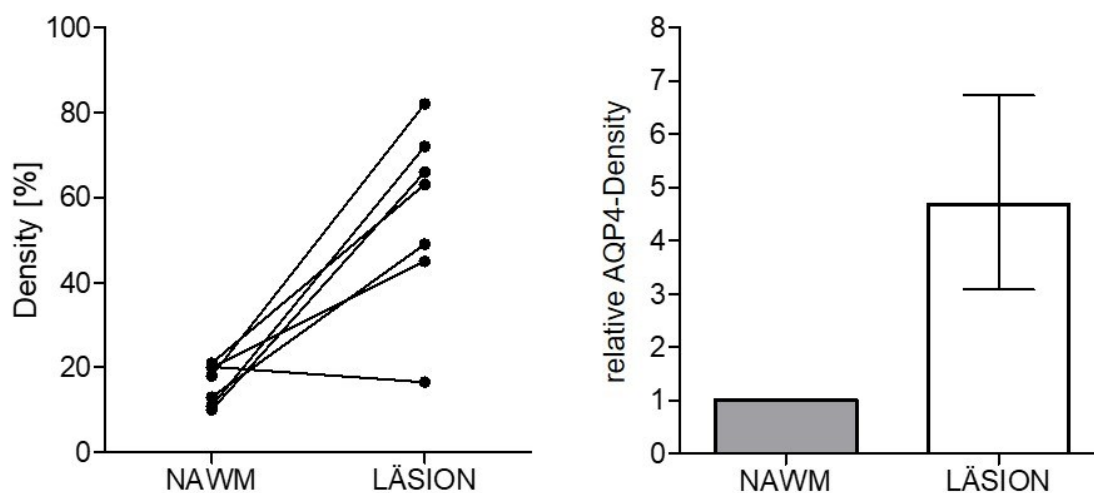


Abbildung 13: Absolute und relative density von AQP4 in humanen MS-Läsionen der weißen Substanz. Links: Gepaarte Messwerte von Normal Appearing White Matter (NAWM) und Läsion im gleichen Gehirnschnitt. Darstellung **Rechts:** Messwerte normiert auf Kontrolle in gleichem Gehirnschnitt, Median + IQR. Statistik: Wilcoxon-Test. $n=7$. ns= nicht signifikant, * = $p<0,05$. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

3.2 Perivaskuläre Infiltrate in Cup-EAE

3.2.1 Auswirkung von Cuprizone auf das Auftreten perivaskulärer Infiltrate

In diesem Versuch wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Cuprizone-Behandlungen auf das Auftreten von perivaskulären Infiltraten (PVC) in Gehirnschnitten der Maus im Cup-EAE-Modell untersucht. Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben die zelluläre Zusammensetzung des Immunezellinfiltrates in Cup-EAE im Detail untersucht. Die Untersuchungen konnten klar zeigen, dass es sich u.a. um IBA1⁺ Monozyten/Mikroglia sowie CD3⁺ Lymphozyten handelt (Scheld et al. 2016, Ruther et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde auf die erneute Differenzierung des Immunezellinfiltrates verzichtet. Die Versuchsgruppen dieses Versuchs unterschieden sich in der Zeitdauer der Cuprizone-Behandlung (siehe Tabelle 33). Die entnommenen Gehirnpräparate wurden in Formaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingebettet (2.1.6). Aus jedem Präparat wurden 3 Gehirnschnitte mit HE gefärbt (2.3.1).

3.2.1.1 Qualitative Auswertung

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch untersucht. Ein perivaskuläres Infiltrat (*perivascular cuff*, PVC) wurde als Gefäß mit umliegendem, basophilem Immunezellsaum im Virchow-Robin-Raum oder als Immunezellinvasion in das umliegende Gewebe eines Gefäßes definiert (Abbildung 14). Dabei fiel auf, dass sich in Schnitten der Gruppen CUP3-EAE und CUP3-S2-EAE mehr PVCs finden lassen, als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 43: Versuchsgruppen für 3.1

Gruppenname	Behandlung	Anzahl Versuchstiere
CUP3-S2-EAE	3 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann 2 Wochen Standardfutter, dann MOG ₃₅₋₅₅ -Immunisierung und klinisches Scoring ca. 2 Wochen	5
CUP3-EAE	3 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann MOG ₃₅₋₅₅ -Immunisierung und klinisches Scoring für ca. 2 Wochen	8
CUP1-EAE	1 Woche Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann MOG ₃₅₋₅₅ -Immunisierung und klinisches Scoring für ca. 2 Wochen	9

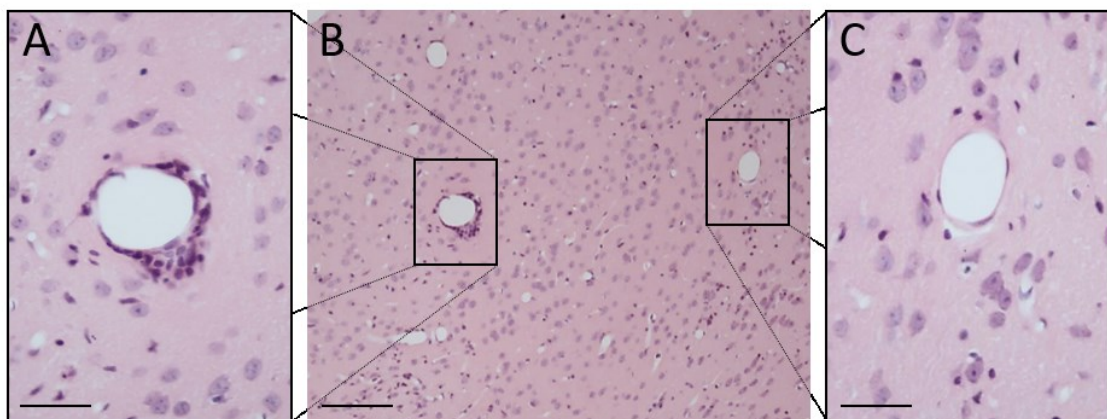


Abbildung 14: Perivaskuläre Infiltrate in Gehirnregion 215 im Cortex der Maus. (A) Vergrößerung eines perivaskulären Infiltrates (PVC). (B) Repräsentativer Bildausschnitt. (C) Vergrößerung einer postkapillären Venole ohne Inflammation. Färbung: HE. Skalierung: (A, C) 30µm (B) 90µm.

3.2.1.2 Quantitative Auswertung

Zur Quantifizierung wurden im Mikroskop PVCs durch 2 unabhängige Beobachter diagnostiziert, gezählt und die Werte anschließend gemittelt (Mittelwert). Die Schnitte wurden vor der Auswertung verblindet. Abbildung 15 und Tabelle 32 zeigen die Messwerte. Statistisch wurden jeweils 2 Gruppen untereinander mit dem Mann-Whitney-U-Test getestet.

Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der PVCs zwischen Cup-EAE Versuchstieren einer 3-wöchigen Cuprizonefütterung (CUP3-EAE) und einer 3-wöchigen Cuprizonefütterung mit anschließender 2-wöchiger Standardfütterung (CUP3-S2-EAE). Sowohl Cup-EAE Versuchstiere nach einer 3-wöchigen Cuprizonefütterung (CUP3-EAE) als auch nach einer 3-wöchigen Cuprizonefütterung mit anschließender 2-wöchiger Standardfütterung (CUP3-S2-EAE) zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,0176$ bzw. $p = 0,0187$) in der Anzahl der PVCs gegenüber den Versuchstieren einer 1-wöchigen Cuprizonefütterung (CUP1-EAE).

Tabelle 44: Anzahl der PVCs in Gehirnregion 215 der Maus in Abhängigkeit von der Cuprizone-Behandlungsdauer

	CUP1-EAE	CUP3-EAE	CUP3-S2-EAE
Minimum	0	2	3
25% Perzentile	0	6,25	5,5
Median	1	8	11
Mittelwert (SD)	3 (3,64)	7,75 (3,012)	11 (6,964)
75% Perzentile	7	9,75	16,5
Maximum	9	12	22

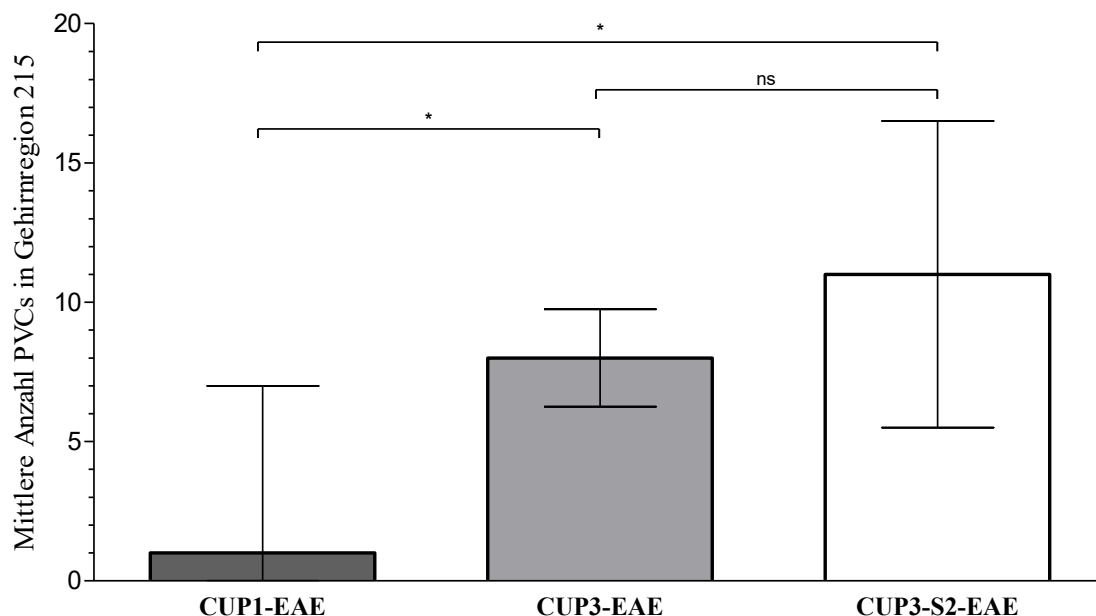


Abbildung 15: Mittlere Anzahl von PVCs in Gehirnregion 215 der Maus in Abhängigkeit von der Cuprizone-Behandlungsdauer. Versuchsgruppen: CUP3-S2-EAE = 3 Wochen Cuprizone, 2 Wochen Standardfutter, EAE-Induktion ($n=5$). CUP3-EAE = 3 Wochen Cuprizone, EAE Induktion ($n=8$). CUP1-EAE = 1 Woche Cuprizone, EAE Induktion ($n=9$). Darstellung: Median + IQR. Statistik: Mann-Whitney-U-Test. ns = nicht signifikant, $*=p<0,05$. Modifiziert nach Chrzanowski et al. (2019).

3.2.2 Einfluss perivaskulärer Infiltrate auf Astrozyten und AQP4

In diesem Versuch wurde die Verteilung von GFAP und AQP4 in Immunfluoreszenz-Färbungen in der unmittelbaren Umgebung inflammatorischer postkapillärer Venolen in Gehirnregion 215 nach Sidman untersucht. Es wurde untersucht, ob die Inflammation einen Einfluss auf die Immunreaktivität von GFAP und AQP4 hat. Die Behandlung der Versuchstiere ist in Tabelle 45 beschrieben. Die Gehirnpräparate wurden in Formaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingebettet (2.1.6). Pro Versuchstier wurden jeweils 3 Schnitte aus Gehirnregion 215 mit HE oder LFP-PAS gefärbt (2.3.1). Am Lichtmikroskop wurden Schnitte mit stark ausgeprägten PVCs ausgewählt. Konsekutive Schnitte der gleichen Schnittserie wurden für die weitere Behandlung ausgewählt. Diese Schnitte wurden in einer Immunfluoreszenz-Färbung mit DAPI, AQP4-Antikörper und GFAP-Antikörper gefärbt (2.3.4).

Die postkapillären Venolen in den Schnitten wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Diese unterschieden sich in der Ausprägung der Inflammation bzw. Infiltration mit Leukozyten (siehe dazu auch Kapitel 3.2.1). Auf Basis der Beobachtungen wurden Kriterien definiert, mit denen die inflammatorische postkapillären Venolen in 3 Gruppen unterteilt werden können (Tabelle 46). Die Zellkerne des Infiltrates wurden mit DAPI angefärbt. Bei qualitativer Betrachtung der Färbungen fiel auf, dass in den Schnitten der Gruppe mit auf den Virchow-Robin-Raum limitierter Immunezellinvasion (PVC-) eine perivaskuläre Astrozytose vorhanden war. Diese ging mit der Ausdehnung der Immunezellinvasion in das umliegende Gewebe verloren, wie in der Gruppe PVC+ ersichtlich. In den meisten untersuchten Gehirnschnitten kamen alle 3 Typen mehrfach vor. Repräsentative Bilder finden sich in Abbildung 16.

Zur Quantifizierung wurden ausgewählte postkapilläre Venolen der Schnitte in die 3 Gruppen eingeteilt und am Fluoreszenzmikroskop fotografiert (2.5). Zur Analyse wurde die Funktion Focal.Concentric.Density (2.6.6) des Digital Histology Processors verwendet. Die Funktion dient als Modell für die Abhängigkeit der Stärke einer Immunfluoreszenz-Färbung auf die Distanz zu einer Venole. Die Messwerte des einfachen Abstandes (Ring 1) repräsentieren die proximale Umgebung der postkapillären Venole. Die Messwerte des fünffachen Abstandes (Ring 5) repräsentieren die distale Umgebung. Alle Messwerte beziehen sich anteilig auf den Messwert in der distalen Umgebung (Ring 5), dieser wurde auf 1,00 (100%) normiert. Es wurden die postkapillären Venolen der 3 zuvor definierten Gruppen miteinander verglichen.

Tabelle 45: Versuchstiere für 3.4

Gruppenname	Behandlung	Anzahl Versuchstiere
CUP3-S2-EAE	3 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann 2 Wochen Standardfutter, dann Immunisierung mit MOG ₃₅₋₅₅ und klinisches Scoring ca. 2 Wochen	15

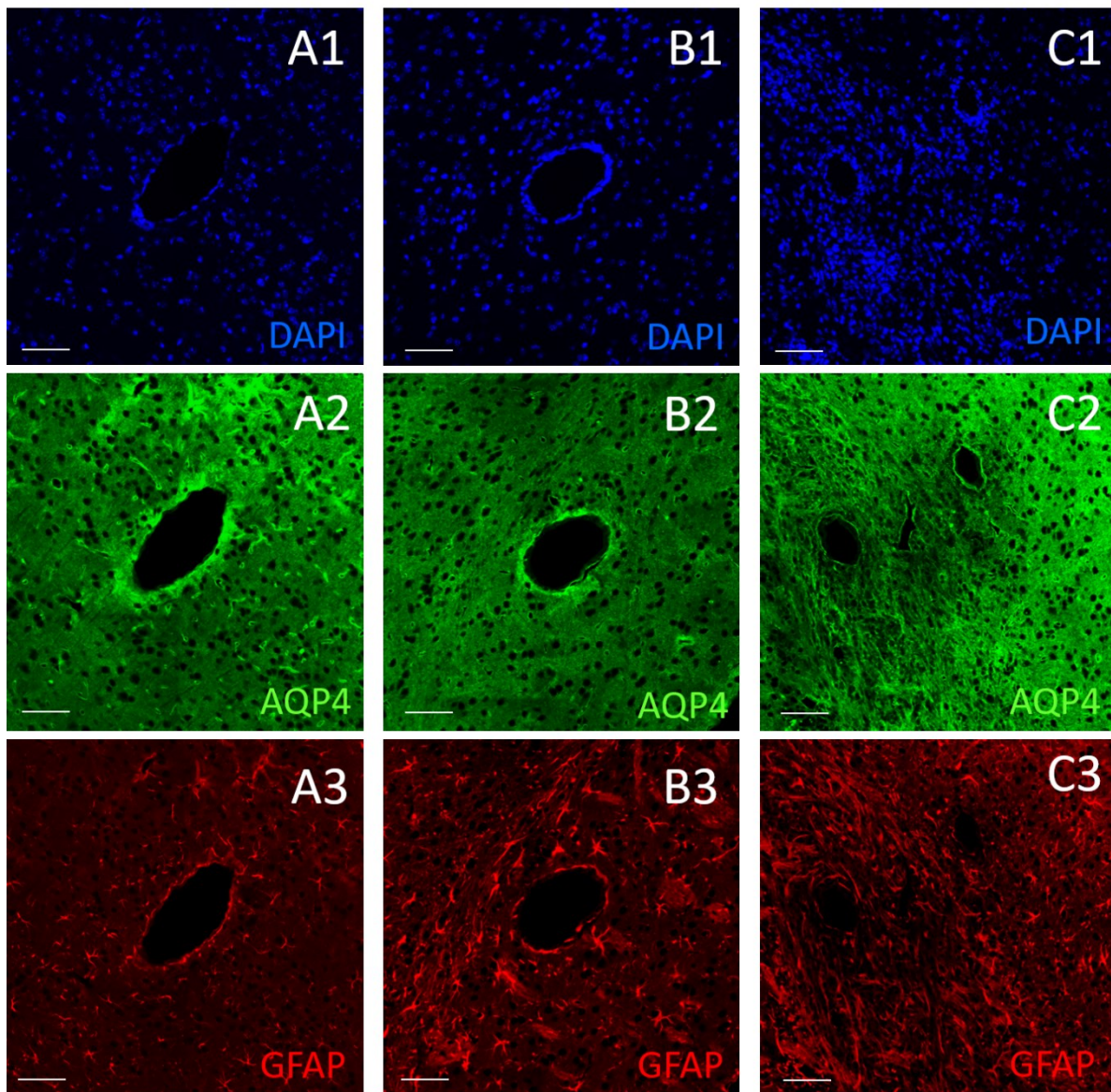


Abbildung 16: Einfluss perivaskulärer Infiltrate auf die Umgebung postkapillärer Venolen. Normal erscheinende Venolen in (A1) DAPI-Immunfluoreszenz-Färbung (DAPI-IF), (A2) AQP4-IF. (A3) GFAP-IF. (B1-3) Auf den Virchow-Robin-Raum limitierte Immuneinvasion (Versuchsgruppe PVC-) in DAPI-IF, AQP4-IF und GFAP-IF. (C1-3) Infiltrative Immuneinvasion (Versuchsgruppe PVC+) in DAPI-IF, AQP4-IF und GFAP-IF. Skalierung 30µm. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

Tabelle 46: Unterscheidungskriterien für postkapilläre Venolen

Kategorie	Eigenschaften
CTRL	<u>Normal erscheinende Venolen.</u> Keine runden DAPI+ Zellkerne erkennbar, stattdessen nur abgeflachte Endothelzellkerne erkennbar. Sehr stark angefarbter AQP4 und GFAP-Saum perivaskulär, kein verbreiteter Virchow-Robin-Raum.
PVC-	<u>Auf den Virchow-Robin-Raum limitierte Immuneinvasion.</u> Immuneinvasion mit vielen runden, DAPI+ angefarbten Kernen, scharfe Begrenzung. Weitgehend durchgehender, scharfer AQP4-Rand um das Gefäß. Verbreiteter Virchow-Robin-Raum, dieser ist mit DAPI+ Zellkernen gefüllt.
PVC+	<u>Infiltrative Immuneinvasion in umliegendes Gewebe.</u> Viele runde, DAPI+ Zellen um das Gefäß verteilt, keine scharfe Begrenzung, großräumige Invasion in das umliegende Gewebe. Lücken im AQP4 und GFAP-Saum um das Gefäß, DAPI+ Zellkerne werden durch diesen nicht eingeschlossen.

3.2.2.1 *AQP4 an inflammatorischen postkapillären Venolen*

Proximal an der Venole ließ sich im Median eine relative AQP4-*density* von 1,55 für die Gruppe CTRL, 1,11 für PVC- und 0,69 für PVC+ messen. Dieser Unterschied verkleinerte sich bei zunehmendem Abstand von der Venole (Ring 2-5). Die Kurve von Versuchsgruppe PVC+ zeigte proximal (Ring 1–2) deutlich niedrigere Werte (0,69 bzw. 0,8) als die anderen beiden Gruppen. Die Messwerte finden sich in Tabelle 47 und Abbildung 17.

Im Abstand von Ring 1 und 2 wurden die Gruppen statistisch miteinander verglichen. Dazu wurden alle Gruppen zunächst mit dem Kruskal-Wallis Test getestet. Im Anschluss wurden jeweils zwei Gruppen mit Dunn's post-hoc Test verglichen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in der relativen AQP4-*density* sowohl zwischen den PVC- Venolen und den CTRL Venolen ($p < 0,001$), als auch zwischen den PVC+ Venolen und den CTRL Venolen ($p < 0,001$). In Ring 2 ergab sich ein signifikanter Unterschied in der relativen AQP4-*density* sowohl zwischen den PVC+ Venolen und den PVC- Venolen ($p < 0,001$), als auch zwischen den PVC+ Venolen und den CTRL Venolen ($p < 0,05$).

Tabelle 47: Relative AQP4-density an postkapillären Venolen in Bezug auf deren Umgebung (Median)

Gruppenname	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5
CTRL	1,550	1,023	0,915	0,962	1,000
PVC-	1,114	1,032	1,009	0,997	1,000
PVC+	0,694	0,798	0,951	0,968	1,000

Tabelle 48: Statistische Berechnungen der relativen AQP4-density an postkapillären Venolen in Bezug auf deren Umgebung

	Versuchsgruppen	Test	p-Wert
Ring 1	alle	Kruskal-Wallis	$p < 0,0001$ (****)
	CTRL vs. PVC-	Dunn's post-hoc test	ns
	CTRL vs. PVC+	Dunn's post-hoc test	$p < 0,001$ (***)
	PVC- vs. PVC+	Dunn's post-hoc test	$p < 0,001$ (***)
Ring 2	alle	Kruskal-Wallis	$p = 0,0009$ (***)
	CTRL vs. PVC-	Dunn's post-hoc test	ns
	CTRL vs. PVC+	Dunn's post-hoc test	$p < 0,05$ (*)
	PVC- vs. PVC+	Dunn's post-hoc test	$p < 0,01$ (**)

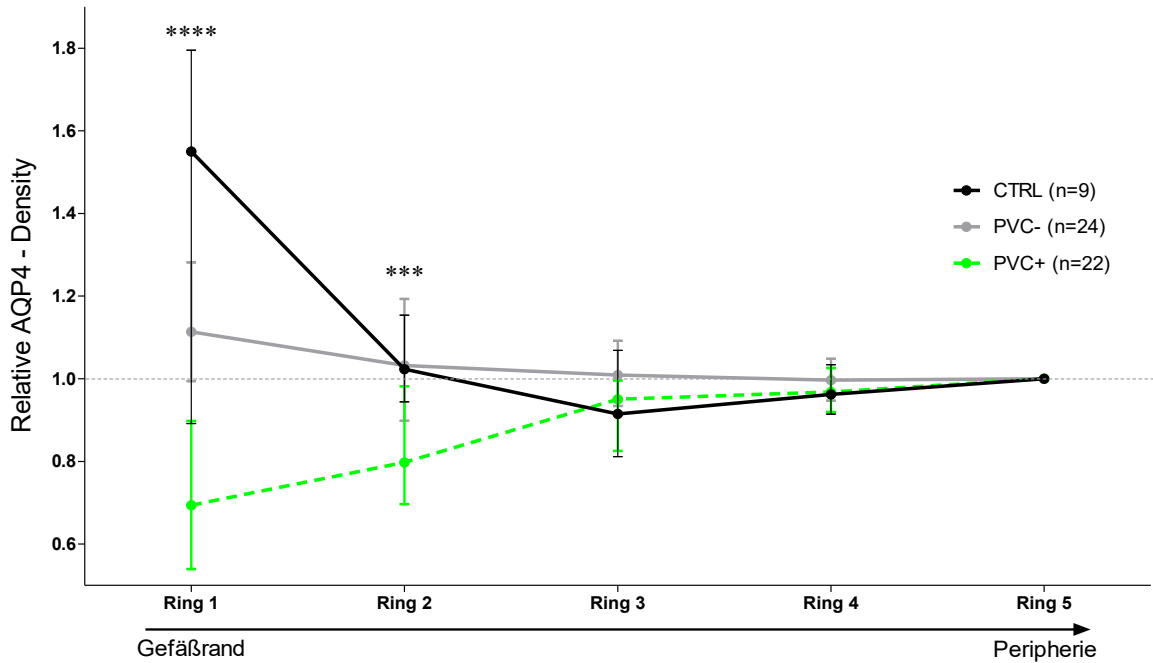


Abbildung 17: Relative AQP4-density an postkapillären Venolen in Bezug auf deren Umgebung. Ring 1 repräsentiert die proximale Umgebung der Venole, Ring 5 repräsentiert die Peripherie. Die Ringgröße ist proportional zur Größe der Venole (vgl. Kapitel 2.6.6). Die density von Ring 5 wurde auf 1,00 normiert, die Werte von Ring 1–4 stellen die relativen Anteile dar. *Darstellung: Median + IQR. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).*

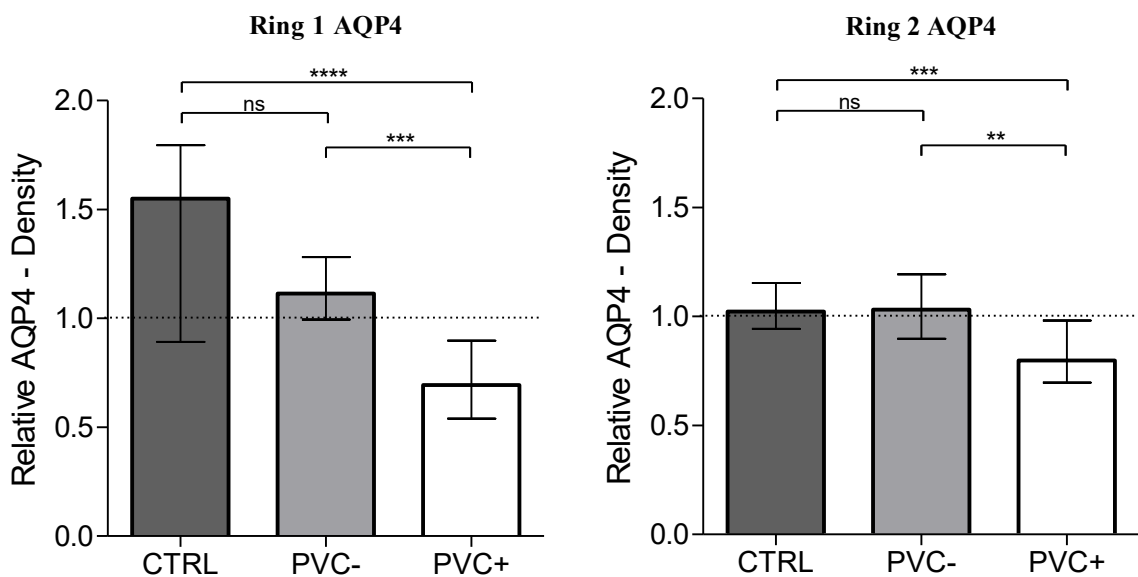


Abbildung 18: Statistische Testung der relativen AQP4-density an postkapillären Venolen in Bezug auf deren Umgebung. Links: Versuchsgruppen in Ring 1. **Rechts:** Versuchsgruppen in Ring 2. *Darstellung: Median + IQR. Statistik: Mann-Whitney-U Test. ns = nicht signifikant, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$. CTRL $n = 9$, PVC- $n = 24$, PVC+ $n = 22$. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).*

3.2.2.2 *GFAP an inflammatorischen postkapillären Venolen*

Venolen der Gruppe PVC- zeigten in der proximalen Umgebung der Venole (Ring 1) im Median eine relative GFAP-density von 1,7. In der Gruppe CTRL wurde im Median ein Wert von 1,096 gemessen, in der Gruppe PVC+ 0,926. Im Bereich von Ring 2–3 glichen sich die Werte von CTRL und PVC- zum Wert 1,0 an, PVC+ blieb mit 0,901 bzw. 0,879 darunter. Die Messwerte beziehen sich anteilig auf den Messwert in der distalen Umgebung der Venole (Ring 5), dieser wurde auf 1,00 (100%) gesetzt. Die Messwerte finden sich in Tabelle 49.

Im Abstand von Ring 1 und 2 wurden die Gruppen statistisch verglichen. Dazu wurden die Gruppen zunächst mit dem Kruskal-Wallis Test auf Unterschiede getestet. Im Anschluss wurden jeweils zwei Gruppen mit Dunn's post-hoc test verglichen. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied sowohl zwischen den CTRL Venolen und den PVC- Venolen als auch zwischen den PVC+ Venolen und den CTRL Venolen. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der relativen GFAP-density zwischen den PVC+ Venolen und den PVC- Venolen ($p < 0,05$).

Tabelle 49: Relative GFAP-density an postkapillären Venolen in Bezug auf deren Umgebung (Median)

Gruppenname	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5
CTRL	1,096	1,037	1,046	0,977	1,000
PVC-	1,652	1,011	1,013	0,995	1,000
PVC+	0,926	0,901	0,879	0,998	1,000

Tabelle 50: Statistische Berechnungen der relativen GFAP-density an postkapillären Venolen in Bezug auf deren Umgebung

	Versuchsgruppen	Test	p-Wert
Ring 1	alle	Kruskal-Wallis	$p = 0,0344$ (*)
	CTRL vs. PVC-	Dunn's post-hoc test	ns
	CTRL vs. PVC+	Dunn's post-hoc test	ns
	PVC- vs. PVC+	Dunn's post-hoc test	$p < 0,01$ (*)
Ring 2	alle	Kruskal-Wallis	ns
	CTRL vs. PVC-	Dunn's post-hoc test	ns
	CTRL vs. PVC+	Dunn's post-hoc test	ns
	PVC- vs. PVC+	Dunn's post-hoc test	ns

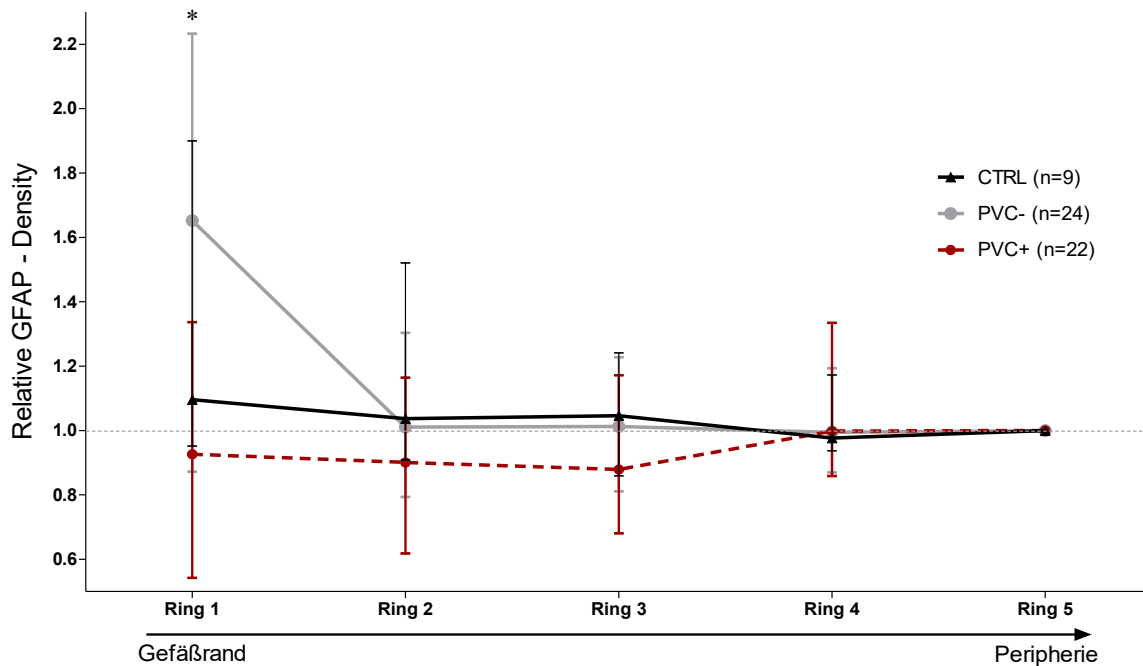


Abbildung 19: Relative GFAP-density an postkapillären Venolen in Bezug auf deren Umgebung. Ring 1 repräsentiert die proximale Umgebung der Venole, Ring 5 repräsentiert die Peripherie. Die Ringgröße ist proportional zur Größe der Venole (vgl. Kapitel 2.6.6). Die density von Ring 5 wurde auf 1,00 normiert, die Werte von Ring 1–4 stellen die relativen Anteile dar. *Darstellung: Median + IQR. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).*

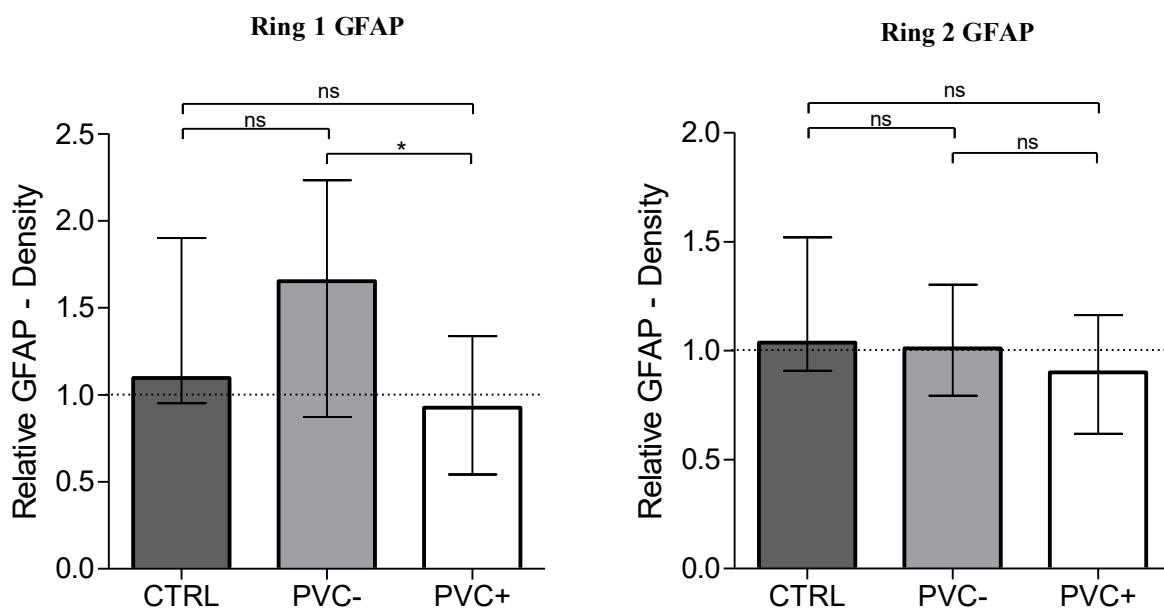


Abbildung 20: Statistische Berechnungen der relativen GFAP-density an postkapillären Venolen in Bezug auf deren Umgebung. Links: Versuchsgruppen in Ring 1. Rechts: Versuchsgruppen in Ring 2. *Darstellung: Median + IQR. Statistik: Mann-Whitney-U Test. ns= nicht signifikant, * = $p < 0,05$. CTRL $n=9$, PVC- $n=24$, PVC+ $n=22$. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).*

3.3 Vergleichende Untersuchungen zu Aspekten der NMO

3.3.1 Anti-AQP4 Antikörper im Blutserums von Versuchstieren

In diesem Versuch wurde das Blutserum von Versuchstieren mit unterschiedlicher Behandlung auf das Vorhandensein von Anti-AQP4 Antikörpern untersucht. Den Versuchstieren wurde nach dem Behandlungszeitraum venöses Blut entnommen (2.1.5.2). Dieses wurde zentrifugiert und mit einem Anti-AQP4-ELISA untersucht und ausgewertet (2.4). Alle Messwerte wurden in Doppelbestimmung gemessen und gemittelt (Mittelwert). Die Versuchsgruppen werden in Kapitel 2.1.7 beschrieben. Während der EAE-Behandlung wurden die entsprechenden Versuchstiere klinisch nach einem *score* bewertet (2.1.3, 2.1.4). Der finale klinische *score* am Tag 14 nach Immunisierung (Abbildung 21) und somit zum Zeitpunkt der Blutentnahme betrug im Median 3,0 (S5-EAE) bzw. 3,5 (CUP3-S2-EAE).

Beide MOG₃₃₋₅₅- immunisierten Gruppen entwickelten im Behandlungszeitraum eine klinisch messbare EAE. Die Bestimmung der Aktivität des Antikörpers aus der optischen Dichte (OD) erfolgte mit einer Standardgeraden (Abbildung 22). Um den Testdurchlauf auf Validität zu prüfen, wurde die Antikörperkonzentration humaner Kontrollsera mitbestimmt und mit den vom Hersteller angegebenen Zielwerten verglichen (Abbildung 23). Die Negativkontrolle ergab eine Aktivität von -0,36 U/ml (Zielbereich 0 U/ml). Die Positivkontrolle 1 lag mit 7,60 U/ml knapp unter dem Zielbereich (Zielwert 12 U/ml, Zielbereich 8-16 U/ml). Die Positivkontrolle 2 lag mit 25,59 U/ml im Zielbereich (Zielwert 29 U/ml, Zielbereich 21-37 U/ml). Entsprechend wurde der Testdurchlauf als valide angesehen. Die Nachweisgrenze liegt laut Hersteller bei 0,17 U/ml.

Der zusätzlich getestete, rekombinant hergestellte Anti-AQP4-Antikörper (vgl. Kapitel 2.3.4) färbt immunhistochemisch AQP4 muriner Gehirnschnitte. Dieser Antikörper konnte mit einer Aktivität von 45,34 U/ml nachgewiesen werden (Abbildung 19, rechts). Die Messwerte der Proben finden sich in Abbildung 20 und Tabelle 52. Im Median ergab sich für die Kontrollgruppe (CTRL) eine Aktivität von -0,21 U/ml; in der Cuprizonegruppe (CUP3-S2) -0,33 U/ml; in der EAE-Gruppe (S5-EAE) -0,82U/ml und in der Cuprizone-EAE-Gruppe (CUP3-S2-EAE) -0,36 U/ml. Die Versuchsgruppen wurden statistisch mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Unterschiede überprüft. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Gruppen ($p = 0,6839$).

Tabelle 51: Versuchsgruppen für 3.5

Gruppenname	Behandlung	Anzahl Versuchstiere
CTRL	5 Wochen Standardfutter	5
CUP3-S2	3 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann 2 Wochen Standardfutter	5
S5-EAE	5 Wochen Standardfutter, dann MOG ₃₅₋₅₅ - Immunisierung und klinisches Scoring ca. 2 Wochen	10
CUP3-S2-EAE	3 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann 2 Wochen Standardfutter, dann MOG ₃₅₋₅₅ - Immunisierung und klinisches Scoring ca. 2 Wochen	10

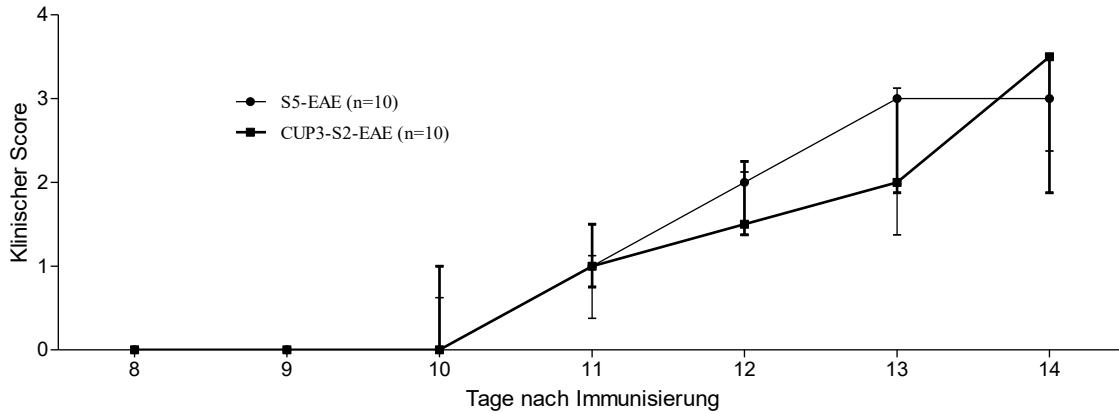


Abbildung 21: Klinisches Scoring der Versuchsgruppen S5-EAE und CUP3-S2-EAE. Scoring entsprechend Kapitel 2.1.3. Darstellung: Median + IQR.

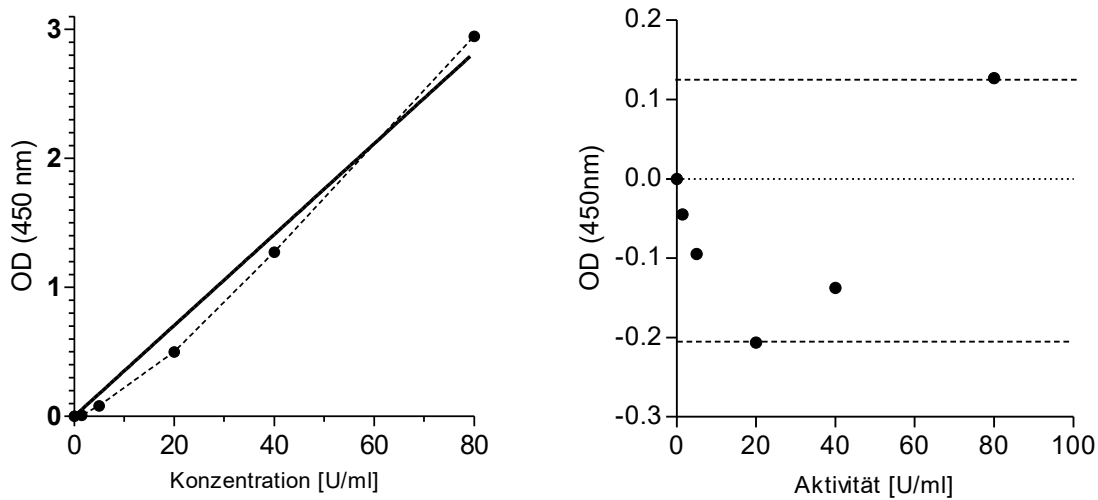


Abbildung 22: Umrechnung der optischen Dichte (OD) in eine Konzentration [U/ml]. Links: Standardgerade nach Lambert-Beer (lineare Regression). Rechts: Residuen der Regression. Darstellung: Dot-plot

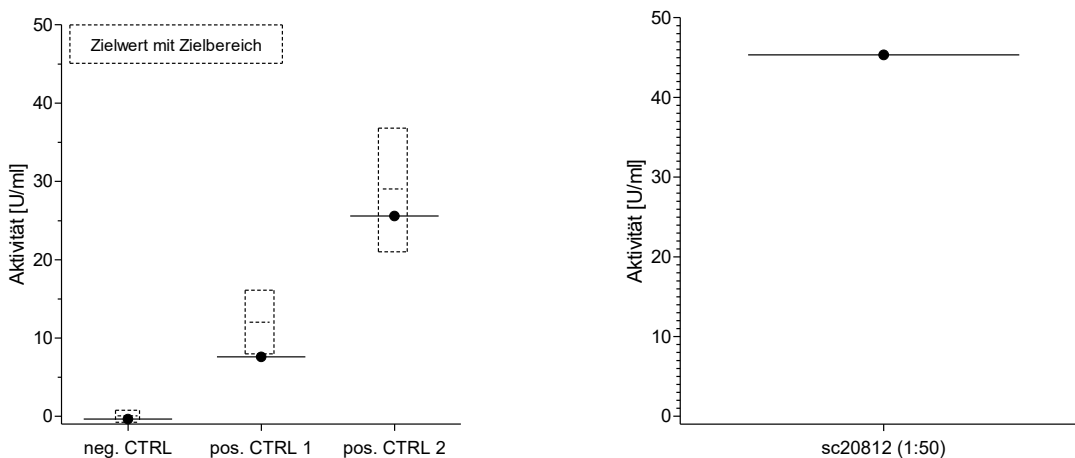


Abbildung 23: Anti-AQP4-Ab ELISA Ergebnisse für humane Kontrollsera und rekombinanten Anti-AQP4-Ak. Links: Kontrollen mit humanem Blutserum, Zielwerte und Zielbereich des Herstellers (gestrichelte Kästen). Rechts: Aktivität des rekombinanten Anti-AQP4-Ak sc20812.

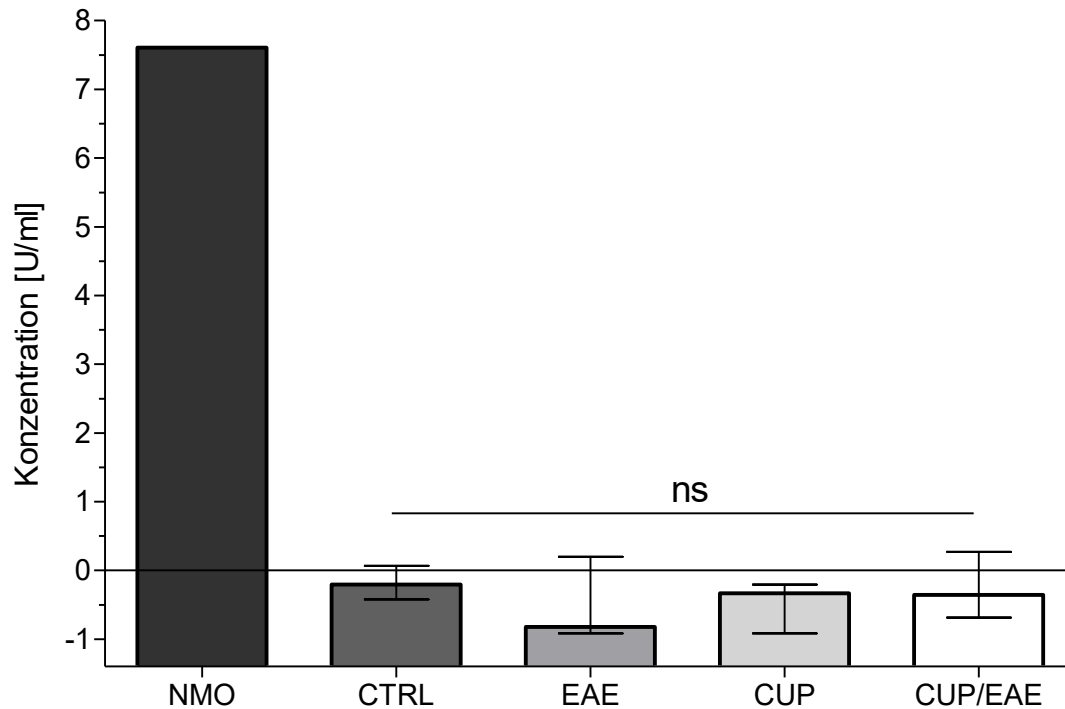


Abbildung 24: Absolute Anti-AQP4-Antikörper Konzentration in den Versuchsgruppen. Bestimmung der Konzentrationen mittels ELISA. Darstellung: Alle Messwerte, Median + IQR. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. *Ns* = nicht signifikant. NMO = humanes NMO-Kontrollserum. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

Tabelle 52: Absolute Anti-AQP4-Ab Konzentration in den Versuchsgruppen [U/ml]

	CTRL	CUP3-S2	S5-EAE	CUP3-S2-EAE
Minimum	-0,6017	-1,0730	-1,1920	-1,0100
25% Perzentile	-0,4229	-0,9160	-0,9153	-0,6875
Median	-0,2058	-0,3320	-0,8216	-0,3576
Mittelwert (SD)	-0,1839 (0,3237)	-0,5145 (0,39)	-0,4686 (0,79)	-0,2300 (0,58)
75% Perzentile	0,0659	-0,2043	0,1997	0,2685
Maximum	0,3065	-0,1987	1,0490	0,8514

3.3.2 Neutrophile Granulozyten im Cup-EAE Modell

In diesem Versuch wurden Gehirnschnitte von Versuchstieren auf eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten untersucht. Die Versuchsgruppen sind in Tabelle 53 beschrieben. Es wurden Schnitte aus Gehirnregion 215 der Behandlungsgruppe mit HE oder LFP-PAS gefärbt (2.3.1), um am Lichtmikroskop Schnitte mit stark ausgeprägten PVCs auszuwählen. Konsekutive Schnitte und Kontrollschnitte wurden mit einer enzymatischen Färbung für neutrophile Granulozyten gefärbt (2.3.6).

3.3.2.1 Qualitative Auswertung

Im Lichtmikroskop ließ sich in den Cup-EAE-Schnitten eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten feststellen. Diese war besonders im Bereich des Fornix und an PVCs stark ausgeprägt. Darüber hinaus fanden sich neutrophile Granulozyten im Corpus Callosum, der Comissura anterior und geringfügig auch im Cortex. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 25 dargestellt. In den Kontrollschnitten war keine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten erkennbar.

Tabelle 53: Versuchsgruppen für 3.3.2

Gruppenname	Behandlung	Anzahl Versuchstiere
CTRL	5 Wochen Standardfutter	5
CUP3-S2-EAE	3 Wochen Fütterung mit 0,25% Cuprizone, dann 2 Wochen Standardfutter, dann MOG ₃₅₋₅₅ -Immunisierung und klinisches Scoring ca. 2 Wochen	7

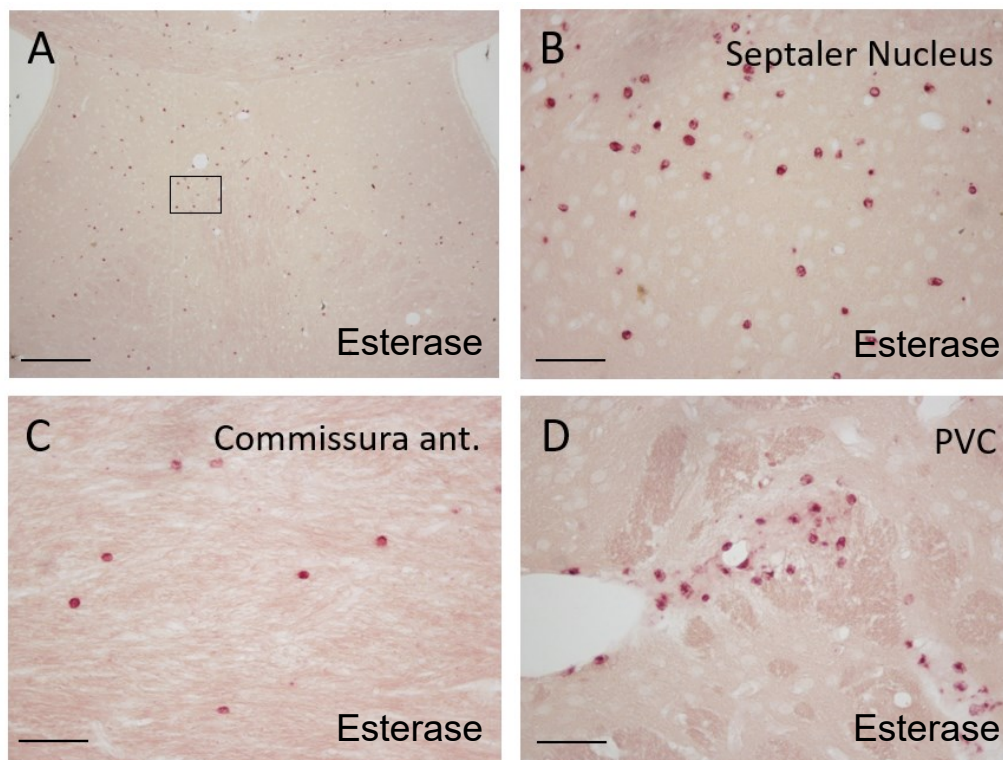


Abbildung 25: Neutrophile Granulozyten in Gehirnregion 215 der Maus im CUP-EAE Modell. (A) Septaler Nucleus und Corpus Callosum in der Übersicht. (B-D) Infiltration von Granulozyten im Parenchym des Sept. Nucleus (B), in der Comissura anterior (C) und perivaskulär (D). Färbung: Naphthol AS-D-Esterase-Färbung für neutrophile Granulozyten, Skalen: (A) 450µm, (B-D) 45µm. Modifiziert nach Ruther et al. (2017).

3.3.2.2 *Quantitative Auswertung*

Zur Quantifizierung wurde der Bereich des septalen Nucleus in einem Schnitt pro Versuchstier (n=7) fotografiert. Es wurde die Gehirnregion 215 nach Sidman untersucht. Die Anzahl von Granulozyten in einer definierten ROI wurde gezählt und dessen *area* gemessen (2.6.3.3). Daraus wurde die Anzahl der Granulozyten pro mm² berechnet.

Im Median fanden sich in der Behandlungsgruppe (CUP3-S2-EAE) 112 Granulozyten pro mm². Dabei fiel auf, dass die Granulozyteninfiltration eine große Variabilität aufweist. In 3 Schnitten fanden sich eine vergleichsweise hohe Granulozytendichte, in den anderen 4 eine deutlich geringere.

Tabelle 54: Absolute Granulozytendichte im septalen Nucleus der Gehirnregion 215 von Versuchstieren im Cup-EAE Modell [Granulozyten/mm²]

	CUP3-S2-EAE
Minimum	30,7
25% Perzentile	57,0
Median	122,2
Mittelwert (SD)	182,3 (134,4)
75% Perzentile	316,4
Maximum	354,5

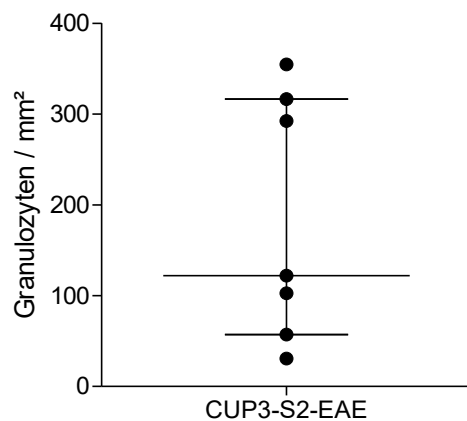


Abbildung 26: Absolute Granulozytendichte im septalen Nucleus von Versuchstieren im Cup-EAE Modell. Darstellung: Median + IQR. Modifiziert nach Ruther et al. (2017).

3.4 Grafische Synopsis der Ergebnisse

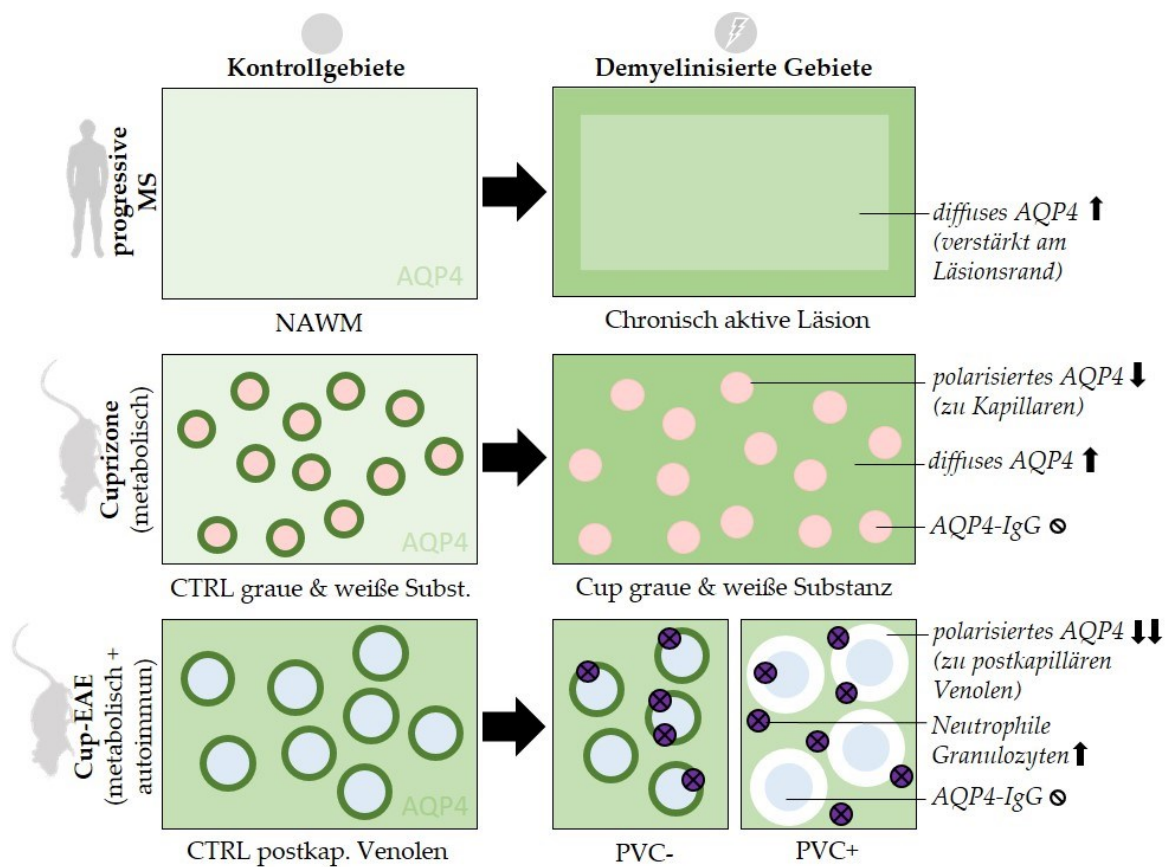


Abbildung 27: Synopsis der Ergebnisse. Verhalten von AQP4 in Kontrollgebieten (links) und demyelinisierten Gebieten (rechts). Es werden 3 experimentelle Situationen gezeigt. **Oben:** Vergleich der Expression von AQP4 in NAWM und aktiven Läsionen von Patienten mit progressiver MS. **Mitte:** Vergleich der AQP4-Expression im Gehirnparenchym und der AQP4-Polarisation an Kapillaren in Kontrolltieren und Versuchstieren nach Cuprizone-Behandlung. **Unten:** Vergleich von postkapillären Venolen mit unterschiedlich fortgeschrittener Immuneinvasion (CTRL = normal erscheinende Venolen; PVC- = Auf den Virchow-Robin-Raum limitierte Immuneinvasion; PVC+ = Infiltrative Immuneinvasion in umliegendes Gewebe). *Abkürzungen:* \emptyset = nicht vorhanden, \uparrow = verstärkt, \downarrow = vermindert, CTRL = Kontrolle, Cup = Cuprizone, NAWM = normal appearing white matter, rote Kreise = Kapillaren, Blaue Kreise = Postkapillare Venolen, PVC = perivascular cuff. Modifiziert nach Rohr et al. (2020).

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Charakterisierung von AQP4 in der Pathogenese der MS

Astrozyten sind wichtige Regulatoren in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Neuropils. Sowohl in der MS als auch der NMO spielt astrozytäres AQP4 eine vielfältige Rolle in der Pathogenese (Papadopoulos und Verkman 2012, Brosnan und Raine 2013, Ponath et al. 2018). Im nachfolgenden Abschnitt werden das Vorgehen und die Ergebnisse unserer Untersuchungen von AQP4 und Astrozyten im neuroinflammatorischen Kontext diskutiert.

4.1.1.1 Vorgehen zur Untersuchung von AQP4 in generalisierten und fokalen Vorderhirnläsionen

Voruntersuchungen

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Expression und Verteilung von AQP4 bei einer Behandlung von primären Astrozytenkulturen mit $\text{INF}\gamma$ verändert. Die Behandlung diente der Simulation einer pro-inflammatorischen Umgebung. Es wurde eine immunzytochemische Färbung mit Fluoreszenzfärbung von AQP4 und GFAP durchgeführt. Bereits im Modell der Astrozytenzellkultur konnten wir qualitativ eine stärkere Immunreaktivität von AQP4 feststellen. Wir konnten die Tendenz zu einem Rückgang der Verteilung von AQP4 aus den astrozytären Fußfortsätzen feststellen (Daten hier nicht gezeigt). Um den Effekt weiter zu untersuchen, wurden parallel in unserer Arbeitsgruppe mRNA-Genexpressionsanalysen für AQP4 durchgeführt. Auch diese Ergebnisse deuten auf eine Expressionssteigerung von AQP4 im pro-inflammatorischen Kontext hin.

Untersuchung generalisierter Astrozytopathie im Cuprizone-Modell

Es ist bekannt, dass die Cuprizone-vermittelte Demyelinisierung mit einer intensiven Aktivierung von Astrozyten einhergeht (Skrjupuletz et al. 2013). Das Cuprizone-Modell ist geeignet, um frühe Stadien der chronisch-progredienten Aspekte der MS in Bezug auf das intrinsische Immunsystem zu untersuchen (Barnett und Prineas 2004). Insbesondere können Folgen der De- und späteren Remyelinisierung untersucht werden (Torkildsen et al. 2008). Eine Rekrutierung von peripheren Immunzellen, insbesondere von Lymphozyten, ist nicht charakteristisch für das Cuprizone-Modell (McMahon et al. 2002, Kipp et al. 2009). Neben einer moderaten Intensitätssteigerung von AQP4 in der grauen Substanz des Cortex konnte nach Cuprizonebehandlung eine signifikante, dreifache Intensitätssteigerung von AQP4 in der weißen Substanz nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Wir konnten zeigen, dass die kapillarbezogene Polarisation von AQP4 in der grauen Substanz signifikant vermindert ist ($p < 0,05$). Den Effekt des Polarisationsverlustes der grauen Substanz konnten wir in der weißen Substanz aufgrund der Überlagerung der zugleich stattfindenden Expressionssteigerung von AQP4 nicht untersuchen. Der oft untersuchte und zum AQP4 verwandte Wasserkanal Aquaporin 1 (AQP1) wird im Mausgehirn nicht exprimiert (Misu et al. 2013). Daher konnte AQP1 nicht mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Es ist anzumerken, dass die Anzahl der untersuchten Versuchstiere vergleichsweise gering war. Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, entschieden wir uns, mehrere Schnitte pro Versuchstier in zwei verschiedenen Gehirnregionen auszuwerten. Die damit entstehenden wiederholten Messungen wurden im *repeated measures* Design der statistischen Auswertung unter Einhaltung der Vorbedingungen berücksichtigt. Trotz der geringen Stichprobengröße wurden signifikante Effekte nachgewiesen. Das spricht für die Stärke des Effekts, der auch qualitativ mit dem bloßen Auge erkennbar war.

Konventionelle und digitale Histologie

Für die Auswertung der Ergebnisse nutzten wir zunächst Techniken der konventionellen Histologie.

Vorteile der konventionellen histologischen Auswertung sind die einfache Zugänglichkeit der Methode und die direkte Interpretation der Ergebnisse. Wir beschrieben die histologischer Schnitte qualitativ im Lichtmikroskop und führten manuelle Zählungen von Strukturen durch. Zur manuellen Zählung aller AQP4⁺ Kapillaren im Cortex wurde eine Hochrechnung durchgeführt. Dazu wurde ein Raster über die Schnittbilder gelegt und lediglich die Kapillaren an den Schnittstellen manuell gezählt. Es ergaben sich 17136 Zählpunkte bei einer Rastergröße von 1600µm. In dieser Auswertung wurden unter sehr hohem Zeitaufwand von mehreren Tagen insgesamt 911 AQP4⁺ Kapillaren gezählt (Daten nicht gezeigt). Neben der offensichtlichen Ressourcenineffizienz hat die konventionelle histologische Auswertung mit einer subjektiven Bewertung der Ergebnisse, einer hohen Inter-Beobachter Variabilität und einer mangelnden Reproduzierbarkeit viele Nachteile (Taylor 2006, Goldstein et al. 2007, Jaraj et al. 2009). Zudem lassen sich viele Eigenschaften histologischer Schnitte nicht messen. In unseren Untersuchungen konnte beispielsweise das Ausmaß der Intensitätssteigerung von AQP4 zwar mit dem bloßen Auge gesehen, aber zwischen Beobachtern nicht reproduzierbar quantifiziert werden. Auf Basis der erheblichen Nachteile konventioneller histologischer Auswertung entschieden wir uns, Methoden der digitalisierten, automatisierten Histologie als Pilotprojekt zu entwickeln (vgl. Kapitel 2.6). Die digitalisierte Auswertung mit Hilfe des Digital Histology Processors ermöglichte uns, visuell nur grob charakterisierbare Veränderungen der AQP4-Polarisation an zerebralen Gefäßen präzise zu messen und statistisch auszuwerten (vgl. Kapitel 3.2). In Bezug auf die oben beschriebene Zählung von AQP4⁺ Kapillaren im Cortex war von Vorteil, dass wir mit der automatisierten Funktion Maxima.Capillary.Count (vgl. Kapitel 2.6.4) 11823 AQP4⁺ Kapillaren innerhalb weniger Minuten erkannt wurden. Selbst bei Berücksichtigung der Entwicklungsdauer des Programmes stellte die automatisierte Methode damit eine enorme Effizienzsteigerung gegenüber des Zeitbedarfs der manuellen Bildauswertung dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der quantitativen, automatisierten Auswertung zusammen mit der qualitativen, manuellen Auswertung kombiniert. Dies ermöglicht einen Vergleich beider Verfahren. Zukünftige Studien sollten die aus dem Pilotprojekt gewonnenen Erkenntnisse der automatisierten Methode auf größer angelegte Versuchssituationen anwenden.

Untersuchung generalisierter Astrozytopathie in Patienten mit progressiver MS

Um zu untersuchen, ob die im Tiermodell gewonnenen Ergebnisse eine Rolle in der humanen MS spielen, haben wir Gehirnläsionen von sieben PP- und SPMS-Patienten untersucht. In den Läsionen der PP/SP-MS Patienten konnte eine signifikante, vierfache Steigerung der AQP4-Immunreaktivität nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Bei den humanen Läsionen kamen die gleiche Färbemethode und der gleiche Algorithmus wie bei den vorangegangenen Experimenten im Tiermodell zum Einsatz. Als Kontrolle wurden dabei Gehirnregionen mit normal erscheinender weißer Substanz aus dem gleichen Schnitt herangezogen. Damit konnten wir sicherstellen, dass unterschiedliche Schnittdicken oder unterschiedlich starke Färbereaktionen zwischen den Schnitten keinen Einfluss auf die Messwerte hatten. In der Immunhistochemie zeigt sich im humanen Gehirn eine deutlich geringere Polarisation von AQP4 zu Blutgefäßen. Eidsvaag et al. (2017) haben gezeigt, dass AQP4 in Astrozyten der Maus stark polarisiert ist. Die Autoren fanden dort bis zu zehnmal mehr AQP4 in astrozytären Fußfortsätzen als im Zytoplasma. In humanen Proben zeigten die Autoren im Vergleich allerdings nur eine dreimal so starke Polarisation von AQP4. Auch bei unseren Untersuchungen konnte der starke Cuprizone-Effekt auf die AQP4-Polarisation in murinen Proben in dieser Arbeit nicht in gleicher Art und Weise in den humanen Proben gezeigt werden.

Untersuchung fokaler Astrozytopathie im Cup-EAE Modell

Wir nutzten das neuartige, in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Cup-EAE Modell (Scheld et al. 2016), um Astrozyten und AQP4 an fokalen, inflammatorischen Vorderhirnläsionen zu untersuchen. Das Cup-EAE Modell hat den Vorteil, dass es im Gegensatz zum Cuprizone- oder EAE-Modell eine MS-typische perivaskuläre Infiltration von Monozyten und Lymphozyten zeigt (Scheld et al. 2016). Das neuartige

Cup-EAE Modell wird tiefergehend in Kapitel 4.1.2 diskutiert. Unsere Ergebnisse zeigen einen zweistufigen Verlauf der Immunezellinfiltration in das Neuropil. Mit dem Durchbrechen der Immunezellen durch die innere Endothelschicht zeigt sich tendenziell eine GFAP+ reaktive Astroglie mit verminderter Expression von AQP4. Sobald die Glia limitans perivascularis durchbrochen wird, zeigt sich eine signifikante Verminderung der GFAP Expression ($p < 0,05$) als Zeichen der Funktionsstörung mit signifikantem Verlust von AQP4 ($p < 0,0001$). Die für diese Untersuchungen genutzte Funktion Focal.Concentric.Density setzt die Intensität einer immunfluoreszierenden Färbung in räumlichen Zusammenhang zu einem Fokuspunkt, in diesem Fall einem Gefäß. Zwei Normalisierungen ermöglichten die Vergleichbarkeit der unterschiedlich großen, unterschiedlich stark gefärbten Gefäße. Bezogen auf die Größe basiert der Algorithmus auf der Annahme, dass ein größeres inflammatorisches Gefäß auch einen größeren Bereich des umliegenden Neuropils beeinflusst. Um dies zu berücksichtigen, ist die Größe des Messbereiches um die Gefäße variabel (siehe Parameter DED in Kapitel 2.6.6). Damit sind die Messbereiche um die Gefäße unterschiedlich groß. Methodenbedingt variiert die Stärke der Färbereaktion zwischen den Schnitten. Um die Schnitte untereinander vergleichbar zu machen, wurde die gemessene Färbeintensität über einen Bezug zur Färbeintensität der jeweiligen Umgebung des gleichen Schnittes normalisiert. Die genutzten Annahmen und Modelle sorgen damit möglicherweise für einen Teil der Streuung der Messwerte. In der statistischen Auswertung wurde *a priori* angenommen, dass sich einzelne Läsionen unabhängig voneinander entwickeln, auch wenn diese zeitgleich im selben Versuchstier auftraten. Dies geschieht vor dem bekannten Hintergrund, dass MS- und NMO-Läsionen intra- und interindividuell sehr heterogen auftreten (Lassmann et al. 2001, Bruck et al. 2012, Schmidt et al. 2013).

4.1.1.2 AQP4 in generalisierten und fokalen Vorderhirnläsionen

Astrozyten, AQP4 und die BHS

Astrozyten machen ca. 30% der Gliazellen des ZNS aus. Jeder Astrozyt besetzt ein individuelles Gebiet des Neuropils, welches der Astrozyt durch seine namensgebenden, sternförmigen Fortsätze durchzieht. Astrozyten regulieren Glutamat- und Kaliumspiegel und die Wasserhomöostase. Astrozyten sind funktionell über *gap junctions* mit anderen Astrozyten und Oligodendrozyten verbunden und bilden Netzwerke aus mehreren hundert Zellen. Astrozyten haben Funktionen in der Produktion von Neurosteroiden wie Dehydroepiandrosteron (DHEA) oder Östrogenen und produzieren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine (Ponath et al. (2018)). Astrozyten sind an der Ausbildung der BHS beteiligt. Ein wichtiges Protein, welches an der Funktion der BHS beteiligt ist, ist das von Astrozyten exprimierte AQP4. AQP4-Monomere bestehen aus 6 helical angeordneten Transmembrandomänen und zwei außenstehenden Helixsegmenten, die zusammen eine zentrale Wasserpore bilden. Die Monomere lagern sich zu Tetrameren in der Plasmamembran zusammen. Es gibt zwei Isoformen der AQP4-Monomere, M1 und M23 (Ho et al. 2009). Nur die M23 Isomere bilden neben den Tetrameren auch sog. orthogonal arrays of particles (OAPs). Die Funktion der OAPs ist unbekannt. Studien haben gezeigt, dass die OAPs Epitope für die AQP4-IgG der NMO enthalten. OAPs scheinen für die komplementabhängige Zytotoxizität über an AQP4-IgG gebundenes C1q unerlässlich zu sein (Nicchia et al. 2009, Crane et al. 2011). AQP4 wird im hohen Maße von Astrozyten im Rückenmark, in den N. optici, im Hirnstamm, im Hypothalamus und in den periventriculären Regionen exprimiert. Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen eine hochgradige Polarisation von AQP4 an die adluminale Plasmamembran der astrozytären Fußfortsätze an der BHS (Nagelhus und Ottersen 2013, Gleiser et al. 2016).

Primäre Astrozytopathie

Eine Cuprizone-Behandlung geht mit einer Aktivierung von Astrozyten einher (Kipp et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass primäre, gehirnintrinsische Degenerationsprozesse im toxischen Cuprizone-Modell eine generalisierte Astrozytopathie mit Expressionssteigerung und

Polarisationsverlust von AQP4 verursachen. Die Expressionssteigerung von AQP4 war auch in Läsionen humaner PP/SP-MS Patienten nachweisbar. Auch andere Studien zeigen, dass Neuroinflammation mit einer Astrozytopathie, einer Expressionssteigerung oder einer Umverteilung von AQP4 einhergeht. Wolburg-Buchholz et al. (2009) untersuchten PVCs auf eine Polarisationsveränderung von AQP4 im Rückenmark und im Cerebellum des EAE-Modells. Die Autoren zeigten einen Verlust der Polarisation von AQP4 an astrozytären Fußfortsätzen an PVCs im EAE Modell. Wir konnten diesen Verlust nun auch im Cup/EAE Modell zeigen. Clarner et al. (2014) zeigten einen AQP4 Polarisationsverlust in einem Mausmodell, das Aspekte des Morbus Canavan, einer spongiosen Degeneration des Nervensystems, zeigt. Dai et al. (2017) untersuchten in einem Mausmodell die Motoneurondegeneration der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS). Sie konnten eine Astrozytenaktivierung mit globaler AQP4 Expressionssteigerung nachweisen. Beim Fortschreiten der Erkrankung ging die AQP4 Polarisation verloren. Yang et al. (2011) haben in einem Tiermodell für die neurodegenerative Alzheimer-Erkrankung festgestellt, dass AQP4 an Orten von A β -Amyloidplaques aus den astrozytären Fortsätzen verloren geht. Sie zeigten eine Expressionssteigerung von AQP4 im Neuropil, das die Plaques umgibt. Aoki-Yoshino et al. (2005) zeigten eine Expressionssteigerung von AQP4 in MS, HIVE (Humane Immundefizienz Virus Encephalitis) und PML (Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie). Die Umverteilung von AQP4⁺ Astrozyten hatte in den verschiedenen Erkrankungen unterschiedliches Ausmaß. Eine Astrozytopathie tritt demnach bei Erkrankungen auf, denen eine primär neurodegenerative Pathogenese zugeschrieben wird.

Folgen der Umverteilung von AQP4

Ein Verlust der AQP4 Polarisation zieht einen Funktionsausfall von Astrozyten nach sich. Neben AQP4 exprimieren Astrozyten auch weitere Proteine, die einen großen Effekt auf die Aufrechterhaltung der ZNS-Homöostase haben. Dazu gehören der Kaliumkanal Kir4.1 und der Glutamattransporter EAAT-2. Kir4.1 ist co-lokalisiert mit M23-AQP4, aber nicht mit M1-AQP4. Kir4.1 bildet mit AQP4 makromolekulare Komplexe, die an astrozytäre Fußfortsätze polarisiert sind (Smith und Verkman 2015). Steiner et al. (2012) zeigen in einem Tiermodell für Hirninfarkte, dass diese Co-Lokalisation verloren geht, wenn Agrin, eine Komponente der Basalmembran, abwesend ist. Die Autoren sehen dies als eine Ursache für die Ausbildung von Gehirnödemen in ischämischen Gehirnarealen. Ein Verlust der Astrozytenpolarisation geht dementsprechend mit einem gestörten Wasser- und Kaliumhaushalt einher (Yang et al. 2011). Der Glutamattransporter EAAT-2 ist ebenfalls in makromolekularen Komplexen mit AQP4 verbunden. Dieser Transporter spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des extrazellulären Milieus für Neurone und Oligodendrozyten. Ein Verlust von EAAT-2 kann eine mögliche Ursache für eine sekundäre Degeneration der Oligodendrozyten und Neurone darstellen (Hinson et al. 2008, Hinson et al. 2010, Zekeridou und Lennon 2015). Möglicherweise könnte die in dieser Arbeit beobachtete Veränderung der AQP4 Polarisation über AQP4, Kir4.1 oder EAAT-2 die Funktion der BHS stören. Eine gestörte BHS kann es peripheren Immunzellen erleichtern, das Neuropil zu infiltrieren (Alvarez et al. 2011). Das würde auch zu der von uns gezeigten sekundären Immunzellinvasion im Cup-EAE Modell passen. van Horssen et al. (2007) untersuchten die graue und weiße Substanz von MS-Läsionen und konnten eine reaktive Astroglie mit einhergehenden Lecks in der BHS nachweisen, die sich in der weißen Substanz ausprägten. Auch Wolburg-Buchholz et al. (2009) fanden wie schon oben beschrieben einen Polarisationsverlust von AQP4. Die Autoren konnten Läsionen mit Lecks der BHS und gleichzeitiger Infiltration von CD45⁺ Lymphozyten in den Virchow-Robin Raum nachweisen. Die Autoren zeigten zudem eine GFAP⁺ Astroglie mit entsprechender Expression von Kir4.1. Maggi et al. (2014) zeigten in einem Primaten-Modell, dass die Permeabilität der BHS bereits 4 Wochen vor dem Auftreten von perivaskulären Läsionen signifikant erhöht war. Diese Veränderungen traten auf, bevor Monozyten Demyelinisierung hervorriefen. Auch diese Studien würden die Hypothese eines Zusammenhanges zwischen der von uns beobachteten Umverteilung von AQP4 und peripherer Immunzellinvasion befürworten.

Periphere Immunzellinvasion

Entsprechend der Hypothese, dass eine primäre Astrozytopathie eine periphere Immunzellinvasion begünstigt, konnten wir in der vorliegenden Arbeit eine subsequezte zweistufige Immunzellinvasion in das Vorderhirn der Versuchstiere nachweisen. Die resultierenden PVCs waren u.a. von Demyelinisierung gekennzeichnet. Damit konnten wir wichtige Ergebnisse der Erstbeschreibung des Cup-EAE Modells von Scheld et al. (2016) bestätigen. Auch die dort beschriebene Disruption der GFAP⁺ Glia limitans an PVC+ Läsionen konnte bestätigt werden. Die Autoren der Studie stellten einen fokalen Verlust von AQP4 an PVCs fest. Allerdings wurde dieser nur in einer immunhistochemischen Färbung untersucht. In der aktuellen Untersuchung wurde die Beobachtung mittels der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung und digitaler Modellierung weiter differenziert. Es wurde ersichtlich, dass mit dem Durchbrechen der Immunzellen durch die innere Endothelschicht zunächst eine reaktive Astroglie mit leicht gesteigerter Expression von GFAP⁺ und verminderter Expression von AQP4 entsteht. Möglicherweise handelt es sich auch dabei um den Versuch eines neuroprotektiven Mechanismus der Astrozyten. Zunächst verbleiben die Immunzellen im Virchow-Robin-Raum (von uns als PVC- bezeichnet). Sobald die astrozytäre Glia limitans perivascularis in einem nächsten Schritt durchbrochen wurde, fand sich eine Immunzellinvasion in das Neuropil (von uns als PVC+ bezeichnet). Es ließ sich final eine signifikante Verminderung der GFAP - Expression als mögliches Zeichen einer Astrozytendestruktion zusammen mit signifikantem Verlust von AQP4 nachweisen. Auf einen Astrozytenverlust folgt die weitere Destruktion des Neuropils mit einer Schädigung von Oligodendrozyten und Neuronen (Hinson et al. 2010). Auch andere Studien zeigen einen zweistufigen Verlauf der Immunzellinvasion an perivaskulären Läsionen (Owens et al. 2008, Rezai-Zadeh et al. 2009). In diesen Studien wurde gezeigt, dass im Falle einer Inflammation Lymphozyten in einem ersten Schritt zunächst in den Virchow-Robin-Raum einwandern. In einem zweiten Schritt infiltrieren die Leukozyten das Neuropil und verursachen dort demyelinisierende Läsionen (Owens et al. 2008, Rezai-Zadeh et al. 2009).

In einer Gesamtbetrachtung liefern die Ergebnisse dieser Arbeit weitere Argumente für eine mögliche „inside-out“ Pathogenese (Stys et al. 2012) der Multiplen Sklerose. Zunächst konnten wir Hinweise finden, dass primäre, gehirnintrinsische Degenerationsprozesse im Cuprizone-Tiermodell eine generalisierte Astrozytopathie mit Expressionssteigerung und Polarisationsverlust von AQP4 verursachen. Die Expressionssteigerung konnte auch in den translationalen Experimenten mit PP/SP-MS Patientenmaterial gezeigt werden. Eine Veränderung der AQP4-Polarisation führt zu einer Veränderung der Permeabilität der BHS. Wir konnten mit Hilfe des Cup-EAE Modells zeigen, dass primäre, intrinsische Degenerationsprozesse eine darauf folgende, sekundäre Immunzellinfiltration des Vorderhirns im Tiermodell ermöglichen. Es fanden sich Hinweise darauf, dass die sekundäre Lymphozyteninfiltration von der primären Astrozytopathie begünstigt wird. Die Immunzellinvasion ist durch eine fokale Astrozytopathie gekennzeichnet, die sich in einem fokalen Verlust von AQP4 und GFAP äußert. Ins Neuropil eingewanderte periphere Immunzellen verursachen eine Inflammation und begünstigen damit eine weitere Demyelinisierung und neuronale Schädigung. Die Berücksichtigung der „inside-out“ Pathogenese könnte als Grundlage für die Erforschung neuer Therapiestrategien in der Behandlung der MS dienen.

4.1.2 Charakterisierung von Cup-EAE-Läsionen im Kontext der MS und der NMO

Obwohl das Cuprizone- und das EAE-Modell etablierte MS-Tiermodelle sind, konnten wir zeigen, dass das Cup-EAE Modell einige Aspekte der Pathologie der NMO zeigt. Der nachfolgende Abschnitt charakterisiert Läsionen des Cup-EAE Modells in der Debatte um die Heterogenität von MS- und NMO-Läsionen.

4.1.2.1 Charakterisierung von Cup-EAE-Läsionen in Bezug auf MS und NMO

Lymphozytäre Infiltration in Abhängigkeit der Cuprizone-Behandlungsdauer

Im Cup-EAE Modell findet eine Invasion von Mono- und Lymphozyten über postkapilläre Venolen statt. Wie zuvor von Scheld et al. (2016) beschrieben, findet diese Invasion nur im Cup-EAE Modell statt, nicht aber im Cuprizone- oder EAE Modell. Es ist noch nicht beschrieben worden, wie sich eine unterschiedlich lange Intoxikation mit Cuprizone auf das Ausmaß von PVCs auswirkt. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass eine dreiwöchige Cuprizone-Behandlung mit dem Auftreten von signifikant mehr PVCs im Vorderhirn von Cup-EAE Versuchstieren einher geht, als bei einwöchiger Behandlung ($p < 0,05$). Die Auswertung erfolgte mittels IHC, konventioneller Histologie und manueller Auszählung. Um die Validität der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Zählung von zwei verblindeten Beobachtern durchgeführt und anschließend gemittelt. Der Break-Even-Point der Entwicklungszeit, der die Programmierung einer automatisierten Zählmethode begründet hätte, wurde nicht erreicht (siehe auch Kapitel 4.1.1.1).

Doan et al. (2013) konnten zeigen, dass 3 Wochen Cuprizonebehandlung mit folgenden zwei Wochen Standardfutter das gleiche Ausmaß an Demyelinisierung erzeugen, wie 5 Wochen Cuprizone-Behandlung. Das autonome Fortschreiten (*autonomous lesion progression*) der Läsion nach den 3 Wochen verläuft in der ersten Versuchsgruppe ohne weitere Cuprizone-Intoxikation. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass 2 Wochen zusätzliche Zeit für eine mögliche *autonomous lesion progression* keine signifikante Zunahme der Anzahl der PVCs bewirkt. Die Untersuchungen der PVCs von Woche 1 und 3 zeigen dagegen einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß primärer Zytodegeneration und sekundärer Immunzellinfiltration. Das Ausmaß der Immunantwort hängt entsprechend vom Ausmaß des neurodegenerativen Schadens ab. Scheld et al. (2016) haben bereits nachgewiesen, dass beim Cup-EAE Modell u.a. CD3⁺ T-Lymphozyten aktiviert werden. Eine Infiltration von T-Lymphozyten an Läsionen ist klassischerweise mit der Pathologie der MS assoziiert (Kipp et al. 2012). Neuere Studien zeigen allerdings, dass auch NMO-Läsionen eine Infiltration mit T-Lymphozyten zeigen. Es wird davon ausgegangen, dass sie zur Freisetzung der AQP4-IgG beitragen, da die Differenzierung von IgG1-Antikörpern von einer T-Zell-Aktivierung beeinflusst wird (Bradl et al. 2009, Papadopoulos und Verkman 2012). Möglicherweise haben autoreaktive T-Zellen auch einen direkten Einfluss auf NMO-Läsionen (Zeka et al. 2015). Zusammengefasst lassen sich die Läsionen des Cup-EAE Modells in diesem Aspekt sowohl mit der Pathologie der MS als auch der der NMO vergleichen.

Granulozyteninfiltration

Die Pathologie der MS verläuft ohne Infiltration neutrophiler Granulozyten (Kipp et al. 2012). Einige NMO-Läsionen zeigen dagegen eine Infiltration neutrophiler Granulozyten. Um die Cup-EAE Läsionen spezifischer zwischen MS und NMO differenzieren zu können, wurden die Immunzellinfiltrate bezüglich einer Invasion neutrophiler Granulozyten untersucht. Es ist zu beachten, dass es sich bei dieser Untersuchung um eine Pilotstudie mit geringen Fallzahlen und ohne systematische Analyse handelt. Die Ergebnisse müssen daher in einer umfangreicheren Studie bestätigt werden. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen eine Invasion vieler degranulierter neutrophiler Granulozyten. Drei Schnitte zeigen eine hohe Granulozytendichte, vier eine geringere. Dies liegt möglicherweise an der Färbemethodik, die im Gegensatz zu den übrigen Färbungen indirekt enzymatisch funktioniert. Es wird

die von degranulierten Granulozyten produzierte Esterase angefärbt, nicht aber die Granulozyten selbst. Das macht die Methode möglicherweise unpräziser. Zusammengefasst zeigt sich in diesem Aspekt eine Assoziation der Cup-EAE-Läsionen mit der Pathologie der NMO.

Astrozytopathie und AQP4-IgG

In Kapitel 4.1.1 wurde die Astrozytopathie bei der Entstehung von MS-Läsionen diskutiert. Eine Astrozytopathie ist allerdings auch ein zentrales Charakteristikum der Pathologie der NMO (Wingerchuk 2010, Ratelade und Verkman 2012, Jasiak-Zatonska et al. 2016). Die Astrozytopathie wird bei der NMO auf die direkte Pathogenität der AQP4-IgG zurückgeführt (Wingerchuk et al. 2007, Zeka et al. 2015, Herwerth et al. 2016). Bei den AQP4-IgG handelt es sich um IgG-1-Antikörper, die von B-Zellen produziert werden (Lennon et al. 2004, Lennon et al. 2005). Entgegen der MS, die hauptsächlich T-Zell-dominiert zu sein scheint, sind in der NMO die B-Zellen mit spezifischen IgG relevanter (Hinson et al. 2010). Da AQP4-IgG somit ein zentrales Charakteristikum der NMO darstellen, haben wir untersucht, ob sich im Cup-EAE Modell ein AQP4-IgG Titer im Blutserum der Versuchstiere nachweisen lässt. In der vorliegenden Arbeit konnten wir im Blutserum keiner der Versuchsgruppen (Kontrolle, Cuprizone, EAE, Cup-EAE) AQP4-IgG nachweisen. Zur Positivkontrolle wurden Serumproben positiver NMO Patienten und eine Lösung aus rekombinantem AQP4-IgG verwendet. Beide Positivkontrollen zeigten ein positives Resultat. Der AQP4-ELISA wurde verwendet, um Blutserum der Maus quantitativ auf einen vorhandenen AQP4-IgG Titer zu untersuchen. Ein AQP4-ELISA stellt eine Standardmethode in der Diagnose der NMO dar (Jarius et al. 2012). In dieser Arbeit wurde ein Test der DLD Diagnostika GmbH, Hamburg verwendet. Der Test ist für die Untersuchung von humanem Blutserum konzipiert, er hat eine Spezifität von 99% (356/356 Pat.) und Sensitivität von 77% (48/62 Patienten) für die Diagnosestellung der NMO. Derzeit gibt es auf dem Markt keine kommerziellen AQP4-IgG ELISAs für murines AQP4. Der Test von DLD Diagnostika GmbH verwendet die rekombinant hergestellte humane M23-Isoform von AQP4. Die Homologie der Aminosäurefrequenz von humanem und murinem AQP4 Protein liegt nach Anfrage beim Hersteller bei 92,9%. Das mache es laut Hersteller sehr wahrscheinlich, dass Antikörper gegen murines AQP4 in diesem Test kreuzreaktiv an humanes AQP4 binden. Entsprechend bleibt dennoch ein geringes Risiko eines falsch-negativen Ergebnisses. Der Versuch, AQP4-IgG mittels direkter Immunhistochemie im Gewebe nachzuweisen, verlief erfolglos (Daten nicht gezeigt).

Unser Ergebnis des AQP4-ELISAs steht im direkten Gegensatz zu Untersuchungen von Wu et al. (2013): Die Autoren der Studie beschrieben einen Titer von AQP4-IgG im Blutserum von EAE-Versuchstieren. In der Studie wurden wie auch in unseren Untersuchungen C57/BL6-Mäuse gegen MOG₃₃₋₅₅ immunisiert, um EAE zu erzeugen. Auch wurde ein ELISA herangezogen, um den AQP4-IgG Titer zu bestimmen. Der ELISA Test wurde selbst konzipiert und verwendet Material der Beijing Biosynthesis Biotechnology Co. Ltd (Peking, China). In den Ergebnissen der Studie wurden Werte der optischen Dichte als finale Messwerte des ELISAs angegeben, ohne diese mit Kontrollproben in Konzentrationen umzurechnen. Es wurden keine Messwerte der Positiv- oder Negativkontrollen gezeigt. Das lässt aus unserer Sicht an der methodischen Qualität der Studie zweifeln. Auch Bourquin et al. (2003) konnten zeigen, dass bei der Immunisierung von C57/BL6 Mäusen mit MOG₃₃₋₅₅ keine demyelinisierenden Autoantikörper gebildet werden. Weitere Studien konnten zeigen, dass auch B-Zell defiziente Mäuse eine EAE nach Immunisierung mit MOG₃₃₋₅₅ entwickeln können (Lyons et al. 1999). Das macht es unwahrscheinlich, dass Immunglobuline in der Pathogenese der EAE eine Rolle spielen.

Ca. 25 % der NMO-Patienten zeigen keinen AQP4-IgG Titer (Sato et al. 2014, Jasiak-Zatonska et al. 2016). Im Serum von vielen AQP4-IgG seronegativen NMOsd-Patienten finden sich Immunglobuline gegen MOG (Saadoun et al. 2014) oder Aquaporin-1 (Tzartos et al. 2013). Die Rolle von MOG- und AQP1-IgG ist bisher noch nicht abschließend verstanden (Jasiak-Zatonska et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit konnten zwar keine AQP4-IgG nachgewiesen werden, allerdings ist darauf

hinzuweisen, dass die Versuchstiere im Rahmen des EAE-Protokolls mit MOG₃₃₋₅₅ immunisiert wurden und damit möglicherweise MOG-IgG bilden. Saadoun et al. (2014) injizierten humanes MOG-IgG in das Vorderhirn von Mäusen und zeigten Veränderungen am Myelin, allerdings ohne Inflammation, axonalem Schaden oder Astrozytopathie. Zusammengefasst lassen sich die Läsionen des Cup-EAE Modells in dem Aspekt der AQP4-IgG sowohl mit der Pathologie der MS als auch der von AQP4-IgG seronegativen NMOsd-Patienten vergleichen.

4.1.2.2 Vergleich von Cup-EAE-Läsionen im denen der MS und NMO

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass im Cup-EAE-Modell inflammatorische Läsionen im Vorderhirn von Versuchstieren erzeugt werden. Wir konnten zeigen, dass die Läsionen mit einer Astrozytopathie und fokalem AQP4-Verlust einhergehen. Es findet sich vorrangig eine Infiltration mit T-Lymphozyten (Scheld et al. 2016) und neutrophilen Granulozyten. Es lässt sich kein AQP4-IgG in den Blutsera der Versuchstiere nachweisen. Da Läsionen des Cup-EAE Modells damit sowohl Aspekte der NMO und der MS Modells beinhalten, stellt sich die Frage, wie das Modell letztendlich einzuordnen ist.

Klassifikation von MS-Läsionen

Die aktiven Läsionen der MS werden im Vergleich verschiedener Patienten als sehr heterogen beschrieben. In per Biopsie gewonnenen Gewebeproben von RRMS-Patienten wurden darauf von Lassmann et al. (2001) vier verschiedene Muster der Demyelinisierung in aktiven Läsionen der weißen Substanz spezifiziert, die Demyelinisierung und axonalen Schaden verursachen. Barnett und Prineas (2004) beschrieben Läsionen von 12 Patienten mit RRMS, die kurz nach dem Beginn eines Schubes verstorben sind. Die histopathologische Aufarbeitung zeigt damit sehr frühe MS-Läsionen. Die nachfolgende Tabelle fasst die wichtigsten Merkmale von aktiven Läsionen der weißen Substanz in der MS zusammen. Es ist darauf hinzuweisen, dass auch die graue Substanz im Verlauf der MS erheblich geschädigt wird (Geurts und Barkhof 2008).

Tabelle 55: Klassifikation aktiver Läsionen der MS nach Lassmann et al. (2001) Typ I – IV und Barnett und Prineas (2004)

Läsionstyp	Wesentliche Charakteristika
I	Makrophagenvermittelte Demyelinisierung. <i>Perivenöse Läsionsverteilung mit Immunglobulinen und T-Lymphozyten, Makrophagen und Mikroglia. Demyelinisierung über Toxine der Makrophagen (TNFα, reaktive Sauerstoffspezies).</i>
II	Antikörpervermittelte Demyelinisierung. <i>Ähnlich zu Typ I, aber mit Ablagerungen von Immunglobulinen und Komponenten des Komplementsystems (v.a. Faktor C9neo) und Demyelinisierung.</i>
III	Degenerative distale Oligodendrozytopathie und –apoptose. <i>Infiltration von T-Zellen und Makrophagen mit Endothelschaden und Thrombose von Mikrogefäßen. Demyelinisierung über T-Zell-vermittelte Vaskulitis mit sekundär ischämischen Schaden der weißen Substanz</i>
IV	Primäre Oligodendrozytendegeneration. <i>Ähnlich zu Typ I, aber nicht-apoptotische Degeneration der Oligodendrozyten. Demyelinisierung über Toxine der Makrophagen auf Basis metabolisch geschädigter Oligodendrozyten. Nur in PPMS Patienten nachgewiesen.</i>
B/P	Oligodendrozytendegeneration. <i>Komplementablagerung und Mikrogliaaktivierung. Selten T-Zellen oder Makrophagen im Zentrum der apoptotischen Läsion. Erst nach 1-2 Tagen Verlust der Oligodendrozyten, Aktivierung der T-Zellen und Makrophagen.</i>

Klassifikation von NMO-Läsionen

Misu et al. (2013) haben 6 verschiedene Typen von humanen NMO-Läsionen definiert. Eine Übersicht über deren Charakteristika findet sich in nachfolgender Tabelle. Die Autoren sehen den Mechanismus bei Typ 1–3 Läsionen in einer Komplementaktivierung mit Granulozyteninvasion. Die astrozytäre Schädigung in Typ 4–6 Läsionen entsteht laut Autoren ohne Komplementaktivierung oder Granulozyteninvasion.

Tabelle 56. Läsionstypen der NMO nach Misu et al. (2013)

Läsionstyp	Wesentliche Charakteristika
Typ 1	Aktive NMO-Läsion mit Komplement und Granulozyten. <i>Immunglobulin- und Komplementablagerung. Infiltration von Granulozyten. Astrozytennekrose mit Verlust der Fußfortsätze. Wenig Oligodendrozytenapoptose mit Demyelinisierung und axonalem Schaden. GFAP+, AQP4-.</i>
Typ 2	Zystische, inaktive Läsion mit globaler Gewebszerstörung. <i>Verlust der Struktur aller zellulärer Komponenten, GFAP- AQP4-. Vermutlich Folge einer Typ 1-Läsion.</i>
Typ 3	Läsion mit sekundärer Wallerscher Degeneration. <i>Nur im Rückenmark. Oligodendrozytenapoptose mit Demyelinisierung und axonalem Schaden. Reaktive Astroglie. GFAP+, AQP4 variabel.</i>
Typ 4	Läsion mit selektivem AQP4-Verlust. <i>An PVCs assoziiert. Mikrogliaaktivierung. Keine Komplementablagerungen. Keine Granulozyteninvasion. Kein Strukturschaden des Gewebes. GFAP+, AQP4-.</i>
Typ 5	Aktive NMO-Läsion mit astrozytärer Clasmotodendrose. <i>Infiltration mit T-Zellen und Makrophagen. Keine Granulozyteninvasion. Bizarre Astrozyten mit Verklumpung der Zellfortsätze. Astrozytenapoptose ohne Demyelinisierung und axonalem Schaden. Internalisierung von AQP4.</i>
Typ 6	Läsion mit Astrozytendystrophie und primärer Demyelinisierung <i>Infiltration mit T-Zellen und Makrophagen. Clasmotodendrose von Astrozyten, MS-ähnliche Plaques. Primäre Demyelinisierung und Oligodendrozytenapoptose ohne neuronalen Schaden. Keine Komplementablagerungen. Keine Granulozyteninvasion. GFAP-, AQP4 variabel.</i>

Heterogenität von MS- und NMO-Läsionen und Einordnung von Cup-EAE Läsionen

In Betracht der oben dargestellten Läsionsklassifizierungen zeigt sich, dass viele Aspekte der MS- oder der NMO-Pathologie auch bei der jeweils anderen Erkrankung auftreten (Misu et al. 2013). Darüber hinaus zeigt sich eine große Heterogenität der Läsionstypen selbst. Bruck et al. (2012) beschrieben in ihrer Studie Läsionen eines Patientenkollektivs, die sowohl Aspekte der NMO als auch der MS zeigten. In Anlehnung an die Untersuchungen von Bruck et al. (2012) soll nachfolgend auch ein Vergleich zwischen den Typ II- und III MS-Läsionen nach Lassmann et al. (2001), den frühen MS-Läsionen nach Barnett und Prineas (2004) und den NMO-Läsionen nach Misu et al. (2013) gezogen werden. Tabelle 57 zeigt die Zusammenfassung des histopathologischen Vergleichs aktiver demyelinisierender Läsionen in MS, Cup-EAE und NMO in Anlehnung an Bruck et al. (2012). Wir konnten zeigen, dass Läsionen des Cup-EAE Modells Charakteristika beider Erkrankungen aufweisen. Zusammen mit der Granulozyteninvasion und der fokalen Astrozytopathie mit AQP4-Verlust zeigen sich damit Aspekte von Läsionen AQP4-IgG seronegativer NMOsd-Patienten. Anstatt das Cup-EAE auf nur eine der beiden Erkrankungen zu reduzieren, betrachten wir es als generalistisches Modell, um die Wirkung gehirnintrinsischer Degenerationsprozesse auf eine sekundäre Immunzellinvasion zu untersuchen. Das Cup-EAE Modell eignet sich damit zur Untersuchung sowohl der MS als auch der seronegativen NMOsd. Die hier dargestellten Untersuchungen deuten darauf hin, dass in der Pathogenese von MS bzw. NMOsd-Läsionen ähnliche Prozesse ablaufen und sich die Krankheitsbilder ähnlicher sind, als bisher angenommen.

Tabelle 57: Histopathologischer Vergleich aktiver demyelinisierender Läsionen in MS, Cup-EAE und NMO in Anlehnung an Bruck et al. (2012)

Charakteristika	MS Pat. II	MS Pat. III	MS B/P	Cup-EAE	NMO Misu
Infiltration von T-Lymphozyten	Pos.	Pos.	(gering)	Pos.	Pos. bei Typ 5-6
Infiltration neutrophiler Granulozyten	-	-	n.u.	Pos.	Pos. bei Typ 1-3
Verlust von Astrozyten	-	-	-	Pos.	Pos.
Verlust von AQP4	(vereinzelt)	-	n.u.	Pos.	Pos.
AQP-IgG im Blutserum	-	-	-	-	+ (bei ca. 25% der Pat. -)

B/P = MS Läsionen nach Barnett und Prineas (2004); MS Pat. II und MS Pat. III = MS Läsionen nach Lassmann et al. (2001); NMO Misu = NMO Läsionen nach Misu et al. (2013); Pos. = positiv; n.u. = nicht untersucht; - = negativ

4.2 Ausblick

Die vorliegende Arbeit gibt wichtige Hinweise darauf, dass intrinsische Degenerationsprozesse von Astrozyten im Sinne der „inside-out“ Hypothese eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielen. Da einige der Untersuchungen an einem kleinen Stichprobenkollektiv durchgeführt wurden, sollten die Ergebnisse in weiteren Studien bestätigt werden. Folgestudien sollten auch den translationalen Ansatz dieser Arbeit weiterführen und weitere Erkenntnisse aus dem Cup-EAE Modell wie der fokalen Astrozytopathie mit AQP4-Verlust in humanen Proben untersuchen. Daneben wären aus unserer Sicht Untersuchungen zum AQP4 Polarisationsverlust und dessen EAAT-2 bzw. Kir4.1-vermittelte Wirkung auf die sekundäre Immuneinvasion im Cup-EAE Modell von Interesse. Weiter untersucht werden sollte das Auftreten der neutrophilen Granulozyten, das sich bisher nicht in den etablierten MS-Tiermodellen zeigen ließ. Auch die Rolle von eosinophilen Granulozyten in der Pathogenese neuroinflammatorischer Erkrankungen ist noch unzureichend untersucht. In dieser Arbeit konnten neuartige Methoden der digitalen Histologie zur automatisierten Bildanalyse genutzt werden. Diese Methoden sollen auch in Zukunft aufgrund der vielen Vorteile weiter genutzt und ausgebaut werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Cup-EAE Modell tiefergehend charakterisiert. Wir hoffen, damit eine Grundlage für die Erforschung neuer Therapiestrategien im Kampf gegen MS und NMO bieten zu können. Mit Aquaporumab und Sivelestat zielen neue Therapieansätze auf die AQP4-IgG und die neutrophilen Granulozyten in der NMO. Der Immunmodulator Laquinimod scheint einen neuroprotektiven Effekt auf Astrozyten von PP-/SPMS-Patienten zu haben. Die Wirkung dieser Pharmaka sollte in zukünftigen Studien des Cup-EAE Modells untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Gehirnintrinsische Zytodegeneration triggert eine Umverteilung von Aquaporin 4 mit sekundärer Immunzellinvasion

Als einer der Hauptregulatoren der Wasserhomöostase im zentralen Nervensystem wird vermutet, dass Aquaporin 4 (AQP4) eine maßgebliche Rolle an der Ausbildung neuroinflammatorischer Läsionen hat. Nach der Entdeckung von AQP4 als Autoantigen der Neuromyelitis optica (NMO) ist dessen Rolle am Krankheitsgeschehen in den Fokus der Forschung gelangt. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, Veränderungen in der Expression und Verteilung von AQP4 im Kontext von neuroinflammatorischen Tiermodellen, Patienten mit Multipler Sklerose (MS) und pathologischen Prozessen der NMO zu untersuchen.

Weibliche C57/BL6 Mäuse wurden in 4 Gruppen unterteilt. Die Kontrollgruppe wurde mit normalem Nagetierfutter gefüttert. In der zweiten Gruppe wurde 5 Wochen lang mit 0,25% Cuprizone (Cup) gefüttert, um einen neurodegenerativen, metabolischen Schaden zu erzeugen. In der dritten Gruppe wurde über eine Injektion von MOG₃₃₋₅₅ Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) induziert, um eine Autoimmunreaktion zu erzeugen. Die vierte Gruppe erhielt beide Behandlungen (Cup-EAE) und wurde somit 3 Wochen mit Cup und 2 Wochen mit Standardfutter gefüttert, bevor EAE induziert wurde. Immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Färbungen von Gehirngewebe wurden konventionell und mit neuartigen digitalen histologischen Methoden untersucht. Blutserum aus allen Versuchsgruppen wurde mittels ELISA auf AQP4-Autoantikörper untersucht. Zusätzlich wurden *post mortem* Gehirnschnitte verstorbener Patienten mit progressiver MS analysiert.

An Vorderhirnläsionen der Versuchstiere im Cuprizone-Modell fand sich eine generalisierte Expressionssteigerung von AQP4 in der grauen und vor allem weißen Substanz. Dieser Effekt konnte auch in Läsionen von PP/SP-MS Patienten nachgewiesen werden. In der grauen Substanz zeigte sich zudem eine generalisierte Umverteilung von AQP4. In der unmittelbaren Umgebung inflammatorischer Gefäße im Cup-EAE Modell fand sich ein fokaler Verlust von AQP4. Diese Läsionen zeigten eine ausgeprägte Zellinfiltration, unter anderem mit neutrophilen Granulozyten. Die Immunzellinfiltration wurde nach längerer vorangehender Cuprizone-Behandlung größer. In den Blutsera der Versuchstiere konnte keine humorale Immunantwort in Form von AQP4-IgG nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass eine primär metabolische Schädigung des Vorderhirns zu einer generalisierten Expressionssteigerung von AQP4 und einem Verlust der AQP4-Polarisation führt. Es fanden sich Hinweise, dass die Invasion peripherer Immunzellen ins Vorderhirn unabhängig vom Auftreten von Autoantikörpern zu einem fokalen Verlust von AQP4 an postkapillären Venolen führt. Zusammengefasst unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die sog. „inside-out“ Hypothese einer primär neurodegenerativen Pathogenese der MS. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Cup-EAE Modell neben der Untersuchung pathologischer Aspekte der MS auch zur Untersuchung der seronegativen NMO-spectrum-disorders eignet. Zukünftige Studien sollten das Cup-EAE Tiermodell noch tiefergehender charakterisieren und primär neurodegenerative Prozesse als vielversprechenden Angriffspunkt neuer MS- und NMO-Therapeutika in den Fokus setzen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Akassoglou, K., J. Bauer, G. Kassiotis, M. Pasparakis, H. Lassmann, G. Kollias and L. Probert (1998). "Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy." Am J Pathol 153(3): 801-813.
- Alvarez, J. I., R. Cayrol and A. Prat (2011). "Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis." Biochim Biophys Acta 1812(2): 252-264.
- Aoki-Yoshino, K., T. Uchihara, C. Duyckaerts, A. Nakamura, J. J. Hauw and Y. Wakayama (2005). "Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with inflammatory diseases." Acta Neuropathol 110(3): 281-288.
- Barnett, M. H. and J. W. Prineas (2004). "Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion." Ann Neurol 55(4): 458-468.
- Bauer, J., H. Rauschka and H. Lassmann (2001). "Inflammation in the nervous system: the human perspective." Glia 36(2): 235-243.
- Bourquin, C., A. Schubart, S. Tobollik, I. Mather, S. Ogg, R. Liblau and C. Linington (2003). "Selective unresponsiveness to conformational B cell epitopes of the myelin oligodendrocyte glycoprotein in H-2b mice." J Immunol 171(1): 455-461.
- 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.
- Brosnan, C. F. and C. S. Raine (2013). "The astrocyte in multiple sclerosis revisited." Glia 61(4): 453-465.
- Bruck, W., B. Popescu, C. F. Lucchinetti, S. Markovic-Plese, R. Gold, D. R. Thal and I. Metz (2012). "Neuromyelitis optica lesions may inform multiple sclerosis heterogeneity debate." Ann Neurol 72(3): 385-394.
- Carlton, W. W. (1966). "Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone." Toxicol Appl Pharmacol 8(3): 512-521.
- Chrzanowski, U., S. Bhattarai, M. Scheld, T. Clarner, P. Fallier-Becker, C. Beyer, S. O. Rohr, C. Schmitz, T. Hochstrasser, F. Schweiger, S. Amor, A. Horn-Bochtler, B. Denecke, S. Nyamoya and M. Kipp (2019). "Oligodendrocyte degeneration and concomitant microglia activation directs peripheral immune cells into the forebrain." Neurochem Int 126: 139-153.
- Clarner, T., K. Janssen, L. Nellessen, M. Stangel, T. Skripuletz, B. Krauspe, F. M. Hess, B. Denecke, C. Beutner, B. Linnartz-Gerlach, H. Neumann, L. Vallieres, S. Amor, K. Ohl, K. Tenbrock, C. Beyer and M. Kipp (2015). "CXCL10 triggers early microglial activation in the cuprizone model." J Immunol 194(7): 3400-3413.
- Clarner, T., N. Wiczorek, B. Krauspe, K. Jansen, C. Beyer and M. Kipp (2014). "Astroglial redistribution of aquaporin 4 during spongy degeneration in a Canavan disease mouse model." J Mol Neurosci 53(1): 22-30.
- Crane, J. M., C. Lam, A. Rossi, T. Gupta, J. L. Bennett and A. S. Verkman (2011). "Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays." J Biol Chem 286(18): 16516-16524.
- Dai, J., W. Lin, M. Zheng, Q. Liu, B. He, C. Luo, X. Lu, Z. Pei, H. Su and X. Yao (2017). "Alterations in AQP4 expression and polarization in the course of motor neuron degeneration in SOD1G93A mice." Mol Med Rep 16(2): 1739-1746.
- Doan, V., A. M. Kleindienst, E. J. McMahon, B. R. Long, G. K. Matsushima and L. C. Taylor (2013). "Abbreviated exposure to cuprizone is sufficient to induce demyelination and oligodendrocyte loss." J Neurosci Res 91(3): 363-373.
- Ebers, G. C. (2008). "Environmental factors and multiple sclerosis." Lancet Neurol 7(3): 268-277.
- Eidsvaag, V. A., R. Enger, H. A. Hansson, P. K. Eide and E. A. Nagelhus (2017). "Human and mouse cortical astrocytes differ in aquaporin-4 polarization toward microvessels." Glia 65(6): 964-973.
- Geurts, J. J. and F. Barkhof (2008). "Grey matter pathology in multiple sclerosis." Lancet Neurol 7(9): 841-851.

- Gleiser, C., A. Wagner, P. Fallier-Becker, H. Wolburg, B. Hirt and A. F. Mack (2016). "Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory Organs-A Comparative Perspective." Int J Mol Sci 17(9).
- Gold, R. (2014). "S2e Leitlinie Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose." Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN).
- Gold, R., C. Linington and H. Lassmann (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." Brain 129(Pt 8): 1953-1971.
- Goldberg, J., T. Clarner, C. Beyer and M. Kipp (2015). "Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice." J Mol Neurosci 57(2): 166-175.
- Goldstein, N. S., S. M. Hewitt, C. R. Taylor, H. Yaziji, D. G. Hicks and S. Members of Ad-Hoc Committee On Immunohistochemistry (2007). "Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry." Appl Immunohistochem Mol Morphol 15(2): 124-133.
- Gudi, V., S. Gingele, T. Skripuletz and M. Stangel (2014). "Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned." Front Cell Neurosci 8: 73.
- Henderson, A. P., M. H. Barnett, J. D. Parratt and J. W. Prineas (2009). "Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions." Ann Neurol 66(6): 739-753.
- Herwerth, M., S. R. Kalluri, R. Srivastava, T. Kleele, S. Kenet, Z. Illes, D. Merkler, J. L. Bennett, T. Misgeld and B. Hemmer (2016). "In vivo imaging reveals rapid astrocyte depletion and axon damage in a model of neuromyelitis optica-related pathology." Ann Neurol.
- Hinson, S. R., A. McKeon and V. A. Lennon (2010). "Neurological autoimmunity targeting aquaporin-4." Neuroscience 168(4): 1009-1018.
- 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.
- Ho, J. D., R. Yeh, A. Sandstrom, I. Chorny, W. E. Harries, R. A. Robbins, L. J. Miercke and R. M. Stroud (2009). "Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance." Proc Natl Acad Sci U S A 106(18): 7437-7442.
- Hochstrasser, T., Z. Jiangshan, S. Ruhling, C. Schmitz and M. Kipp (2018). "Do pre-clinical multiple sclerosis models allow us to measure neurodegeneration and clinical progression?" Expert Rev Neurother: 1-3.
- Jaraj, S. J., P. Camparo, H. Boyle, F. Germain, B. Nilsson, F. Petersson and L. Egevad (2009). "Intra- and interobserver reproducibility of interpretation of immunohistochemical stains of prostate cancer." Virchows Arch 455(4): 375-381.
- Jarius, S., D. Franciotta, F. Paul, R. Bergamaschi, P. S. Rommer, K. Ruprecht, M. Ringelstein, O. Aktas, W. Kristoferitsch and B. Wildemann (2012). "Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: sensitivity, specificity, and direct comparison with immunohistochemistry." J Neurol Sci 320(1-2): 32-37.
- Jasiak-Zatonska, M., A. Kalinowska-Lyszczarz, S. Michalak and W. Kozubski (2016). "The Immunology of Neuromyelitis Optica-Current Knowledge, Clinical Implications, Controversies and Future Perspectives." Int J Mol Sci 17(3): 273.
- Kipp, M., T. Clarner, J. Dang, S. Copray and C. Beyer (2009). "The cuprizone animal model: new insights into an old story." Acta Neuropathol 118(6): 723-736.
- Kipp, M., T. Clarner, S. Gingele, F. Pott, S. Amor, P. van der Valk and C. Beyer (2011). "Brain lipid binding protein (FABP7) as modulator of astrocyte function." Physiol Res 60 Suppl 1: S49-60.
- Kipp, M., S. Gingele, F. Pott, T. Clarner, P. van der Valk, B. Denecke, L. Gan, V. Siffrin, F. Zipp, W. Dreher, W. Baumgartner, S. Pfeifenbring, R. Godbout, S. Amor and C. Beyer (2011). "BLBP-expression in astrocytes during experimental demyelination and in human multiple sclerosis lesions." Brain Behav Immun 25(8): 1554-1568.
- Kipp, M., S. Nyamoya, T. Hochstrasser and S. Amor (2017). "Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective." Brain Pathol 27(2): 123-137.
- Kipp, M., P. van der Valk and S. Amor (2012). "Pathology of multiple sclerosis." CNS Neurol Disord Drug Targets 11(5): 506-517.

- Lassmann, H. and M. Bradl (2017). "Multiple sclerosis: experimental models and reality." Acta Neuropathol 133(2): 223-244.
- Lassmann, H., W. Bruck and C. Lucchinetti (2001). "Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy." Trends Mol Med 7(3): 115-121.
- 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.
- Lublin, F. D., S. C. Reingold, J. A. Cohen, G. R. Cutter, P. S. Sorensen, A. J. Thompson, J. S. Wolinsky, L. J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof, B. Bebo, Jr., P. A. Calabresi, M. Clanet, G. Comi, R. J. Fox, M. S. Freedman, A. D. Goodman, M. Inglese, L. Kappos, B. C. Kieseier, J. A. Lincoln, C. Lubetzki, A. E. Miller, X. Montalban, P. W. O'Connor, J. Petkau, C. Pozzilli, R. A. Rudick, M. P. Sormani, O. Stuve, E. Waubant and C. H. Polman (2014). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions." Neurology 83(3): 278-286.
- 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.
- Lyons, J. A., M. San, M. P. Happ and A. H. Cross (1999). "B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide." Eur J Immunol 29(11): 3432-3439.
- Maggi, P., S. M. Macri, M. I. Gaitan, E. Leibovitch, J. E. Wholer, H. L. Knight, M. Ellis, T. Wu, A. C. Silva, L. Massacesi, S. Jacobson, S. Westmoreland and D. S. Reich (2014). "The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter." Ann Neurol 76(4): 594-608.
- McMahon, E. J., K. Suzuki and G. K. Matsushima (2002). "Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier." J Neuroimmunol 130(1-2): 32-45.
- Misu, T., R. Hoftberger, K. Fujihara, I. Wimmer, Y. Takai, S. Nishiyama, I. Nakashima, H. Konno, M. Bradl, F. Garzuly, Y. Itoyama, M. Aoki and H. Lassmann (2013). "Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica." Acta Neuropathol 125(6): 815-827.
- Nagelhus, E. A. and O. P. Ottersen (2013). "Physiological roles of aquaporin-4 in brain." Physiol Rev 93(4): 1543-1562.
- Nicchia, G. P., M. Mastrototaro, A. Rossi, F. Pisani, C. Tortorella, M. Ruggieri, A. Lia, M. Trojano, A. Frigeri and M. Svelto (2009). "Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies." Glia 57(13): 1363-1373.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez and B. G. Weinshenker (2000). "Multiple sclerosis." N Engl J Med 343(13): 938-952.
- Owens, T., I. Bechmann and B. Engelhardt (2008). "Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation." J Neuropathol Exp Neurol 67(12): 1113-1121.
- Papadopoulos, M. C. and A. S. Verkman (2012). "Aquaporin 4 and neuromyelitis optica." Lancet Neurol 11(6): 535-544.
- Ponath, G., C. Park and D. Pitt (2018). "The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis." Front Immunol 9: 217.
- Praet, J., C. Guglielmetti, Z. Berneman, A. Van der Linden and P. Ponsaerts (2014). "Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis." Neurosci Biobehav Rev 47: 485-505.
- Ramagopalan, S. V. and A. D. Sadovnick (2011). "Epidemiology of multiple sclerosis." Neurol Clin 29(2): 207-217.
- Ratelade, J. and A. S. Verkman (2012). "Neuromyelitis optica: aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies." Int J Biochem Cell Biol 44(9): 1519-1530.
- Rezai-Zadeh, K., D. Gate and T. Town (2009). "CNS infiltration of peripheral immune cells: D-Day for neurodegenerative disease?" J Neuroimmune Pharmacol 4(4): 462-475.
- Richards, R. G., F. C. Sampson, S. M. Beard and P. Tappenden (2002). "A review of the natural history and epidemiology of multiple sclerosis: implications for resource allocation and health economic models." Health Technol Assess 6(10): 1-73.

- Rodriguez, M. and B. Scheithauer (1994). "Ultrastructure of multiple sclerosis." Ultrastruct Pathol 18(1-2): 3-13.
- Rohr, S. O., T. Greiner, S. Joost, S. Amor, P. V. Valk, C. Schmitz and M. Kipp (2020). "Aquaporin-4 Expression during Toxic and Autoimmune Demyelination." Cells 9(10).
- Rueden, C. T., J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena and K. W. Eliceiri (2017). "ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data." BMC Bioinformatics 18(1): 529.
- Ruther, B. J., M. Scheld, D. Dreymueller, T. Clarner, E. Kress, L. O. Brandenburg, T. Swartenbroekx, C. Hoornaert, P. Ponsaerts, P. Fallier-Becker, C. Beyer, S. O. Rohr, C. Schmitz, U. Chrzanowski, T. Hochstrasser, S. Nyamoya and M. Kipp (2017). "Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression." Glia 65(12): 1900-1913.
- Saadoun, S., P. Waters, G. P. Owens, J. L. Bennett, A. Vincent and M. C. Papadopoulos (2014). "Neuromyelitis optica MOG-IgG causes reversible lesions in mouse brain." Acta Neuropathol Commun 2: 35.
- Sato, D. K., D. Callegaro, M. A. Lana-Peixoto, P. J. Waters, F. M. de Haidar Jorge, T. Takahashi, I. Nakashima, S. L. Apostolos-Pereira, N. Talim, R. F. Simm, A. M. Lino, T. Misu, M. I. Leite, M. Aoki and K. Fujihara (2014). "Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders." Neurology 82(6): 474-481.
- Scalfari, A., V. Knappertz, G. Cutter, D. S. Goodin, R. Ashton and G. C. Ebers (2013). "Mortality in patients with multiple sclerosis." Neurology 81(2): 184-192.
- Scheld, M., B. J. Ruther, R. Grosse-Veldmann, K. Ohl, K. Tenbrock, D. Dreymuller, P. Fallier-Becker, A. Zendedel, C. Beyer, T. Clarner and M. Kipp (2016). "Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain." J Neurosci 36(4): 1410-1415.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." Nat Methods 9(7): 676-682.
- Schmidt, T., H. Awad, A. Slowik, C. Beyer, M. Kipp and T. Clarner (2013). "Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: topographical aspects of the midline of the corpus callosum." J Mol Neurosci 49(1): 80-88.
- Skripuletz, T., D. Hackstette, K. Bauer, V. Gudi, R. Pul, E. Voss, K. Berger, M. Kipp, W. Baumgartner and M. Stangel (2013). "Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination." Brain 136(Pt 1): 147-167.
- Smith, A. J. and A. S. Verkman (2015). "Superresolution Imaging of Aquaporin-4 Cluster Size in Antibody-Stained Paraffin Brain Sections." Biophys J 109(12): 2511-2522.
- Steiner, E., G. U. Enzmann, S. Lin, S. Ghavampour, M. J. Hannocks, B. Zuber, M. A. Ruegg, L. Sorokin and B. Engelhardt (2012). "Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation." Glia 60(11): 1646-1659.
- Stys, P. K., G. W. Zamponi, J. van Minnen and J. J. Geurts (2012). "Will the real multiple sclerosis please stand up?" Nat Rev Neurosci 13(7): 507-514.
- Taylor, C. R. (2006). "Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology." Biotech Histochem 81(1): 3-12.
- Torkildsen, O., L. A. Brunborg, K. M. Myhr and L. Bo (2008). "The cuprizone model for demyelination." Acta Neurol Scand Suppl 188: 72-76.
- Tzartos, J. S., C. Stergiou, K. Kilidireas, P. Zisimopoulou, T. Thomaidis and S. J. Tzartos (2013). "Anti-aquaporin-1 autoantibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders." PLoS One 8(9): e74773.
- van der Star, B. J., D. Y. Vogel, M. Kipp, F. Puentes, D. Baker and S. Amor (2012). "In vitro and in vivo models of multiple sclerosis." CNS Neurol Disord Drug Targets 11(5): 570-588.
- van Horssen, J., B. P. Brink, H. E. de Vries, P. van der Valk and L. Bo (2007). "The blood-brain barrier in cortical multiple sclerosis lesions." J Neuropathol Exp Neurol 66(4): 321-328.
- van Horssen, J., S. Singh, S. van der Pol, M. Kipp, J. L. Lim, L. Peferoen, W. Gerritsen, E. J. Kooi, M. E. Witte, J. J. Geurts, H. E. de Vries, R. Peferoen-Baert, P. J. van den Elsen, P. van der Valk and S. Amor (2012). "Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation." J Neuroinflammation 9: 156.

- Vollmer, T. (2007). "The natural history of relapses in multiple sclerosis." J Neurol Sci 256 Suppl 1: S5-13.
- Wingerchuk, D. M. (2010). "Neuromyelitis optica spectrum disorders." Continuum (Minneapolis) 16(5 Multiple Sclerosis): 105-121.
- Wingerchuk, D. M., B. Banwell, J. L. Bennett, P. Cabre, W. Carroll, T. Chitnis, J. de Seze, K. Fujihara, B. Greenberg, A. Jacob, S. Jarius, M. Lana-Peixoto, M. Levy, J. H. Simon, S. Tenenbaum, A. L. Traboulsee, P. Waters, K. E. Wellik, B. G. Weinshenker and N. M. O. D. International Panel for (2015). "International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders." Neurology 85(2): 177-189.
- Wingerchuk, D. M., V. A. Lennon, C. F. Lucchinetti, S. J. Pittock and B. G. Weinshenker (2007). "The spectrum of neuromyelitis optica." Lancet Neurol 6(9): 805-815.
- Wolburg-Buchholz, K., A. F. Mack, E. Steiner, F. Pfeiffer, B. Engelhardt and H. Wolburg (2009). "Loss of astrocyte polarity marks blood-brain barrier impairment during experimental autoimmune encephalomyelitis." Acta Neuropathol 118(2): 219-233.
- Wu, X., M. Zhou, H. Ding, S. Xu, C. Wang and P. Chan (2013). "Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces aquaporin-4 autoantibodies in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol 261(1-2): 1-6.
- Yang, J., L. K. Lunde, P. Nuntagij, T. Oguchi, L. M. Camassa, L. N. Nilsson, L. Lannfelt, Y. Xu, M. Amiry-Moghaddam, O. P. Ottersen and R. Torp (2011). "Loss of astrocyte polarization in the tg-ArcSwe mouse model of Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis 27(4): 711-722.
- Zeka, B., M. Hastermann, S. Hochmeister, N. Kogel, N. Kaufmann, K. Schanda, S. Mader, T. Misu, P. Rommer, K. Fujihara, Z. Illes, F. Leutmezer, D. K. Sato, I. Nakashima, M. Reindl, H. Lassmann and M. Bradl (2015). "Highly encephalitogenic aquaporin 4-specific T cells and NMO-IgG jointly orchestrate lesion location and tissue damage in the CNS." Acta Neuropathol 130(6): 783-798.
- Zekeridou, A. and V. A. Lennon (2015). "Aquaporin-4 autoimmunity." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2(4): e110.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
3D	3 Dimensionen
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ANOVA	Analysis of variance
AQP1	Aquaporin 1
AQP4	Aquaporin 4
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
C1q	Komplementfaktor C1q
C57/BL6	Mäuse der Rasse C57 Black 6
CD4	cluster of differentiation 4
CD45	cluster of differentiation 45
CDC	complement-dependent cytodegeneration
CFA	complete Freud's adjuvans
cm	Zentimeter
CTRL	Kontrollgruppe
Cup	Cuprizone
Cup-EAE	Cuprizone mit Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DED	Dynamic Enlargement Distance
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAAT-2	excitatory amino acid transporter 2
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDF	eosinophil-derived neurotoxin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIVE	Humane Immundefizienz Virus Encephalitis
HLA-DR LN3	human leucocyte antigen DR
HRP	horseradish peroxidase
i.d.R.	in der Regel
IF	Immunofluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
INF γ	Interferon gamma
IQR	Interquartil-Range
Kir4.1	Kaliumkanal Kir4.1
l	Liter
LFB/PAS	luxol-fast-blue / periodic acidic schiff
m	Meter
M1	M1-Isoform eines AQP4 Monomers

M23	M23-Isoform eines AQP4 Monomers
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Multiple Sklerose
NaOH	Natronlauge
NGS	normal goat serum
nm	Nanometer
NMO	Neuromyelitis optica
OAP	orthogonal array of particles
PBS	phosphate buffered saline
PLP	proteolipid protein
PML	Progressive Multifocale Leukoencephalopathie
PPMS	primary progressive multiple sclerosis
PTX	Pertussis-Toxin
PVC	perivascular cuff
ROI	region of interest
RRMS	relapsing-remitting multiple sclerosis
RT	Raumtemperatur
SA-POD	Streptavidin-Peroxidase
SPMS	secondary progressive multiple sclerosis
TMB	3,3',5,5'-Tetramethlybenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
USA	United States of America
W	Watt
zB.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 ANHANG

8.1 Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/ Bestellnummer
Alexa Fluor donkey anti-mouse 594 IgG	Life Technologies / A21209
Alexa Fluor goat anti-chiclen 594 IgG	Life Technologies / A11042
Alexa Fluor goat anti-rabbit 488 IgG	Life Technologies / A11008
Alexa Fluor goat anti-rabbit 488 IgG	Life Technologies / A11008
Aqua dest.	Hausleitung
Aquaporin 4 (AQP4) Antibody ELISA [LOT 2KAQE24-A]	DLD Diagnostika GmbH / EA111/96
Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody	Vector / BA-9200
Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody	Vector / BA-1000
Chloralhydrat	ROTH / K318.1
Citronensäure	ROTH / X863.2
Cuprizone	Sigma / C-9012
DAB Stock and Substrate Solution	DAKO / K3468
DAPI (Bisbenzimid H33258)	Sigma / 14530
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck / 1.06580.1000
DPX (DePeX)	Serva / 18243-02
EDTA	AppliChem / A3234,9025
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma-Aldrich / 03685
Eisessig	Merck / 1002440500
enVision+ System –HRP Labelled Polymer Anti-Mouse	DAKO / K4401
Eosin G	Merck / 509 K4687035
Essigsäure, 100%	Merck / 100063
Ethanol	CLN
FluroPreserv Reagent	Millipore / 345787
Formaldehyd 37%	ROTH / CP10.2
HCl, 1mol/l	Merck / 1.09057.1000
Hooke Kit TM MOG35-55/ CFA Emulsion PTX	Hooke Laboratories, Inc. / EK-2110
Leitungswasser	Hausleitung
Lithiumcarbonat	Merck / 5671
Luxol Fast Blue MBS	ROTH / 7709
Mayers Hämatoxillin	Sigma / H3136-25G
NaOH, 40%	ROTH / 4347.1
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄)	Merck / 1.06346.0500
Naphthol AS-D Chloracetat Kit	Sigma-Aldrich / 91C-1KT
Normal Goat Serum	Vector / S-1000
Paraffin	Merck / 1.07158.1000
PBS-Pulver Dulbecco ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom GmbH / L 182-50
Perjodsäure	Merck / 1.00524
Primärer Antikörper AQP4, rabbit, polyclonal	Santa-Cruz / sc20812
Primärer Antikörper GFAP, chicken, polyclonal	abcam / ab4674

Primärer Antikörper HLA-DR (LN3), mouse monoclonal	eBioscience / 14-9956
Primärer Antikörper LAMP1, mouse, monoclonal	Santa-Cruz / sc20011
Primärer Antikörper PLP, mouse, monoclonal	Serotec / MCA839G
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich / 3952016
TRIS (PUFFERAN®)	ROTH / AE 15.2
Triton X-100	Merck / 1.08603.1000
Vectastain Elite ABC Kit	Vector / PK-6100
Wasserstoffperoxid 30%	ROTH / 8070.4
Xylol	VWR / 28975

8.2 Laborutensilien

Bezeichnung	Hersteller / Artikel
Brutschrank für Inkubationen	Thermo Heraeus / T6 50042293
Chirurgische Instrumente	Hammacher Solingen
Deckgläschen	VWR / Deckgläser ECN 631-1572; MENZEL-GLÄSER / Deckgläser
Station für Paraffinguss	Thermo Scientific / Microm EC 350-2
Gel-Serum-Röhrchen für Blutproben	SARSTEDT / 41.1500.005
Mikrowelle für Antigen Freilegung	Exquisit / WP700J17B-2
Nadel für Perfusion	VASUFLO / 40021
Objektträger	VWR / SuperFrost Plus 6310108
Photometer	Molecular Devices / SpectraMax M3
Pipetten	Eppendorf / Research 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl,
Pipettenspitzen	Eppendorf / epT.I.P.S Standard
Schlittenmikrotom	LEICA / SM2000-R
Spritze für Blutentnahme	Henke-Sass Wolf / 1ml-100T LUER
Wasserbad für Mikrotom	LEICA / HI1210
Zentrifuge	Eppendorf / Centrifuge 5417C

8.3 Material Tierhaltung

Bezeichnung	Hersteller / Artikel
Käfig für Versuchstiere	TECNIPLAST / BlueLine, Typ II long 1284
Einstreu	Ssniff / H1505-30
Standardfutter	Ssniff / V1534-300
Nestwolle	Plexx / Nestlets
Maushäuschen	Plexx / Mäuse Iglu Rot
Wechselstation	TECNIPLAST / CS5 Wechselstation 9CS51

8.4 Bedingungen Tierhaltung

Kondition	Details
Hell/Dunkel-Rhythmus	13 Stunden Tag, 11 Stunden Nacht
Luftfeuchtigkeit	40-60%
Temperatur	20 -24 °C
Filter (HEPA)	Hepafilter in allen Lüftungseinheiten
Luftströmung	Überdruck, Luftwechsel pro Stunde: 60-80

9 EIGENE PUBLIKATIONEN

9.1 Fachzeitschriften

Aquaporin-4 expression during toxic and autoimmune demyelination

SO Rohr, T Greiner, S Joost, S Amor, P van der Valk, C Schmitz, M Kipp
Cells. 2020 Sep 28;9(10):2187. doi: 10.3390/cells9102187

Cuprizone-induced oligodendrocyte degeneration triggers peripheral immune cell recruitment into the forebrain

U Chrzanowski, S Bhattarai, M Scheld, T Clarner, P Fallier-Becker, C Beyer, SO Rohr, C Schmitz, T Hochstrasser, F Schweiger, S Amor, A Horn-Bochtler, B Denecke, S Nyamoya, M Kipp
Neurochem Int. 2019 Jun; 126:139-153. doi: 10.1016/j.neuint.2019.03.005

Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression

BJ R  ther, M Scheld, D Dreymueller, T Clarner, E Kress, LO Brandenburg, T Swartenbroekx, C Hoornaert, P Ponsaerts, P Fallier-Becker, C Beyer, SO Rohr, T Hochstrasser, S Nyamoya, C Schmitz, M Kipp
Glia. 2017 Dec; 65(12):1900-1913. doi: 10.1002/glia.23202.

9.2 Kongressbeitr  ge

Cuprizone-induced oligodendrocyte degeneration triggers peripheral immune cell recruitment into the forebrain

U Chrzanowski, S Bhattarai, M Scheld, T Clarner, P Fallier-Becker, C Beyer, SO Rohr, C Schmitz, T Hochstrasser, F Schweiger, S Amor, A Horn-Bochtler, B Denecke, S Nyamoya, M Kipp
Vortrag. 113. Jahresversammlung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft, 2018, Rostock.

Innate immune activation is at the root of NMO-like lesion development

SO Rohr, P Ponsaerts, M Kipp
Poster. ECTRIMS 2017, Paris. (ECTRIMS Online Library. Oct 25, 2017; 199482)

The transcription factor Ddit3/Chop as a regulator of neuroinflammation

M Gottschling, M Scheld, SO Rohr, T Clarner, M Kipp
Poster. ECTRIMS 2016, London. (ECTRIMS Online Library. Sep 15, 2016; 146247)

9.3 Eigenanteil an den Publikationen

Teilinhalte der vorliegenden Arbeit wurden in oben genannten Publikationen bereits veröffentlicht.

Die Veröffentlichung Rohr et al. (2020) basiert auf einem Großteil der durch die vorliegende Studie gewonnenen Daten, Methoden und Ergebnisse; insbesondere zum Verhalten von AQP4 in den vorgestellten Tiermodellen und humanen Präparaten (vgl. Kapitel 3.1; 3.2) sowie den vergleichenden Untersuchungen zu Aspekten der NMO (vgl. Kapitel 3.3). Die Ergebnisse werden im Kontext der Literatur eingehend diskutiert (vgl. Kapitel 4.1). Darüber hinaus wird die für die vorliegende Arbeit neu entwickelte digitale Bildanalysemethode vorgestellt (vgl. Kapitel 2.5; 2.6). Neben dem Durchführen der vorliegenden Arbeit umfasst der Eigenanteil an dieser Publikation: Durchführung, Datenanalyse und Visualisierung von Untersuchungen, Entwicklung und Anwendung der digitalen Bildauswertemethode, Datenverwaltung, Projektkoordination, Erstellung von Teilen des Manuskriptes, Überprüfung und Editierung des Manuskriptes (nach CRediT Taxonomie).

Die Veröffentlichung Chrzanowski et al. (2019) beinhaltet durch die vorliegende Arbeit gewonnene Daten zum Verhalten perivaskulärer Infiltrate in den vorgestellten Tiermodellen (vgl. Kapitel 3.2.1). Neben dem Durchführen der vorliegenden Arbeit umfasst der Eigenanteil an dieser Publikation: Durchführung, Datenanalyse und Visualisierung von Untersuchungen (nach CRediT Taxonomie).

Die Veröffentlichung Ruther et al. (2017) beinhaltet durch die vorliegende Arbeit gewonnene Daten zur Charakterisierung von Cup-EAE-Läsionen, insbesondere zum Auftreten granulozytärer Infiltrate an Läsionen (vgl. Kapitel 3.3.2). Neben dem Durchführen der vorliegenden Arbeit umfasst der Eigenanteil an dieser Publikation: Durchführung, Datenanalyse und Visualisierung von Untersuchungen (nach CRediT Taxonomie).

10 DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp danke ich für seine ausgezeichnete Betreuung, für die vielen Stunden intensiver Diskussion und seine Begeisterung für die Wissenschaft, ohne die diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. Jens Waschke danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Anatomischen Anstalt München durchführen zu können. Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz sowie Herrn Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank danke ich dafür, die Infrastruktur des Lehrstuhls II für die Arbeit nutzen zu dürfen.

Frau Prof. Sandra Amor danke ich für die Zusammenarbeit und die Chance, humane Gehirnschnitte mit in die Untersuchungen einbeziehen zu können.




Ein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der Anatomischen Anstalt München, die dazu beigetragen haben, dieses Thema erfolgreich und mit Freude zu bearbeiten. Insbesondere danke ich Frau Astrid Baltruschat für die Betreuung bei der Immunhistochemie und Robert Haag für die Unterstützung bei Fiji/ImageJ.

Der LMU und der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die ideelle und finanzielle Unterstützung des Promotionsvorhabens.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation während der Promotion und während meines Studiums.

*Sven Olaf Rohr
München, 2020*

11 AFFIDAVIT

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
Eidesstattliche Versicherung				

Rohr, Sven Olaf

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Translational histopathologische Charakterisierung
von Aquaporin 4 im Kontext neuroinflammatorischer
Erkrankungen mittels digitaler Bildanalyse**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14. Januar 2022

Ort, Datum

Sven Olaf Rohr

Unterschrift Doktorand