



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Untersuchungen zu Antikörper-induzierten Läsionen im
Zentralnervensystem von drei verschiedenen
Rattenstämmen“

verfasst von / submitted by

Daniel Hofmann, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 834

Studienrichtung lt. Studienblatt
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium
Molekulare Biologie

Betreut von / Supervisor:

Assoc. Prof. Dr. Monika Bradl

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle aus ungedruckten Quellen, gedruckter Literatur oder aus dem Internet im Wortlaut oder im wesentlichen Inhalt übernommenen Formulierungen und Konzepte gemäß den Richtlinien wissenschaftlicher Arbeiten zitiert, durch Fußnoten gekennzeichnet bzw. mit genauer Quellenangabe kenntlich gemacht habe. Sollte es dennoch Stellen im Text geben, deren Quellenangabe nicht genau nachvollziehbar sind bitte ich um Kontaktaufnahme bei mir.

Danksagungen

Ich bedanke mich bei der gesamten Abteilung Neuroimmunologie am Zentrum für Hirnforschung, welche mich bei jedem Schritt meiner Arbeit unterstützt hat. Vor allem bedanke ich mich bei meiner Betreuerin Assoc. Prof. Dr. Monika Bradl welche mich sehr herzlich empfangen hat und mit viel Geduld mich im Prozess meiner gesamten Masterarbeit begleitet hat. Weiteren Dank spreche ich auch für Ulrike Köck und Marianne Leisser aus für die Anleitung und Hilfe im histologischen Teil meiner Arbeit. Ich bedanke mich auch bei Manuela Paunovic und Magdalini Nigritinou, die mir bei vielen Fragen, Rat und Hilfestellungen gegeben haben.

Ich bedanke mich auch bei meiner Familie und meiner Freundin die mir in der gesamten Zeit meiner Zeit meines Masterstudiums beiseite gestanden sind.

Zusammenfassung

Neuromyelitis optica (NMO) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Bei dieser Krankheit binden Antikörper an den Aquaporin 4 Wasserkanal (AQP-4) und lösen eine Reihe von Immunreaktionen aus, welche zur Zerstörung von Astrozyten und in weiterer Konsequenz zur Demyelinisierung führen. Aufgrund von antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) und komplementabhängiger Zytolyse (CDC) entstehen Läsionen, welche in vielen Regionen des ZNS zu finden sind. Humane Befunde zeigten eine starke Betroffenheit des Rückenmarks und der optischen Nerven und eine im Verhältnis geringere Beteiligung des Hirngewebes.

Wir verglichen unterschiedliche Rattenstämme, denen einmal täglich, über 120 Stunden hinweg, ein hoch-pathogener AQP4-spezifischer Antikörper intra-peritoneal verabreicht wurde. Wir untersuchten die Anzahl und Flächengröße der Läsionen in verschiedenen Gebieten des ZNS.

Unsere Daten zeigten, Unterschiede zwischen den Stämmen, aber auch idente Läsionsmuster, betreffend ihrer Größe und Anzahl in definierten Regionen des ZNS. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass genetische Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Rattenstämmen zu einer unterschiedlichen Immunantwort und in Folge zu einer unterschiedlich starken Betroffenheit bestimmter Regionen führen.

Abstract

Neuromyelitis optica (NMO) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS). In this disease, antibodies bind to the aquaporin 4 water channel (AQP-4) and trigger a series of immune reactions which lead to the destruction of astrocytes and, as a consequence, to demyelination. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) result in lesions that can be found in many regions of the CNS. Human findings showed that the spinal cord and the optic nerves were severely affected and that the brain tissue was relatively less involved.

We compare different strains of rats to which a highly pathogenic AQP4-specific antibody was administered intra-peritoneally once a day for 120 hours. We examined the number and area of the lesions in different areas of the CNS.

Our data showed differences between the strains, but also identical lesion patterns, regarding their size and number in defined regions of the CNS. Our results suggest that genetic differences between the different strains of rats lead to different immune responses and, as a result, to different levels of impact in certain regions.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	2
Danksagungen	3
Zusammenfassung	4
Abstract	5
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis.....	8
Einleitung.....	9
Astrozyten.....	11
AQP-4	13
Komplementsystem, ADCC und CDC.....	14
Neutrophile.....	16
Experimentelle autoimmune encephalomyelitis (EAE).....	18
Methoden.....	21
Tiere.....	21
Antikörper und Versuchsmodell	21
Präparation	21
Bestimmung der Antikörper-Titer im Serum	22
Histologische Untersuchungen	22
Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	23
Klüver Barrera-Färbung	24
Quantitative Analyse	25
Resultate	26
Area Postrema.....	27
Gehirn und Rückenmark	29
Optische Nerven	29
Läsionstypen.....	30

Subpiale Läsionen	30
Perivaskuläre Läsionen	31
ZNS-Areale mit häufiger auftretenden Läsionen	32
Hippocampus	32
Medulla Oblongata	32
Rückenmark.....	33
Vergleich Brown Norway und Lewis Ratten	34
Vergleich Neutrophile	36
Diskussion	37
Abbildungsverzeichnis	41
Tabellenverzeichnis	41
Literaturverzeichnis	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper
AQP-4	Aquaporin 4
AQP4-IgG; AQP4-Ak	Aquaporin 4 Antikörper
BHS	Bluthirnschranke
CDC	Komplement induzierte Zytotoxizität
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
IgG	Immunoglobulin G
LETM	Longitudinal extensive transverse myelitis
LTB4	Leukotriene B4
MAC	Membrane attack complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
NE	Neutrophile Elastase
NETs	Neutrophil extracellular traps
NMO	Neuromyelitis optica
NOS	Nitrous Oxide Systems
OAPs	orthogonal array of particles; orthogonalen Komplexen
ONH	optic nerve head
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
PAMPs	Pathogen-assoziierten molekularen Muster
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	phosphate-buffered paraformaldehyde
PLP	Proteolipid-Protein
PMN	polymorphonuclear leukocytes
ROS	Reactive oxygen species
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einleitung

Neuromyelitis optica (NMO) ist eine Autoimmunerkrankung, welche sich im zentralen Nervensystem (ZNS) manifestiert. Relativ häufig betroffen sind das Rückenmark und der optische Nerv, im Vergleich zum seltener beteiligten Gehirn (Domingues et al. 2004; Wingerchuk et al. 1999). Lange Zeit wurde NMO fälschlicherweise als dramatischerer Verlauf von Multipler Sklerose (MS) diagnostiziert (Wingerchuk et al. 2007; Seze et al. 2002; Wingerchuk et al. 1999). In beiden Krankheiten kommt es zu einer Demyelinisierung und der Bildung chronischer Entzündungsherde.

Auch Entzündungen der optischen Nerven, sind oft Anzeichen beider Krankheiten, jedoch kommen Läsionen am optischen Nerven in NMO signifikant häufiger bilateral vor (Buch et al. 2017; Levin et al. 2013; Kawachi 2016). Folge der Optikusneuritis ist der Verlust des Sehfeldes bis hin zum kompletten Sehverlust. Im Unterschied dazu kommt es bei MS nach Befall der optischen Nerven oftmals zu einer Phase der Rückbildung der Symptome wieder zu einer Verbesserung des Sehvermögens (Levin et al. 2013). Weiters zeigen wesentlich mehr NMO Patienten auch Läsionen am Chiasma als MS Patienten (Storoni et al. 2013; Buch et al. 2017).

MRI Untersuchungen zeigten, weitere Unterschiede einer NMO im Vergleich zu der relativ häufiger auftretenden MS. In NMO kommt es häufiger zu einer longitudinalen extensiven transversen Myelitis (LETM), welche sich über oft mehr als 3 Segmente der Wirbelsäule erstreckt. In der MS sind solche Läsionen auch zu finden, jedoch wesentlich weniger ausgedehnt (Buch et al. 2017).

Nach Entdeckung der Autoantikörper gegen die Aquaporin 4 Wasserkanäle (AQP4-IgG; AQP4-Ak), welche sich in vergleichsweise höherer Dichte auf den Endfüßchen der Astrozyten befinden, wurde die Diagnostizierung wesentlich erleichtert (Lennon et al. 2004). Etwa 70-80% aller NMO Patienten haben AQP4-spezifische Antikörper. Wenn diese an das AQP4 auf Astrozyten binden, kommt es zu einer Komplement-induzierten Zerstörung dieser Zellen und in weiterer Folge zu einer sekundären Demyelinisierung. Dies ist ein weiterer Unterschied zur Multiplen Sklerose, bei der es zu einer primären Entmarkung kommt. (Graber et al. 2008; Bradl et al. 2009; Borisow et al. 2018).

Aufgrund der Öffnung der Bluthirnschranke (BHS) kommt es zum Einwandern weiterer Entzündung induzierender Zellen, wie neutrophile und eosinophile Granulozyten,

zytotoxische Lymphozyten und NK-Zellen. Auch die erhöhte Anzahl der Granulozyten in den frühen Läsionen unterscheidet die NMO von der MS. (Ratelade et al. 2012; Graber et al. 2008).

Frauen sind vergleichsweise öfters betroffen als Männer in einem Verhältnis 7-9:1. Der Eintritt der Krankheit liegt mit durchschnittlich 35-43,8 Jahren (Bizzoco et al. 2009; Sung-Min Kim et al.; Borisow et al. 2018; Flanagan et al. 2016) vergleichsweise höher als bei der MS.

Auch demographisch gibt es Unterschiede. So tritt die Krankheit in den westlichen Ländern bei 0,72 bis 4,4 (Dänemark) von 100000 Einwohnern auf (Abb. 1). Die Prävalenz in karibischen Ländern, sowie auch in Südamerika, ist hingegen signifikant höher. Eine Studie von Flanagan P., 2016, zeigt auf der karibischen Insel Martinique, ein Prävalenz von 10/100000 und in den USA ein Prävalenz von 3,9/100000 (Abb. 1) (Flanagan et al. 2016).

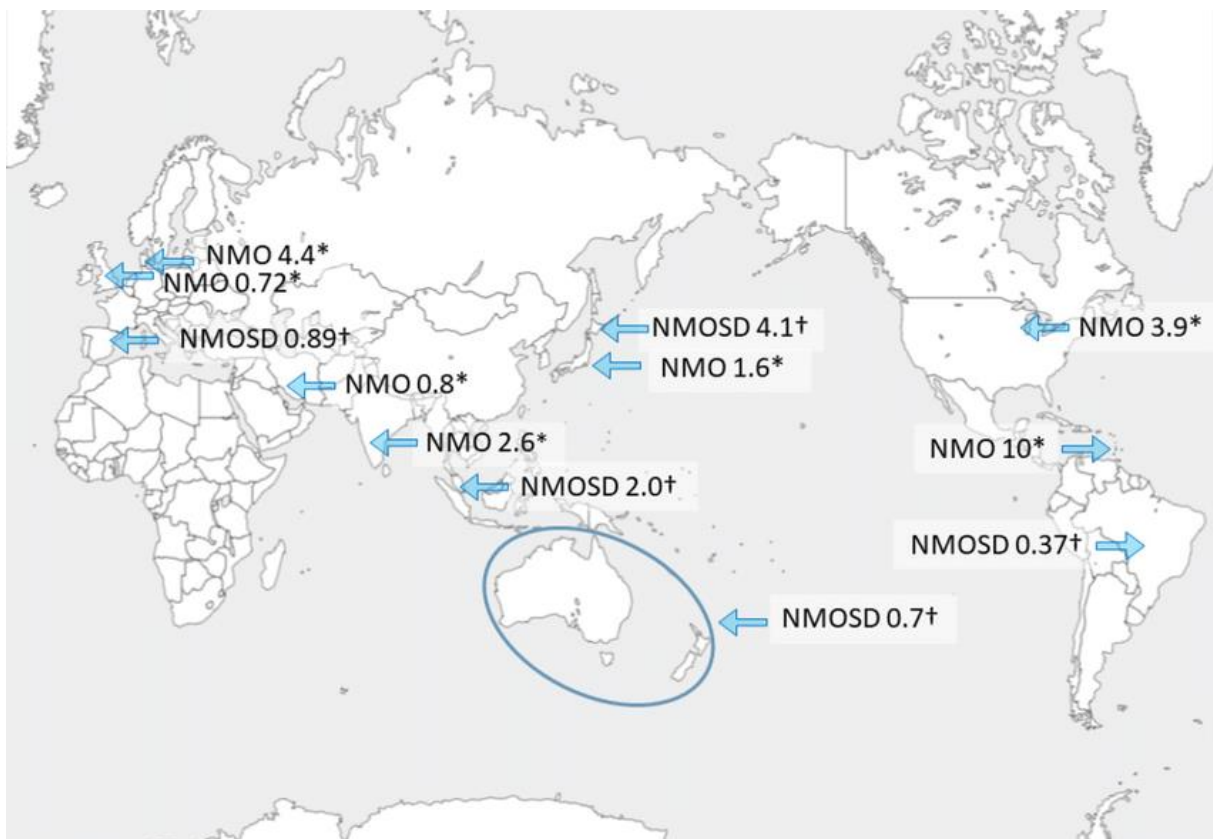


Abb. 1 Regionale Einstellungen werden auf der Karte angezeigt. Die mit (*) gekennzeichneten Zahlen wurden von Wingerchuck (2006) veröffentlicht, die mit (†) vom International Panel for NMO (2015). Die Abbildung wurde entnommen aus der Publikation von Mori M, Kuwabara S, Paul F. Worldwide prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(6):555-556. doi:10.1136/jnnp-2017-317566. Copyright © 2018, BMJ Publishing Group Ltd. License Number 5012500794671

Astrozyten

Astrozyten sind die häufigsten Zellen im zentralen Nervensystem, ca 40% aller vorkommenden Zellen sind Astrozyten (Khakh und Sofroniew 2015). Als spezialisierte Gliazellen befinden sich Astrozyten in jedem Bereich des zentralen Nervensystems (ZNS), lediglich das Verhältnis von Astrozyten und Neuronen variiert. Im cerebralen Cortex sind wesentlich mehr Astrozyten als Neuronen vorhanden, jedoch nicht in Bereichen wie im Cerebellum und dort wo neuronale Zellkörper in höherer Dichte vorkommen. Solche Regionen sind zum Beispiel jene in denen Pyramidenzellen und Granularzellen in höherer Anzahl vorkommen (Khakh und Sofroniew 2015).

Morphologisch unterscheiden sich Astrozyten in fibröse und protoplasmatische Astrozyten (Khakh und Sofroniew 2015; Tabata 2015). Protoplasmatische Astrozyten befinden sich hauptsächlich in der Grauen Substanz und sind stärker verästelt als fibröse Astrozyten welche sich in höherer Anzahl in der weißen Substanz befinden (Khakh und Sofroniew 2015; Tabata 2015). Außerdem sind es überwiegend die protoplastischen Astrozyten, welche die Blutgefäße ummanteln und somit einen wichtigen Teil der Bluthirnschranke (BHS) darstellen (Tabata 2015). Sie formen keine physische Barriere wie die Hirn-Endothelzellen mit ihren Tight junctions, bilden aber die Glia limitans und haben damit eine bedeutende Aufgabe in der Immunmodulation und Regulation der BHS (Sun et al. 2009). Astrozyten beeinflussen Zellen des adaptiven Immunsystems im Gehirn und Interaktionen zwischen den Zelltypen der Bluthirnschranke und können somit die metabolische, physikalische und Transport Barriere der BHS regulieren (Abbott et al. 2006; Kawachi und Lassmann 2017). Mit ihren Zellfortsätzen stehen Astrozyten mit Endothelzellen der BHS in Verbindung und haben eine regulierende Funktion. In-Vitro Kulturen mit Endothelzellen und Astrozyten zeigten eine verstärkte Bindung zwischen den Endothelzellen, als Endothelzell-Monokulturen (Abbott et al. 2006).

Auch die neuronalen Verbindungen, die Synapsen, werden von Astrozyten moduliert in dem sie als Kalium-Buffer fungieren, Neurotransmitter wie Glutamat recyceln und synaptische Verbindungen unterstützen (Sofroniew und Vinters 2010; Harada et al. 2015). Als Glykogenspeicher und Nährstoffverteiler im Gehirn sind Astrozyten für das Gehirn und sämtliche Funktionen sehr wichtig (Sloan und Barres 2014; Tabata 2015; Harada et al. 2015; Sofroniew und Vinters 2010).

Astrozyten exprimieren das saure Gliafaser-Protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) welches als eines der ersten und meist verwendeten Marker-Proteine für Astrozyten gilt und Bestandteil der Intermediärfilamente ist (Sun et al. 2009; Khakh und Sofroniew 2015). Aber auch hier zeigt sich ein Unterschied in der Expression von GFAP in verschiedenen Regionen. Fibröse Astrozyten in der weißen Substanz exprimieren mehr GFAP als protoplasmatische Astrozyten in der grauen Substanz, bei denen GFAP eher an den Endfüßchen zu finden ist (Tabata 2015). Aufgrund der Komplement-induzierten Zerstörung der Astrozyten in Krankheiten wie der NMO, zeigt sich in den Läsionen ein Verlust von GFAP (Hillebrand et al. 2018; Ratelade et al. 2011b; Yang et al. 2016).

Astrozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine hohe Anzahl an AQP-4 Kanälen. Die höchste Dichte davon werden auf den Endfüßchen, welche die Kapillaren und auch größere Blutgefäße ummanteln, exprimiert (Graber et al. 2008).

Im optischen Nerv von Ratten unterscheiden sich die Astrozyten in ihrer Morphologie und AQP-4 Expression, je nach Region. So exprimieren die Astrozyten im Kopf des optischen Nervens wesentlich weniger AQP4 als jene fibrösen Astrozyten im Rest des optischen Nervens (Levin et al. 2013). Außerdem handelt es sich bei Astrozyten im Kopf des optischen Nervens um filamentöse Astrozyten welche sich wesentlich von jenen in weißer und grauer Substanz unterscheiden (Levin et al. 2013; Sofroniew und Vinters 2010). Ein weiterer Unterschied besteht in der Anordnung von Astrozyten im ON. Hier sind Astrozyten wesentlich an der strukturellen Anordnung der Axone, in Bündel, verantwortlich (Sofroniew und Vinters 2010).

Als letzte Barriere der BHS können Astrozyten auch aktiv gegen das Eindringen von Molekülen in das zentrale Nervensystem vorgehen. Astrozyten werden reaktiv, welcher Zustand auch als Astrogliose bezeichnet wird. In diesem Zustand werden verschiedene Gene hochreguliert und es kommt zu einem neurotoxischen und proinflammatorischen Auswurf von Glutamat und ATP, die auch Zellen des Immunsystems aktivieren und so proinflammatorisch wirken können (Khakh und Sofroniew 2015; Harada et al. 2015; Voskuhl et al. 2009).

AQP-4

Aquaporine wurden in den letzten Jahren immer mehr Ziel der Forschung. Mittlerweile wurden 13 verschiedene Kanäle in Säugetieren identifiziert, welche in den verschiedensten Organen, wie Lunge, Muskeln, Nieren und im zentralen Nervensystem exprimiert werden (Oklinski et al. 2016). Aquaporine setzen sich aus 4 Monomeren zusammen, welche zu einem Tetramer angeordnet sind. Die Struktur eines Monomers besteht aus 6 alpha-Helices welche die Membran durchdringen und mit Loops miteinander verbunden sind. Ein jedes Monomer dieser Struktur dient als Wasserkanal (Oklinski et al. 2016). Aquaporine sind wichtig für einen geregelten bidirektionalen Austausch von Wassermolekülen und der Aufrechterhaltung der Homöostase vieler Ionen, welche auch wichtig sind für die synaptische Übertragung im Gehirn (Papadopoulos und Verkman 2013; Gleiser et al. 2016). Im zentralen Nervensystem werden hauptsächlich AQP-1, -4 und -9 exprimiert. AQP-4 ist der

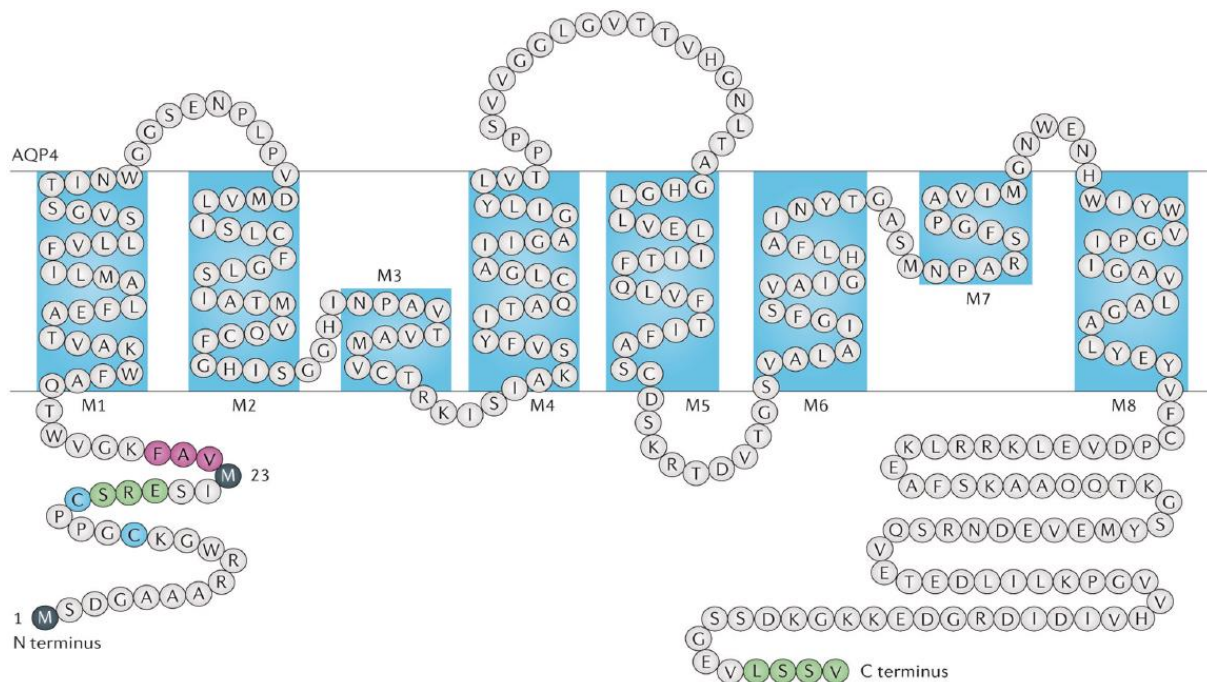


Abb. 2 Das schematische Bild zeigt die Aminosäurestruktur eines AQP-4-Monomers. Die 8 Segmente sind mit M1-M8 nummeriert. Die Aminosäuren M1 und M23 am N-Terminus zeigen die 2 Spleißstellen der Isoformen. Die Abbildung wurde entnommen aus der Publikation von Papadopoulos, Marios C.; Verkman, Alan S. (2013): Aquaporin water channels in the nervous system. In: Nature reviews. Neuroscience 14 (4), S. 265–277. DOI: 10.1038/nrn3468. Copyright © 2013, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. License Number 5012510355359

häufigste Wasserkanal im Gehirn und Rückenmark und befindet sich in hoher Dichte auf den Endfüßchen der protoplasmatischen Astrozyten. Auch auf fibrösen Astrozyten wird AQP-4 exprimiert, jedoch nicht so dicht auf den Endfüßchen sondern auf der gesamten Zelle verteilt (Yang et al. 2016). Auch Müller Zellen, spezialisierte radiale Gliazellen der Retina, sowie Ependymzellen exprimieren AQP-4 (Gleiser et al. 2016).

Die dichte Expressionsrate an den Grenzen, die das Gehirnparenchym von Blut und Liquor trennen, zeigt die wichtige Rolle auf, die diese Moleküle für Wassertransport in und aus dem ZNS spielen (Oklinski et al. 2016; Papadopoulos und Verkman 2013). Studien zeigten, dass es bei einem AQP-4 Knockout in Mäusen zu einer Dysbalance von Wassermolekülen im Gehirn kommt (Oklinski et al. 2016; Hubbard et al. 2018).

AQP-4 Kanäle kommen in 2 Isoformen vor. M1 ist hierbei die größere Variante, welche um 22 Aminosäuren größer ist als die M23 Isoform (Abb. 3) (Saini et al. 2010; Neely et al. 1999). In NMO zeigte sich eine höhere Affinität für Antikörperbindung auf M23 AQP-4 Kanäle. Grund dafür ist, dass M23 Isoformen in höherer Konzentration (3:1), vorkommen und große, „orthogonal array particles“ (OAPs) bilden. (Hubbard et al. 2018; Ratelade et al. 2011a; Crane et al. 2008, 2008).

In der NMO kommt es bei Bindung von AQP-4 spezifischen Antikörper (Abb. 3) (Waters et al. 2014) durch komplementabhängige Toxizität (CDC) und Antikörper-vermittelter zellulärer Toxizität (ADCC) zur Zerstörung von Astrozyten (Hillebrand et al. 2018; Bradl et al. 2018; Lucchinetti et al. 2002). AQP4-Ak kommen hauptsächlich als Immunglobuline der Klasse G (IgG) vor (Yang et al. 2016).

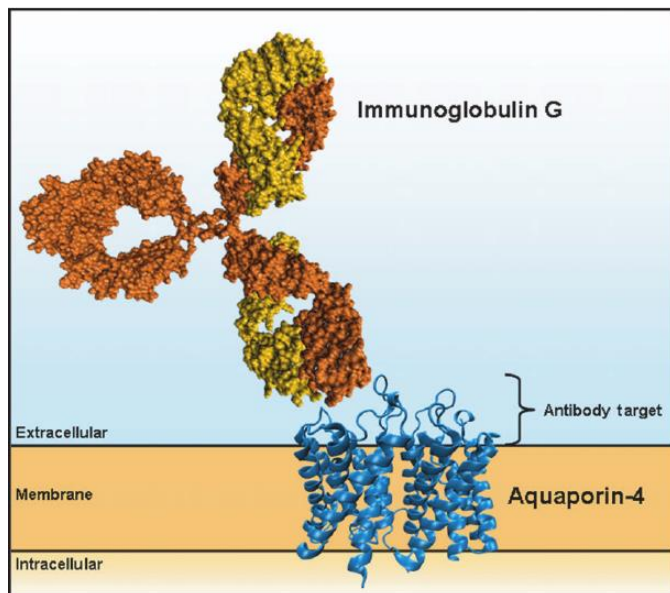


Abb. 3 Der Antikörper bindet an drei der extrazellulären Loops des AQP-4-Kanals, unabhängig davon, um welche Isoform es sich handelt. Die Abbildung wurde entnommen aus der Publikation von Waters, Patrick J.; Pittock, Sean J.; Bennett, Jeffrey L.; Jarius, Sven; Weinshenker, Brian G.; Wingerchuk, Dean M. (2014): Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. In: Clinical & experimental neuroimmunology 5 (3), S. 290–303. DOI: 10.1111/cen3.12107 © 2014 Japanese Society for Neuroimmunology

Komplementsystem, ADCC und CDC

Um eine Zelle, die an einem Antikörper gebunden ist, zu zerstören, sind zwei Wege beschrieben, die sich im Wesentlichen voneinander unterscheiden. Bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) bindet eine Effektor Zelle (e.g. NK-Zelle, dendritische Zellen) an die

konstanten (Fc)-Domäne des Antikörpers (Abb. 4) und zerstört die Zielzelle mit Hilfe sezernierter zytotoxischer Granula oder Proteasen, was zur Lyse der Zelle führt (Diebolder et al. 2014; Vignesh et al. 2017; Wang et al. 2015).

Bei komplementabhängiger Toxizität wird das Komplementsystem aktiviert und es kommt zur Bindung eines Glykoproteins an die Fc-Domäne des Antikörpers (Vignesh et al. 2017). Es gibt 9 verschiedene Glykoproteine, welche in Leber und verschiedenen Zellen des Immunsystems gebildet werden. Nach Bindung des Komplementproteins C1q kommt es zur Aktivierung der gebundenen Serin-Proteasen (C1r und C1s) (Abb. 4) (Vignesh et al. 2017; Diebold et al. 2014). Diese Untereinheiten der Protease des C1 Komplexes aktivieren weitere Komplexe. In Folge kommt es zu weiteren Reaktionen und Spaltungen von Glykoproteinen. Konsequenz der Spaltung der Komplementkomplexe ist die Induktion des sogenannten "membrane attack complexes" (MAC) und damit einhergehender Lyse der Zielzelle (Vignesh et al. 2017).

Eine weitere Auswirkung des Komplementsystems ist die Regulation der Rekrutierung von Neutrophilen. C3a und C5a sind Anaphylatoxine und (relativ) potente Moleküle, welche die Chemotaxis von Neutrophilen fördern und so deren Bindung und Migration in entzündetes Gewebe beeinflussen (Vignesh et al. 2017; Ehrenguber et al. 1994).

Untersuchungen zeigten, dass ADCC und CDC in jeweils unterschiedlichen Regionen für die Zerstörung von Astrozyten und Bildung von Läsionen, in der NMO, verantwortlich sind. In subpialen Läsionen ist ADCC von wesentlicherer Bedeutung als CDC. Periventrikuläre Läsionen sind hingegen oftmals äußerst aggressive Läsionen mit erhöhter Präsenz von Neutrophilen und Makrophagen/aktivierten Mikroglia. In beiden Fällen kommt es zu einem Verlust von GFAP und AQP-4, jedoch ändert sich die Deposition von Komplement C9. Immunhistologische Färbungen mit Antikörpern

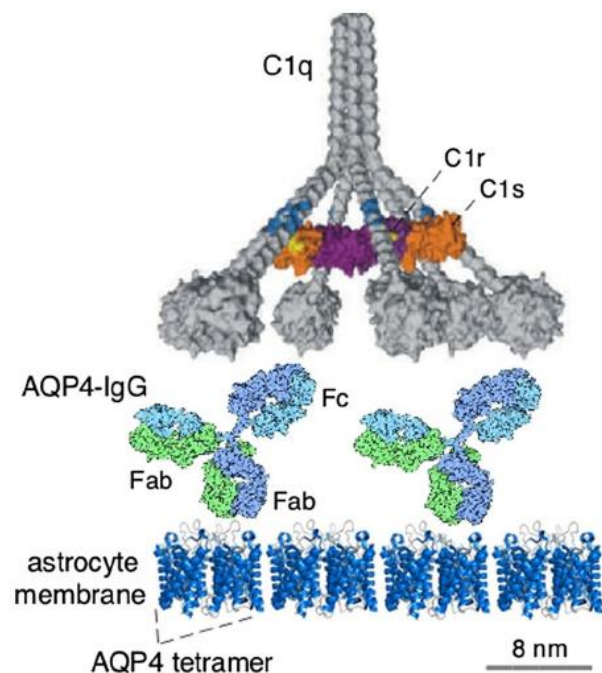


Abb. 4 Das Komplementprotein C1q bindet an den Antikörper (AQP4-IgG), der an AQP-4 gebunden ist. Die relativen Größen der Proteine sind maßstabsgetreu dargestellt. Die Abbildung wurde entnommen aus der Publikation von Duan, Tianjiao; Verkman, Alan S. (2020): *Experimental animal models of aquaporin-4-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders: progress and shortcomings*. In: *Brain pathology* (Zurich, Switzerland) 30 (1), S. 13–25. DOI: 10.1111/bpa.12793. © 2012 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

gegen C9 zeigen in subpialen Läsionen eine weniger starke Färbung als in perivaskulären Läsionen (Hillebrand et al. 2018). Das weist darauf hin, dass ADCC sowie CDC in perivaskulären Läsionen eine Rolle spielen bei der Zerstörung von Astrozyten (Hillebrand et al. 2018).

Die Area postrema wiederum zeigte ein wesentlich anderes Läsionsbild in NMO. Die Ergebnisse von Hillebrand et al. (2018), weisen darauf hin, dass es zu einem relativ frühen Verlust von AQP-4 kommt, wobei GFAP intakt bleibt. Somit zeigt sich in der Area Postrema kein bzw. kaum Schaden durch ADCC oder CDC trotz Bindung der AQP-4 Antikörper (Hillebrand et al. 2018). Auch Müllerzellen, Gliazellen der Netzhaut, welche AQP-4 exprimieren, zeigen AQP-4 Verlust aber auch keine Zerstörung durch ADCC oder CDC (Hillebrand et al. 2018; Zeka et al. 2016). Komplement-regulatorische Proteine verhindern in diesen Bereichen möglicherweise eine massive Destruktion von AQP-4 exprimierenden Zellen (Saadoun und Papadopoulos 2015).

Neutrophile

Neutrophile Granulozyten stellen den größten Anteil an weißen Blutkörperchen dar (Amulic et al. 2012; Mayadas et al. 2014). Aufgrund ihrer, in meist 3 bis 5 Segmente unterteilten Zellkerne, werden Granulozyten oft als polymorphnukleare Leukozyten (PMN) bezeichnet (Amulic et al. 2012). Nach ihrer Bildung und Entwicklung im Knochenmark zirkulieren sie im Blut, bis sie entweder durch Apoptose zugrunde gehen und weiter abgebaut werden, oder aufgrund von proinflammatorischen Signalen ins Gewebe einwandern (Kienle und Lämmermann 2016; Lin und Loré 2017).

Lange wurde eine relativ kurze Lebenszeit von 6 bis 8 Stunden angenommen, doch neuere Forschungsergebnisse zeigten eine doch wesentlich längere Lebenszeit von bis zu 19 Stunden (Amulic et al. 2012; Mayadas et al. 2014).

Signale wie die sogenannten „damage-associated molecular pattern“ (DAMPs), „pathogen-associated molecular pattern molecules“ (PAMPs) und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder Nukleinsäuren von Viren oder Mikroorganismen führen zu einer Aktivierung und Migration dieser Zellen in das Gewebe (Amulic et al. 2012; Tan und Weninger 2017).

Nach einer Aktivierung und Migration in das Gewebe können PMN eine Lebensdauer von 1 bis 5 Tage erreichen. Teile dieser Aktivierung und Signalkaskade sind oftmals

Zytokine oder Chemokine, welche von vielen Zellen im Immunsystem ausgeschüttet werden (Mayadas et al. 2014).

Neutrophile sind wesentlich weniger transkriptionell aktiv als andere weiße Blutkörperchen im Immunsystem, jedoch zeigt sich eine gesteigerte Effizienz aufgrund ihrer hohen Anzahl an migrierenden Zellen in das entzündete Gewebe (Tan und Weninger 2017). Um dieses Schwarmverhalten zu zeigen und eine hohe Zellzahl zu erreichen um Cluster im Gewebe zu bilden, folgen PMN einem chemotaktischen Gradienten und stehen im Verbindung mit anderen bereits residierenden Leukozyten (Kienle und Lämmermann 2016; Tan und Weninger 2017; Lin und Loré 2017).

Als solches Signal wurde in einigen Forschungsarbeiten das Leukotrin B4 (LTB₄) als Molekül beschrieben, welches für die Schwarmbildung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist (Kienle und Lämmermann 2016; Tan und Weninger 2017; Lee et al. 2018). Jedoch nicht nur im Gewebe, sondern auch vaskulär konnten solche Schwärme und Clusterbildungen nachgewiesen werden. Solche Cluster behindern oftmals einen geregelten Blutfluss und führen zu einer Unterversorgung und in Folge, zum Absterben des Gewebes (Lee et al. 2018).

Im Gewebe beeinflussen PMN die Aktivität von Makrophagen und anderen Leukozyten durch Produktion von Zytokinen oder Chemokinen. Aufgrund ihrer oftmals großen Zellzahl führt dies zu starken immunmodulierenden Signalen (Mayadas et al. 2014).

Nach Infiltration in entzündetes Gewebe haben Neutrophile die Möglichkeiten auf körperfremde oder auch körpereigene Moleküle und Antigene zu reagieren. Instrumente dieser Reaktion sind Phagozytose, Generieren sogenannter „reactive oxygene species“ (ROS), Degranulation oder Ausstoßen von „Neutrophil extracellular traps“ (NETs) (Abb. 5) (Tan und Weninger 2017; Mayadas et al. 2014).

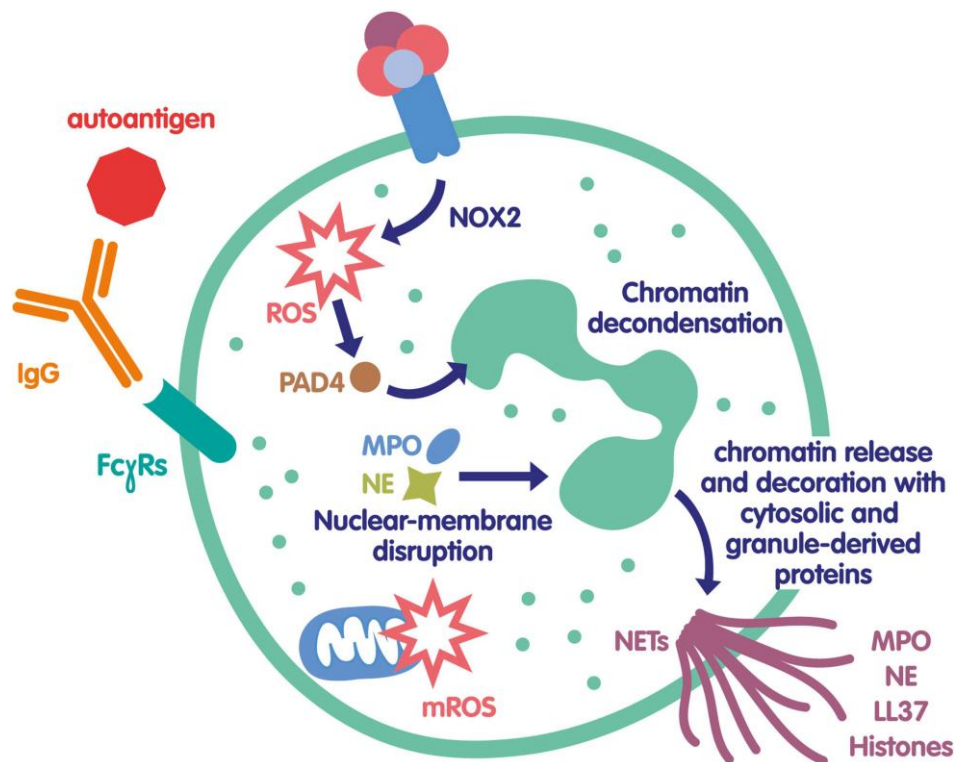


Abb. 5 Bindung eines Neutrophilen an einen Antikörper und die daraus resultierende Reaktionskaskade bis zur NETS-Bildung. Die Abbildung wurde entnommen aus der Publikation von Granger, Vanessa; Peyneau, Marine; Chollet-Martin, Sylvie; Chaisemartin, Luc de (2019): Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 2824. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02824. Copyright © 2019 Granger, Peyneau, Chollet-Martin and de Chaisemartin

Letzteres ist der Ausstoß von Proteasen, Chromatin und Enzymen wie MPO oder neutrophiler Elastase (NE) (Delgado-Rizo et al. 2017; Granger et al. 2019). Die Aktivierung von NETs kann durch eine Vielzahl von Signalen ausgelöst werden. Solche Signale können Chemokine (e.g. IL-8), Zytokine (e.g. TNF) sein oder durch Bakterien und andere Fremdkörper ausgelöst werden. Auch ROS und „Nitric Oxide Systems“ (NOS) können als Initiatoren für NETs fungieren (Granger et al. 2019; Delgado-Rizo et al. 2017).

Experimentelle autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Seit Entdeckung der AQP4-IgG entwickelten sich einige Techniken zur experimentellen Untersuchung von gering konzentrierten NMO in Verwendung von Tiermodellen. Versuche zeigten, dass eine Injektion von Antikörpern gegen AQP-4, die aus NMO Patienten gewonnen wurden, in gesunden Ratten, innerhalb eines 1-2-tägigen Beobachtungszeitraumes, keine Läsionen mit Astrozytenverlust, bilden

können. So wurden, anhand der Vermutung, dass die Antikörper ohne Hilfe nicht ins Gehirn kommen können, Modelle entwickelt welche auf dieser Annahme aufbauen. Verantwortlich für den Eintritt in das Gehirn machte man aktivierte T-Zellen, welche spezifisch für ein ZNS Protein sind. Man entwickelte das Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) Versuchsmodell, bei denen, aktivierte T-Zellen spezifisch für ein ZNS-Myelinprotein verabreicht werden, um die Bluthirnschranke durchlässig zu machen, was den Zugang der Antikörper ermöglicht (Lassmann et al. 1988). Als eine weitere Möglichkeit die BHS zu öffnen, zeigte sich die aktive Immunisierung mit ZNS-spezifischen Proteinen wie zum Beispiel Basisches Myelinprotein (MBP) oder Proteolipid-Protein (PLP) (Linington et al. 1989). Es wurden bereits einige Studien durchgeführt, welche versuchten mit Hilfe von EAE Tiermodellen, NMO zu simulieren. Viele der Studien erzeugten Läsionen, ähnlich der pathologischen Veränderungen von humanen Patienten, doch es konnte nie ein volles Spektrum von humanen Veränderungen in Tiermodellen simuliert werden.

Wie wichtig eine offene BHS ist, um den Zugang von Immunzellen und Komponenten einer Immunantwort zu gewährleisten, zeigten auch Versuche, bei denen humane Antikörper interkranial in Maus Gehirne injiziert wurden und Läsionen erst dann entstanden, wenn auch humane Komplementkomplex hinzugegeben wurden (Saadoun et al. 2010). Ein Versuch von Ratalade (2011) zeigte, dass AQP4-IgG ohne T-Zellen, spezifisch für ein Hirn-Peptid, lediglich in der Area postrema Läsionen verursachen. Die Area Postrema ist ein Bereiche in dem die BHS sehr durchlässig ist.

Hillebrandt et al. (2018) zeigte in ihrem Experiment mit RNU Ratten, dass die Entstehung von Läsionen nicht unbedingt T-Zellen, welche im Thymus gereift sind, benötigt. RNU-Nacktratten besitzen ein solches Organ nicht und werden auch somit thymusaplastisch bezeichnet. Aufgrund dieser genetisch hervorgerufenen Veränderung haben diese Ratten eine eingeschränkte Immunantwort und keine Reifung von CD4+ T-Lymphozyten im Thymus.

In vielen der Versuche fehlen jedoch NMO-typische Läsionen im optischen Nerv. Nur in Studien bei denen Injektionen von AQP4-IgG und T-Zellen, spezifisch für ein Hirnpeptid, intravitreal oder direkt unter die Optikusscheide verabreicht wurden, konnte man Läsionen am optischen Nerv feststellen.

Die folgende Studie zielt darauf ab zu versuchen, ob Unterschiede der Läsionen hinsichtlich der Genetik verschiedener Rattenstämme entstehen. Wir vergleichen hierzu drei unterschiedliche Rattenstämme und Auftreten von Läsionen. Auch die Migration von Leukozyten und weitere Veränderungen im inflammatorischen Gewebe werden verglichen.

Methoden

Tiere

Die verwendeten Tiere dieser Studie waren 7 bis 8 Wochen alte Brown Norway Ratten (BN/Crl) von Charles River Wiga (Sulzfeld, Deutschland). Gehalten wurden die Tiere, unter nationalen und internationalen standardisierten Bedingungen in den dezentralen Einrichtungen des Zentrum für biomedizinische Forschung. Die Lewis Ratten und RNU Ratten, welche als Vergleich dienten, wurden unter denselben Bedingungen gehalten, wie bereits in der Studie von Hillebrand et al. (2018) beschrieben. Alle Experimente wurden von der Ethikkommission der medizinischen Universität genehmigt und vom Ministerium für Wissenschaft und Forschung (GZ:66.009/0107-V/3b/2018 und GZ:66.009/0152-V/3b/2019) lizenziert.

Antikörper und Versuchsmodell

Für die Studie wurde ein hoch pathogener, monoklonaler Antikörper für AQP-4 (E5415A) verwendet, welcher aus der Maus stammt (Kurosawa et al. 2015). Die Konzentration des Antikörpers, in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS), betrug 1mg/ml. Der Antikörper wurde an 5 aneinander folgenden Tagen (120h), täglich in einem 24 Stunden Rhythmus verabreicht. Zuvor wurden die Tiere mit Isofluran anästhesiert und der Antikörper wurde peritoneal verabreicht.

Präparation

Nach 120 Stunden wurden die Tiere mit CO₂ getötet und mit kaltem 4% Paraformaldehyd (PFA), durch Injektion in die Herzspitze perfundiert, um das Gewebe zu fixieren. Danach wurden die Nieren, der Schädel und die Wirbelsäule für weitere 24 Stunden in 4% PFA nachfixiert. Im weiteren Ablauf wurden das Gehirn, das Rückenmark, die Augen und der optische Nerv mit Chiasma entnommen.

Das Gehirn wurde in 7 Teile geschnitten und die Medulla oblongata mit der Area postrema wurde in eine separate Kassette gelegt. Das Rückenmark wurde in 2mm lange Stücke, möglichst gerade, geschnitten. Die Augen wurden vorsichtig aus dem Schädel herausgenommen und in 2 Hälften geteilt so dass der Kopf des optischen

Nerven der Länge nach in 2 Teile geteilt wurde. Der Rest des optischen Nervs wurde mit dem Chiasma in eine separate Kassette gelegt.

Bei allen Schritten wurde darauf geachtet, dass das Gewebe mit PBS feucht gehalten wurde um eine Austrocknung und eine Schädigung des Gewebes zu verhindern.

Das Gewebe wurde in Kassetten gelegt, entwässert und in Paraffin eingebettet. Das paraffinierte Gewebe wurde in Folge mit einem Mikrotom in ca. 4µm dicke Scheiben geschnitten und für weitere mikroskopische Untersuchungen auf Objektträger aufgezogen.

Bestimmung der Antikörper-Titer im Serum

Blut wurde mit einer Spritze direkt aus dem Herz des kurz zuvor getöteten Tiere entnommen. Die Blut-Proben wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde gelagert. Somit koagulierte das Blut und in weiteren Schritten wurden die festen und flüssigen Anteile des Blutes mit einer Zentrifuge, in 2 Schritten, voneinander getrennt (1x 4°C/15min/1500RCF, 1x 4°C/10min/1500RCF) und das Serum gewonnen. Alle aliquotierten Seren wurden bei -20°C gelagert und an die Medizinische Universität Innsbruck zu Prof. Mag. Dr. Markus Reindl und Mag. Katrin Schanda geschickt. Dort wurde mit Hilfe eines ELISA-Kit und eines Sekundärantikörpers (anti-Maus Antikörper, Alexa 594, A-11005, Invitrogen), der Titer der Maus Antikörper im Rattenserum bestimmt.

Histologische Untersuchungen

Für die weitere Bearbeitung und Färbungen der 2-4µm dicken mikroskopischen Präparate werden diese in Xylol (2x30min) endparaffiniert und in 96% Ethanol überführt. Durch Zugabe von Hydrogen-Peroxid (finale Konzentration 0.2% für 30 Minuten bei Raumtemperatur) wurde die endogene Peroxidase blockiert. Anschließend wurden die Proben in einer absteigenden Serie von Ethanol rehydriert (2x 96%, 70%, 50%) bis sie in destilliertes Wasser kamen. Im nächsten Schritt kommt es auf die spezifische Färbung an, ob die Präparate eine weitere Vorbehandlung benötigen. Bei einer solchen Vorbehandlung müssen die Proben entweder mit Hitze oder einem enzymatischen Verdau behandelt werden. Bei der Behandlung mit Hitze kommen die Proben in einen Behälter mit EDTA Puffer (8.0 pH) und werden in einem

gewöhnlichen Haushaltsdämpfer für eine Stunde erwärmt. Bei der Behandlung durch enzymatischen Verdau kommen die Präparate in eine 0,03% Protease Lösung für 15 min bei 37°C. Danach muss die Reaktion in PBS gestoppt werden.

Die Präparate werden anschließend 5-mal mit TBS ausgespült und für 20 Minuten in 10%FCS/DAKO-Puffer inkubiert um unspezifische Hintergrundfärbungen zu blockieren. Im weiteren Schritt wird der primäre Antikörper (Tabelle 1), je nach Vorgabe des Herstellers, in 10%FCS/DAKO-Puffer verdünnt und auf der Oberfläche der Proben gleichmäßig verteilt und bei 4 °C über die Nacht gelagert.

Am nächsten Tag wird der Objektträger wieder 3-5 mal mit TBS abgespült und anschließend inkubiert das Präparat mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Tabelle 2) in 10% FCS/DAKO-Puffer für eine Stunde. Im nächsten Schritt wird wieder mit TBS abgespült und nun mit Avidin-Peroxidase (1mg gelöst in 1ml destilliertem Wasser) im Verhältnis 1:100 in 10%FCS/DAKO-Puffer für eine Stunde inkubiert.

Anschließend wird mit DAB entwickelt und bei ausreichendem Kontrast wird die Reaktion mit Wasser oder TBS gestoppt. Gegengefärbt wird ca. 20 Sekunden mit Häkalaun und differenziert in HCL-EtOH. Zuletzt kommen die Objektträger für 5 Minuten in die Scott'sche Lösung um zu bläuen und werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 3x96%) entwässert bis sie zum Schluss in n-Butylacetat (Ester) kommen. Versiegelt werden die Objektträger mit Eukitt. Wie bei der Herstellung der Präparate ist es auch hier wichtig, dass die Schnitte immer feucht gehalten werden.

[Hämatoxylin/Eosin-Färbung](#)

Die 2-4µm dicken mikroskopischen Präparate werden in Xylol (2x 30min) endparaffiniert und in einer absteigenden Serie von Ethanol rehydriert (2x 96%, 70%, 50. Im weiteren Schritt kommen die Präparate in destilliertes Wasser und weiter 5 Minuten in die Mayer's Häkalaun Lösung. Danach müssen die Präparate gewaschen werden, in HCL-EtOH gegeben um zu differenzieren und ein weiteres Mal mit H₂O gewaschen werden. Im nächsten Schritt werden die Präparate in einer Scott'schen Lösung inkubiert, gewaschen in destilliertem Wasser und für 3 min mit Eosin Lösung inkubiert, für die Färbung des Zellplasmas (rot). Zuletzt werden die Objektträger mit dem Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 3x96%) entwässert bis

sie zum Schluss in n-Butylacetat (Ester) kommen. Versiegelt werden die Objektträger mit Eukitt.

Klüver Barrera-Färbung

Die Objektträger werden in Xylol (2x 30min) endparaaffiniert und in einer absteigenden Serie von Ethanol rehydriert (2x 96%, 70%, 50%). Anschließend inkubieren die Objektträger mit dem Gewebe über Nacht in 0,1% Luxol Fast Blue bei 56°C. Am nächsten Tag werden die Objektträger mit 96% EtOH abgewaschen und abgespült. Anschließend kommen die Objektträger mit dem Gewebe für 5 Minuten in eine 0,1% wässrige Lithiumcarbonatlösung. Im folgenden Schritt wird mit 70% EtOH differenziert bis der Untergrund fast entfärbt ist und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Objektträger kommen für 10 Minuten in 0,8% Perjodsäure und nach einem weiteren Abspülvorgang für 20 Minuten in Schiff'sches Reagenz. Zum Schluss kommen die Objektträger noch 3x je 2 Minuten in eine Sulfidwaschlösung um danach entwässert eingedeckt zu werden.

Tabelle 1 Primärantikörper

Antikörper	Wirt	Zielprotein	Verdünnung	Vorbehandlung	Entwicklung
ED1	Maus	rat CD68	1:10000	EDTA, pH 8,5	DAB
CD3	Hase	CD3	1:2000	EDTA, pH 8,5	DAB
AQP-4	Hase	AQP-4	1:250	x	DAB
C9neo	Hase	C9neo	1:2000	Protease, 0,03%	AEC
GFAP	Hase	GFAP	1:3000	EDTA, pH 8,5	DAB
MBP	Hase	MBP	1:2500	X	DAB
Iba-1	Hase		1:3000	EDTA, pH 8,5	DAB

Tabelle 2 Sekundärantikörper

Antikörper	Wirt	Zielprotein	Verdünnung	Vorbehandlung	Entwicklung
α-Maus IgG*	Esel	Maus IgG	1:500	x	DAB
α-Ratte IgG*	Esel	Ratte IgG	1:500	x	DAB
α-Hase IgG	Esel	Hase IgG	1:1000	x	

*Diese Sekundärantikörper wurden auch als Primärantikörper verwendet.

Quantitative Analyse

Die Gehirnschnitte wurden mit einem speziellen Scanner für Objektträger digitalisiert und mit Hilfe der Computerprogramme „NDP.view2“ und „ImagePro“ weiter analysiert. Flächen (in μm^2) sowie Anzahl der Läsionen mit AQP-4 Verlust konnten so ausgewertet werden. Sämtliche Daten wurden zum Vergleich in eine Exceldatei eingegeben. Graphiken und statische Berechnungen wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 7 generiert. Für die statistische Analyse wurde der Kruskal-Wallis Test angewendet. Mit diesem Test wurde die Verteilungen der Mittelwerte (Varianz) verschiedener Gruppen miteinander verglichen um eine Signifikanz in der Varianz zu finden. Signifikante Werte wurden mit ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

Resultate

Der Versuch zeigte, dass der Antikörper in EAE Tiermodellen Läsionen erzeugen kann, wie sie sehr häufig auch bei humanen Patienten vorkommen. Die Studie ist eine vergleichende Studie verschiedener Rattenstämme (Brown Norway, RNU und Lewis Ratte) um einen genetischen Aspekt im Bezug der Bildung und Ausprägung der Läsionen zu untersuchen. Angesichts der Ergebnisse zeigte sich deutlich ein Unterschied in Fläche und Anzahl der Läsionen, mit AQP-4 Verlust, in verschiedenen Regionen von Gehirn und Rückenmark.

Wenn man die von Läsionen betroffenen Areale im Gehirn miteinander verglich und die Zahl der Tiere pro Stamm betrachtete, welche in diesen Hirnarealen Läsionen bildeten, ließen sich einige Hotspots erkennen. Diese Hotspots wiesen in allen drei Rattenstämmen Läsionen auf. Zugleich konnten Läsionen in Hirnarealen gefunden werden, die eher stammspezifisch zuzuordnen waren.

Betrachtete man den Neokortex und den Hippocampus, zeigte sich, dass ein Großteil aller drei Rattenstämme, welche miteinander verglichen wurden, Läsionen in diesen Bereichen aufwiesen (Tabelle 3). Die Rückenmarkssegmente der Lendenwirbel und Thorakalwirbel waren bei einem Großteil der Tiere betroffen (Tabelle 3). Lediglich in den Brown Norway (BN) Ratten zeigte sich eine höhere Zahl an betroffenen Individuen, welche in den zervikalen Bereichen des Rückenmarks Läsionen aufwiesen (Tabelle 3). Betrachtete man den optischen Nerv und das Chiasma, zeigte nur ein Individuum des BN Rattenstammes eine Läsion. Alle anderen Individuen waren in diesen Bereichen unauffällig (Tabelle 3).

Alle Rattenstämme zeigten in jedem Versuchstier einen Verlust von AQP-4, in zumindest einem zirkumventrikulären Organ. Am stärksten betroffen war die Area postrema, bei der 100% der Tiere einen Verlust von AQP-4 aufwiesen (Abb. 6D). Da das subfornikale Organ (Abbildung 6B) und das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) (Abb. 6B) nicht auf derselben

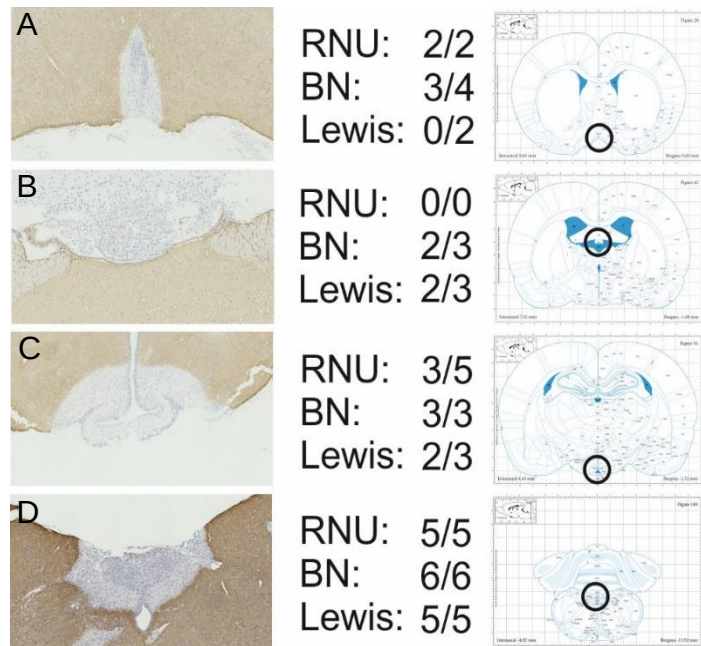


Abb. 6 Vergleich der Tiere welche einen Verlust an AQP4 in einem oder mehreren zirkumventrikulären Organen zeigten. **A** Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), **B** subfornikales Organ, **C** Eminentia mediana, **D** Area postrema. Gefärbt wurde mit einem Antikörper gegen AQP-4 (braun). Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt für die Färbung der Zellkerne (blau). Als schematische Darstellung der Läsionen diente der von Paxinos und Watson entwickelte Hirnatlas für Ratten (Paxinos und Watson 2006). Klicken oder tippen Sie hier, um Text einzugeben..

Schnittebene liegen und selten beides auf einem Objektträger zu finden ist, konnten auf einigen Objektträgern nur eines von beiden zirkumventrikulären

Organen untersucht werden. Daher konnten in diesem zirkumventrikulären Organ keine Läsionen im Lewis Rattenstamm (Abb. 6A, 0/2) gefunden werden, jedoch eine auffällig höhere Anzahl an Tieren mit Läsionen im subfornikalen Organ (Abb. 6B, 2/3).

Area Postrema

Wie auch schon von Hillebrandt et al. (2018) in der Studie mit den Stämmen der Lewis und RNU Ratten publiziert wurde, zeigte auch der Stamm der BN Ratten im Bereich der Area postrema und Area subpostrema, in Bezug auf Verlust von AQP-4 und GFAP, ähnliche immunhistologische Färbungen.

Färbungen mit Antikörper gegen AQP-4 und GFAP zeigten in diesem Bereich, dass es zwar zu einem Verlust von AQP-4 kommt, jedoch wies intaktes GFAP auf Astrozyten hin, welche durch Bindung von Antikörpern nicht zerstört wurden (Abb. 9D). Weiters zeigte die Färbung von Komplement/C9neo, dass ADCC und CDC in der Area postrema kaum eine Rolle spielen (Abb. 9J, 11B). Betrachtete man die ED1+ Zellen, konnte man sehr wohl einen Unterschied zwischen den Stämmen erkennen. Die BN Ratten zeigten in der Area postrema eine signifikant stärkere Einwanderung von

Makrophagen als die beiden anderen Rattenstämme (Abb. 14). Auch im Bereich der Subpostrema wiesen Makrophagen in der BN Ratte einen höheren Wert auf. Eine erhöhte Anzahl von Makrophagen am Läsionsrand wiesen alle drei Stämme auf (Abb. 14Ba, Bb, Bc). Neutrophile Granulozyten waren in der Area postrema kaum bis gar nicht zu finden.

Tabelle 3 Antikörpertiter, Neurologische Symptome und Regionen mit Läsionen in den Versuchstieren des BN, RNU und Lewis Rattenstammes nach 120h Administration des AQP-4 Antikörpers.

	Brown Norway 120h αAQP4 ab	RNU 120h αAQP4 ab	Lewis rat 120h αAQP4 ab
AQP4-Körper Titer	450,560	382,293	851,968
Neurologische Symptome	3/8 starben bevor sie präpariert wurden; 2/8 hatten Problem mit der Balance; 1/8 hatte einen geringeren Schwanz Tonus; 2/8 waren klinisch normal, 2/8 konnten nicht untersucht werden	2/5 waren kraftlos; 1/5 hatten scheinbar schmerzhafte Empfindungen in den Vorderpfoten (möglicherweise korreliert mit Schmerzen in der NMO); 2/5 waren klinisch normal (Hillebrand et al. 2018)	1/5 hatten übermäßigen Speichelfluss (korreliert mit Übelkeit/Erbrechen); 1/5 hatten Problem mit der Balance; 1/5 waren unfähig, die Hinterbeine beim Gehen richtig zu platzieren; 2/5 waren klinisch normal (Hillebrand et al. 2018)
Anzahl der Ratten mit Läsionen im optischen System			
Optische Nerven	1/6	0/5	0/5
Chiasma	1/6	0/2	0/3
Anzahl der Ratten mit Läsionen im Gehirn			
Subpial	5/6	4/5	1/5
Neocortex	5/6	4/5	2/5
Corpus callosum	2/6	2/5	1/5
Hypothalamus	4/6	2/5	0/5
Hippocampus	5/6	4/5	2/5
Eminentia mediana	3/3	3/4	2/3
Striatum	1/6	2/5	1/5
Hirnstamm	1/6	1/5	1/5
Periventriculäres grau	2/6	2/5	0/5
Septum	3/4	3/5	0/5
Thalamus	5/6	4/5	1/5
Cerebellum	1/6	2/5	1/5
Medulla ohne Area postrema	4/6	2/5	2/5
Area postrema	6/6	5/5	5/5
Anzahl der Ratten mit Läsionen im Rückenmark			
L1-S4	3/5	2/4	3/5
T1-T10	2/5	1/4	3/5
C1-C7	3/5	0/4	1/5

Gehirn und Rückenmark

Verglich man die Anzahl, sowie die Fläche der Läsionen mit AQP-4 Verlust im Gehirn und Rückenmark (ohne Medulla), in ihrer prozentuellen Verteilung und verglich dies wiederum mit allen drei Tierstämmen, ließ sich ein deutlicher Unterschied erkennen. RNU Ratten wiesen einen deutlich größeren prozentuellen Anteil, aller Läsionen innerhalb des Stammes, im Gehirn auf (92,8%) (Abb. 7A).

Verglich man anschließend alle drei Ratten Stämme miteinander, zeigte sich ebenfalls, dass die prozentuelle Verteilung der Anzahl sowie Fläche der Läsionen im Hirn und Rückenmark unterschiedlich war (Abb. 7A). Der Lewis Rattenstamm zeigte einen stärkeren Verlust an AQP-4 im Rückenmark im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen (Anzahl 39,3%; Fläche 31,2%) (Abb. 7). Wohingegen der Stamm der Brown Norway Ratte eine nur halb so starke Bildung von Läsionen im Rückenmark hatte (Anzahl 18,7%; Fläche 15,0%). Der RNU Rattenstamm wies lediglich 7,7% in der Anzahl der Läsionen und 2,2% in der Fläche auf (Abbildung 7).

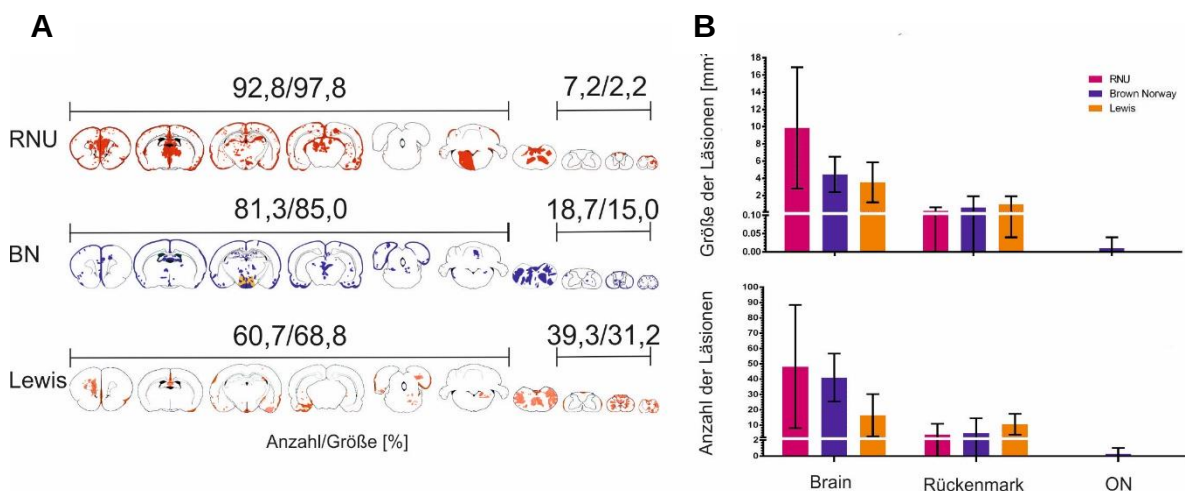


Abb. 7 Vergleich der Läsionsverteilung im ZNS. **A** Zeigt die Prozentuelle Verteilung der Anzahl und Fläche aller Läsionen im Gehirn und Rückenmark. Die Medulla wurde aus diesem Vergleich ausgenommen. Als schematische Darstellung der Läsionen diente der von Paxinos und Watson entwickelte Hirnatlas für Ratten (Paxinos und Watson 2006). **B** Zeigt die Verteilung der Fläche in mm² und die der Anzahl aller Läsionen im ZNS. Die Rattenstämme, RNU (n=5, rot), BN (n=6, blau), Lewis (n=5, orange) wurden an 5 aufeinander folgenden Tagen (120h) mit einem AQP4-ab behandelt und die Flächen des AQP4 Verlust wurde ausgewertet und quantifiziert.

Optische Nerven

Einen wesentlichen Unterschied des BN Rattenstammes, im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen, machte eine Läsion im optischen Nerv und im Chiasma aus (Abb. 8). Mittels verschiedener Färbungen zeigten sich subpiale als auch perivaskuläre

Läsionen. Auch die für Läsionen typischen Zellen (Makrophagen und Neutrophile) und Proteine des Komplementsystem waren in den Läsionen zu finden (Abb. 8 Bb, Bc).

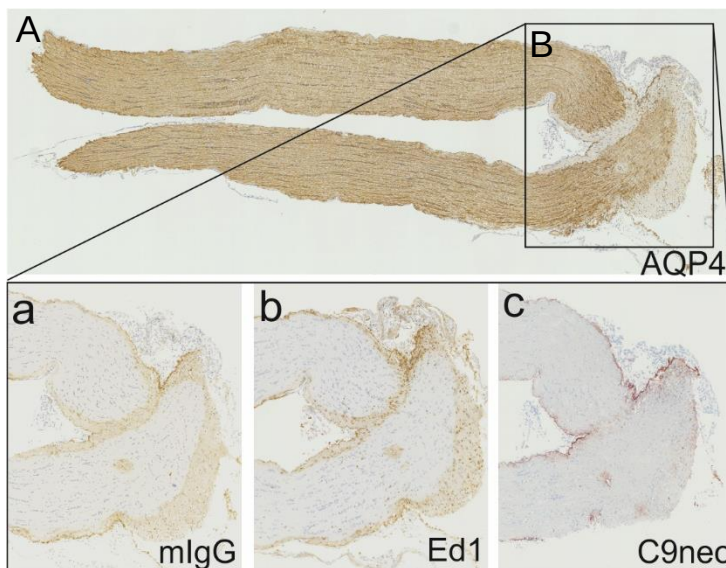


Abb. 8 Läsionen im optischen Nerv in einem Versuchstier des BN Rattenstammes **A** zeigt den Verlust von AQP4 (braun) am optischen Nerven und Chiasma. **B** Die Gewebeschnitte wurden gefärbt mit Antikörper gegen Maus IgG (**a**), gegen ED1 positive Zellen (braun) (**b**) und gegen Komplement C9neo (rot) (**c**). Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt für die Färbung der Zellkerne (blau).

Läsionstypen

Subpiale Läsionen

Betrachtete man die verschiedenen Regionen im Gehirn, ließ sich eine deutliche Ungleichheit der Läsionen in Fläche und Anzahl erkennen (Abb. 12). Schwierig erwies sich die Zuordnung großer Läsionen zu einem bestimmten Gebiet im Gehirn. Große Läsionen, welche oft eindeutig einen meningealen Ursprung hatten, jedoch aufgrund ihrer Größe auch andere Gebiete miteinbezogen, zählten entsprechend ihres Ursprungs zu den subpialen Läsionen, was zu einer im Vergleich der Fläche geringeren Anzahl der Läsionen führte. Beispielsweise hatten RNU Ratten einen relativ hohen Wert der durchschnittlichen Fläche in subpialen Läsionen. Jedoch vergleichsweise eine relativ geringe durchschnittliche Anzahl an Läsionen. Dies war auch zurück zu führen auf die großen Läsionen entlang der Meningen und der möglichen hohen Wahrscheinlichkeit, dass viele dieser Läsionen im Laufe des Krankheitsverlaufs fusionierten und zu einer großflächigen subpialen Läsion wurden. Im Bereich des Neokortex zeigte sich ein gegenteiliger Effekt, bei welchem eine hohe Anzahl an kleinen perivaskulären Läsionen zu einer dazu relativ geringeren Fläche führte.

Die Färbung auf Komplement/C9 zeigte im Brown Norway Rattenstamm denselben physiologischen Mechanismus wie in den beiden anderen Rattenstämme (Hillebrand

et al. 2018). ADCC hat bei subpialen Läsionen eine wesentlichere Bedeutung als CDC, dies zeigte eine schwächere immunhistologische C9/neo Färbung als in perivaskulären Läsionen (Abb. 9J). Einen signifikanten Unterschied zu den beiden anderen Rattenstämmen machten die Makrophagen aus, welche in der BN Ratte in einer wesentlich höheren Zahl subpial ins Hirnparenchym einwanderten (Abb. 14 A, Bd, Bf, Be).

Perivaskuläre Läsionen

Aufgrund durchlässiger Blutgefäße im Hirngewebe entstanden neben den subpialen (Abb. 9C, F, I, L) auch perivaskuläre (Abb. 9B, E, H, K) Läsionen. Anders als subpiale Läsionen zeigen die perivaskulären Läsionen einen wesentlich anderen physiologischen Mechanismus. Wie bereits im Lewis und RNU Rattenstamm beschrieben (Hillebrand et al. 2018), wies auch der BN Rattenstamm darauf hin, dass in perivaskulären Läsionen eine komplementinduzierte Zytolyse an der Zerstörung von Astrozyten eine deutlich höhere Beteiligung hat als ADCC. Perivaskuläre Läsionen zeigten auf der gesamten Läsionsfläche eine deutlich intensivere immunhistologische Färbung für Komplement C9/neo als die subpialen Läsionen (Abb. 9 K, L).

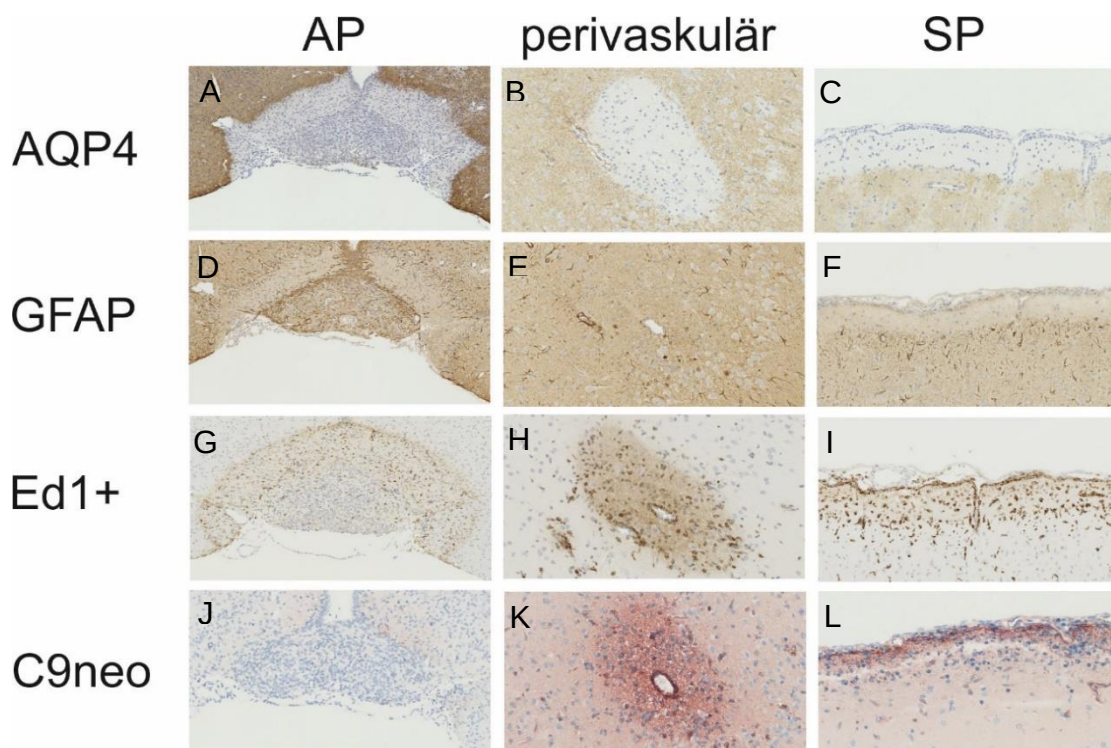


Abb. 9 Die Abbildung zeigt verschiedene Läsionen des BN Rattenstammes in verschiedenen Färbungen. Die Färbung für Komplement C9/neo (rot) (J, K, L) zeigt den Unterschied von CDC und ADCC in perivaskulären (K) und subpialen Läsionen (L) und das Fehlen von Komplement Reaktionen in der Area postrema (J). A und D veranschaulichen das es in der Area postrema zu einem Verlust von AQP4 (braun) (A) kommt jedoch nicht zu einer vollkommenen Zerstörung der Astrozyten da GFAP weiterhin vorhanden ist (braun) (D). G zeigt ED1 positive Makrophagen (braun) am Läsionsrand. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt für die Färbung der Zellkerne (blau).

ZNS-Areale mit häufiger auftretenden Läsionen

Hippocampus

Als auffällig erschien der Hippocampus, welcher eine im Vergleich zu anderen Hirnbereichen hohe Anzahl an kleineren Läsionen aufwies (Abb. 10, 12B). Vor allem BN und RNU Ratten hatten in diesem Bereich einen, im Vergleich zu Lewis Ratten, höheren Wert an Läsionen. Sowohl perivaskuläre als auch subpiaie Läsionen konnten im Hippocampus beobachtet werden. (Abb. 10D, schwarze Pfeile).

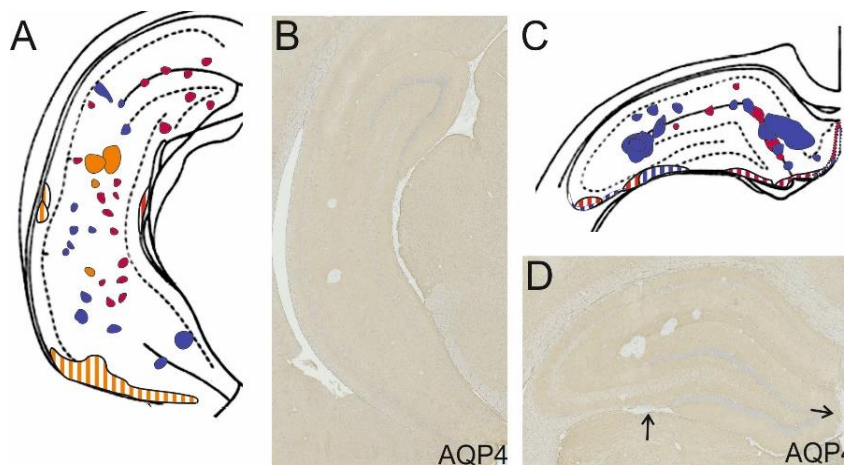
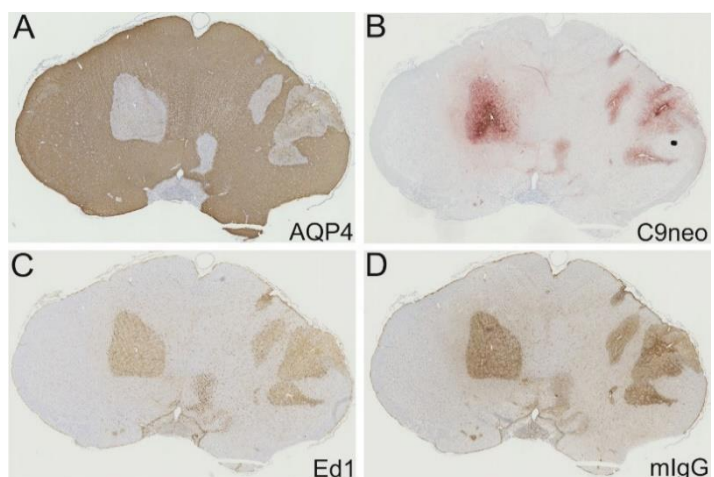


Abb. 10 Läsionen im Hippocampus. Als schematische Darstellung der Läsionen, diente der von Paxinos und Watson entwickelte Hirnatlas für Ratten (Paxinos und Watson 2006). (A, C) Läsionen der Lewis Ratten (gelb), RNU Ratten (rot) und BN Ratten (blau) werden schematisch dargestellt. Subpiaie Läsionen werden in strichlierten Flächen dargestellt. B und D zeigen Läsionen mit AQP4 (braun) Verlust aus einem Tier (BN Ratte). Subpiaie Läsionen werden mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Medulla Oblongata

In allen drei Rattenstämmen wies die Medulla eine hohe Anzahl an Läsionen auf, wobei hier der Lewis Rattenstamm herausstach mit einer durchschnittlich großen Läsionsfläche (Abb. 12B). Auffällig ist, dass Läsionen in der Medulla oft einen Ursprung in der Area postrema hatten und sich von dort ins Parenchym ausbreiteten (Abb. 12). Färbungen mit Antikörpern gegen AQP-4 zeigten in der Medulla Läsion in der Area postrema aber auch Läsionen, welche perivaskulär im Parenchym entstanden (Abb. 11 A).

Abb. 11 Die Medulla eines der Versuchstiere des BN Rattenstammes. A zeigt die Läsionen mit AQP-4 (braun) Verlust. B veranschaulicht nochmals die fehlende Komplementreaktion in der Area postrema. Eine positive Färbung von Komplement C9neo wird rot. D zeigt wieder die scharfe Linie an ED1 positiven Zellen (braun) am Läsionsrand. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt für die Färbung der Zellkerne (blau).



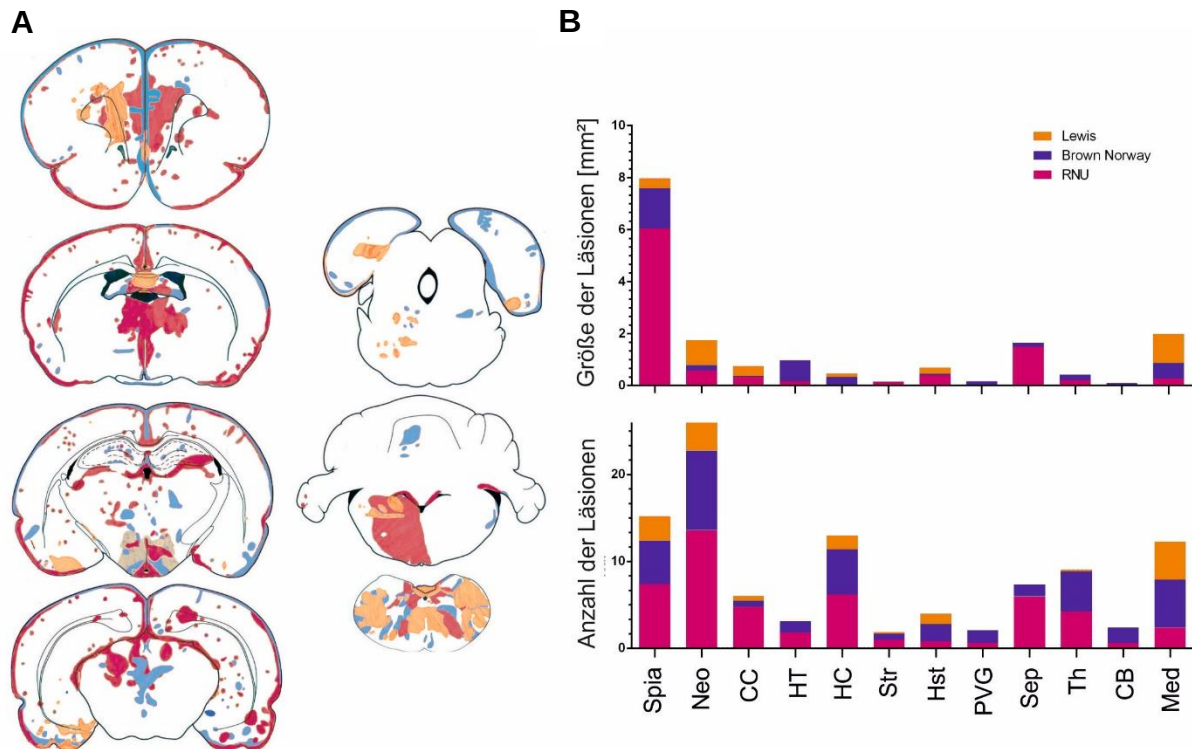


Abb. 12 Vergleich der Verteilung der Anzahl und Fläche der Läsionen in den verschiedenen Bereichen im Gehirn. **A** Als schematische Darstellung der Läsionen diente der von Paxinos und Watson entwickelte Hirnatlas für Ratten (Paxinos und Watson 2006). Die Rattenstämme, RNU (n=5, rot), BN (n=6, blau), Lewis (n=5, orange) wurden an 5 aneinander folgenden Tagen (120h) mit einem AQP4-ab behandelt und die Flächen des AQP4 Verlust wurde ausgewertet und quantifiziert. **B** Zeigt die Verteilung der Fläche in mm² und die der Anzahl aller Läsionen in Gehirnbereichen, in denen ein Verlust an AQP4 aufgetreten ist. Die Bereiche Subpial (Spia), Neokortex (Neo), Corpus calosum (CC), Hypothalamus (HT), Hippocampus (HC), Striatum (Str), Hirnstamm (Hst), periventrikuläres Grau (PVG), Septum (Sep), Thalamus (TH), Cerebellum (CB), Medulla (Med) werden untersucht.

Rückenmark

Die stärkste Bildung von Läsionen mit AQP-4 Verlust im Rückenmark wiesen die Lewis Ratten auf. In den lumbalen und thorakalen Bereichen des Rückenmarkes hatten Lewisratten die meisten Läsionen (Abb. 13A). Auch der Wert der durchschnittlichen Fläche aller Läsionen im Rückenmark war im Lewis Rattenstamm höher als in den beiden anderen Stämmen (RNU: 0,261mm² SD=0,409 n=4; BN: 0,771mm² SD=1,414 n=5; Lewis 0,984mm² SD=0,935 n=5).

Vergleich man anschließend die einzelnen Abschnitte des Rückenmarks lies sich deutlich erkennen, dass die lumbalen und thorakalen Abschnitte am stärksten betroffen und weniger Läsionen im cervikalen Bereich zu finden waren (Abb. 13A, B).

Auffällig war, dass im BN Rattenstamm die graue Substanz im Rückenmark prozentuell stärker betroffen war als in den beiden anderen Rattenstämmen (Abb. 13A).

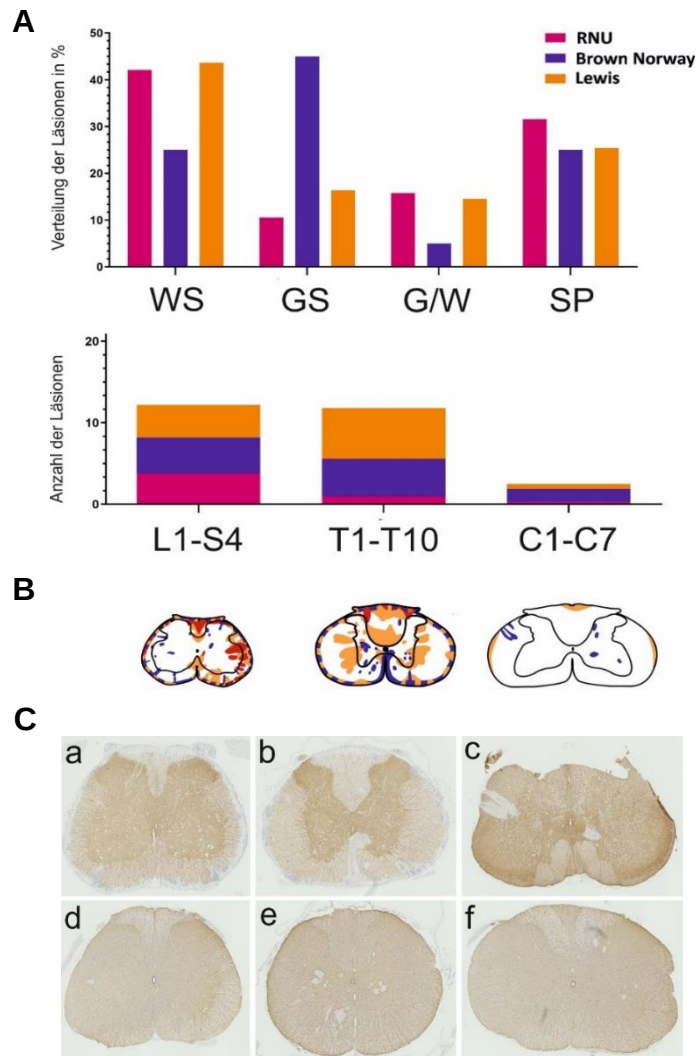


Abb. 13 Verteilung der Läsionen im Rückenmark. **A** Zeigt die Verteilung der Anzahl aller Läsionen in Gehirnbereichen, in denen ein Verlust an AQP4 aufgetreten ist. **B** Als schematische Darstellung der Läsionen diente der von Paxinos und Watson entwickelte Hirnatlas für Ratten (Paxinos und Watson 2006). **C** Immunhistologische Färbungen gegen AQP-4 (braun) zeigen die Läsionen (weiß) mit AQP-4 Verlust in den verschiedenen Bereichen des Rückenmarks **a** lumbal **b** thorakal und **c** cervical. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt für die Färbung der Zellkerne (blau). Die Rattenstämme, RNU (n=5, rot), BN (n=6, blau), Lewis (n=5, orange) wurden an 5 aneinander folgenden Tagen (120h) mit einem AQP4-ab behandelt und die Flächen des AQP4 Verlust wurde ausgewertet und quantifiziert.

Vergleich Brown Norway und Lewis Ratten

Verglich man nur die Lewis und BN Ratten, zeigten sich deutliche Unterschiede aber auch viele Übereinstimmungen in der Lage der Läsionen. Übereinstimmungen waren vor allem im Bereich der zirkumventrikulären Organe zu finden (Abb. 6). Unterschiede fanden sich vor allem in den verschiedenen Gehirnbereichen. BN Ratten hatten deutlich öfter subpiaie Läsionen als Lewis Ratten (BN 5/6; Lewis 1/5). Auch in

Bereichen wie Hippocampus, Thalamus und Septum waren in BN Ratten öfter Läsionen mit AQP-4 Verlust zu finden (Abb. 12).

Die Anzahl der Tiere, welche Läsionen im Rückenmark aufwiesen (Tabelle 3), ist in beiden Stämmen sehr ähnlich, doch war der prozentuelle Anteil aller Läsionen im ZNS in den Lewis Ratten im Rückenmark deutlich höher (Abb. 7A, 7B). Ein Unterschied zeigte sich auch in den verschiedenen Rückenmarksabschnitten. Lewis Ratten hatten prozentuell, im Vergleich aller Läsionen, im Rückenmark in der weißen Substanz mehr Regionen mit AQP-4 Verlust als in der grauen Substanz. Der Stamm der BN Ratten zeigte ein gegenteiliges Ergebnis.

Ein weiterer Unterschied ließ sich auch bei Untersuchung der Läsionen in der Medulla finden. Regionen mit AQP-4 Verlust waren in der Medulla wesentlich häufiger in den BN Ratten (4/6) zu finden als in den Lewis Ratten (2/5) (Tabelle 3). Auch in der durchschnittlichen Anzahl (BN: 4,8 n=6; Lewis: 3,8 n=5) an Läsionen wies die BN Ratte einen höheren Wert auf als die Lewis Ratte. In der Medulla hatte der Stamm der Lewis Ratten eine durchschnittlich größere Läsionsfläche (Lewis: 1,122mm² n=5 SD=2,245;

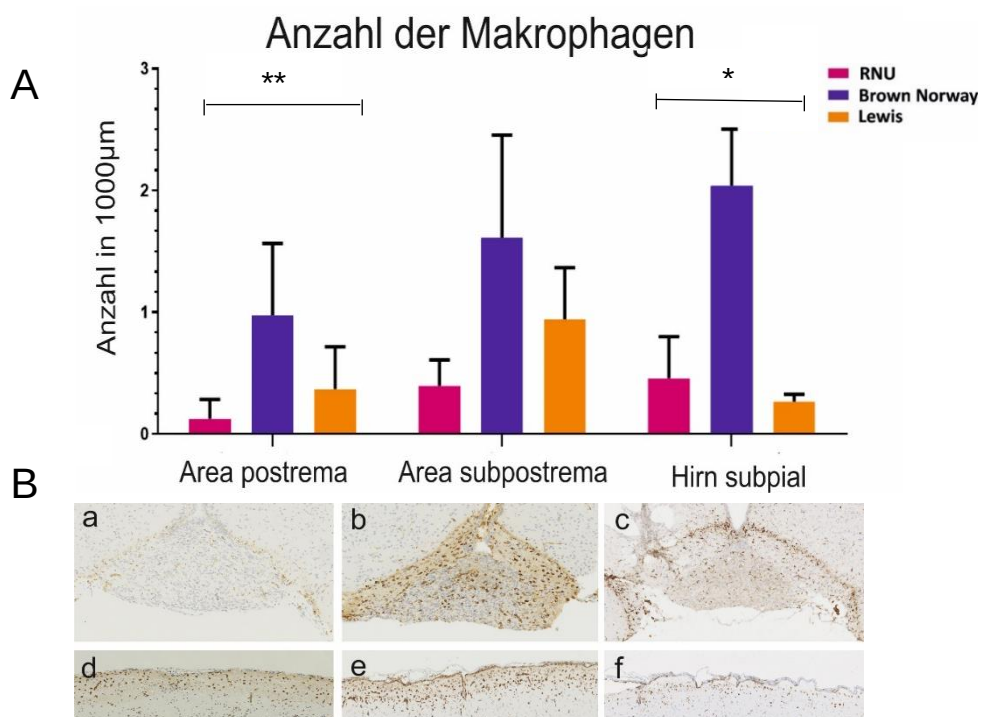


Abb. 14 Vergleich der Anzahl an einwandernden ED1+ Zellen. **A** Anzahl der migrierten ED1+ Zellen in 1000µm² im Bereich der Area postrema, Area subpostrema und im Hirn subpial. **B** Immunhistologische Färbungen zeigen die ED1 positiv gefärbten Zellen im Gewebe im Bereich der Area postrema, Area subpostrema (**a-c**) und im Hirn subpial (**d-f**). ED1 positive Zellen im RNU Rattenstamm (**a, d**), im BN Rattenstamm (**b, e**) und im Lewis Rattenstamm (**c, f**). Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt für die Färbung der Zellkerne (blau). Der Kruskal-Wallis Test betrachtet die Varianzanalyse angesichts einer ordinalskalierten Variable der Makrophagen in allen Rattenstämmen. Signifikante Werte sind mit ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,05$) gekennzeichnet (One-way ANOVA, Kruskal-Wallis Test).

BN: 0,613mm² n=5 SD=0,709). Dieser Messwert ist jedoch mit Vorsicht zu bewerten, da er aus einer großen Läsion nur eines Tieres hervorging und daher die Standardabweichung sehr hoch war.

Vergleich Neutrophile

Unterschiede zeigten sich auch im Vergleich des angeborenen Immunsystems. In RNU und Lewis Ratten zeigten die neutrophilen Granulozyten deutlich andere Akkumulationen als jene die wir im BN Rattenstamm gefunden haben. In den BN Ratten waren nicht die großen Kluster an Granulozyten (Abb. 14 Ca-d) zu finden, wie

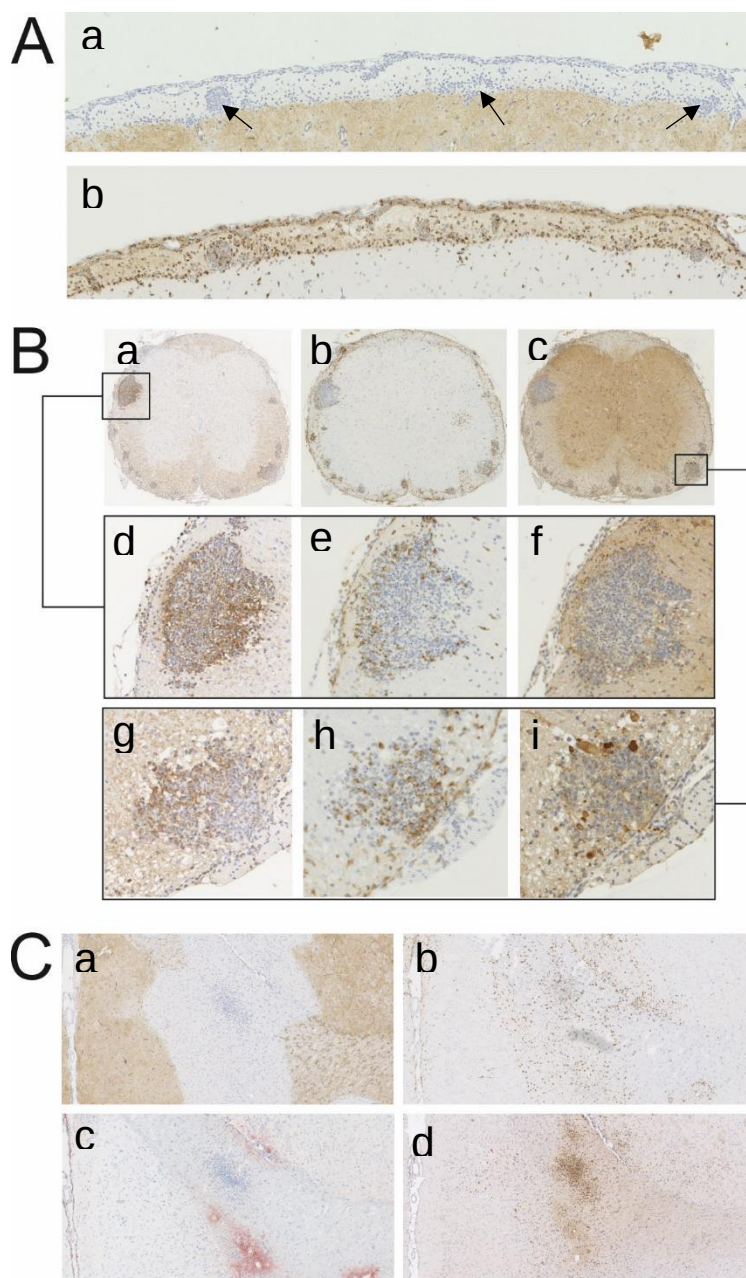


Abb. 15 Vergleich Akkumulation neutrophiler Granulozyten. **A** Akkumulationen von Granulozyten in subpialen Läsionen im Gehirn. **A** zeigt eine subpiale Läsion mit AQP-4 (braun) Verlust (weiß) und Anhäufungen (schwarzer Pfeil) von Zellkernen (blau)(Aa) und ED1+ Zellen (Ab). **B** Vergleich von Granulozyten eines Rückenmarksschnitts einer BN-Ratte mittels verschiedener immunhistologischer Färbungen mit Antikörpern für, MPO (**Ba**); ED1+ Zellen (**Bb**); APP (**Bc**). Immunhistologischer Vergleich zweier Akkumulationen von Zellkernen (blau) (**Bd - Bi**), MPO (**Bd, Bg**); ED1+ Zellen (**Be, Bh**); APP (**Bf, Bi**). **C** Eine Ansammlung an neutrophiler Granulozyten im Gehirnschnitt einer Lewis-Ratte, gefärbt mit Antikörpern gegen AQP-4 (braun) (**Ca**), ED1+ (braun) (**Cb**), C9neo (rot) (**Cc**), MPO (braun) (**Cd**). Die Rattenstämme, RNU (n=5, rot), BN (n=6, blau), Lewis (n=5, orange) wurden an 5 aneinander folgenden Tagen (120h) mit einem AQP4-ab behandelt und die Flächen des AQP4 Verlust wurde ausgewertet und quantifiziert. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt für die Färbung der Zellkerne (blau).

jene, die wir in den beiden anderen Stämmen gefunden haben. Auffällig jedoch waren kleine Zellansammlungen im subpialen Bereich (Abb. 14 Aa), die auf ein Verbleiben der Zellen in sogenannten "perivaskuläre cuffs" zurückzuführen sind.

Diskussion

Das vergleichende Experiment mit drei Rattenstämmen weist deutlich darauf hin, dass es Unterschiede bei der Bildung von Läsionen mit AQP-4 Verlust gibt. Jedoch zeigt die Studie auch eine sehr heterogene Ausprägung, in Anzahl und Fläche der Läsionen innerhalb der Stämme. Zu den Unterschieden konnten aber auch eindeutige Übereinstimmungen der drei Rattenstämmen ausgemacht werden. Einige der Übereinstimmungen des Vergleichs passen auch zu anderen Tierversuchen und zu Beschreibungen von humanem Gewebe.

Die Läsion in der Area postrema, die wir in allen Ratten gefunden haben und auch die positiven GFAP histologischen Färbungen in diesem Gebiet, wurden auch in anderen Tiermodellen (Hillebrand et al. 2018; Kurosawa et al. 2015), aber auch in humanen Geweben beschrieben (Popescu et al. 2011; Kurosawa et al. 2015). Proteine, verantwortlich für Komplement-Regulierung (Farina et al. 2007), aber auch Unterschiede im Verhältnis von M1:M23 Isoform von AQP4, können in der Area postrema verantwortlich sein für einen Verlust von AQP-4 in Läsionen ohne Astrozytenzerstörung (Hinson et al. 2012; Saini et al. 2010). In der Einleitung haben wir die Affinität zu M23 AQP-4 Isoform beschrieben. Saini et al. (2010) beschrieb in seiner Arbeit wie unterschiedlich die beiden Isoformen exprimiert und je nach Region hoch oder runterreguliert werden. Studien welche diese Isoformen untersuchten, zeigten auch in Richtung einer Veränderung des M1:M23 Verhältnisses mit Bezug auf Hirnregion und Alter des Versuchstieres (Hinson et al. 2012; Saini et al. 2010).

Hillebrand et al. (2018) veranschaulichte auch in ihrem Rattenmodell, dass die Area postrema das erste ZNS-Gewebe ist, welches bereits nach 24h bis 48h von AQP-4 Verlust betroffen ist. Dieses Ergebnis könnte auch dafür verantwortlich sein, warum in seltenen Fällen in der Medulla eine Neubildung von AQP-4 positiven Astrozyten zu finden ist.

Trotz eines sehr heterogenen Auftretens von Läsionen mit AQP-4 Verlust in unserer Studie, decken sich einige Regionen mit jenen, die bereits als stark AQP4-mRNA exprimierend beschrieben wurden (J.L. Venero et al. 1999). Diese Studie hat mittels In-situ Hybridisierung mRNA in verschiedenen Regionen und Zelltypen untersucht. Im Gebiet der Pyramidenzellen des Hippocampus und in Zellen verschiedener Kerne des Thalamus sowie Hypothalamus zeigte sich eine hohe Expression von AQP4-mRNA. (J.L. Venero et al. 1999).

Die Arbeit von Ciappelloni et al. (2019) beschäftigte sich mit den verschiedenen Isoformen von AQP-4 im Hippocampus und der Motilität der Astrozyten. Ciappellonis Ergebnisse zeigten, dass im Hippocampus, an den Endfüßchen der Astrozyten, ein erhöhtes Vorkommen von Aggregaten an M23-Isoformen zu finden sind. Grund dafür ist, dass die M23-AQP4-Isoform die Motilität der Astrozytenfortsätze mit ihren Endfüßchen erhöht und die Aktivität der glutamergen Synapsen im Hippocampus begünstigt (Ciappelloni et al. 2019). Passend dazu, zeigten Studien, wie jene von Halpain S. et al. (1984) und Mangas et al. (2007), ein erhöhtes Vorkommen von Glutamatrezeptoren in Gebieten, in denen wir in unserer Studie eine erhöhte Anzahl von Läsionen gefunden haben (Halpain et al. 1984; Mangas et al. 2007).

Wir zeigten, dass Läsionen in der BN Ratte mehr ED1 positive Zellen aufwiesen als Lewis und RNU Ratten. ED1 ist ein Marker für aktivierte Makrophagen/Monozyten. Studien zeigten, dass BN Ratten mehr als Lewis Ratten im ZNS residente, verzweigte Mikroglia haben, welche auch MHC-II Moleküle exprimieren (Sedgwick et al. 1993). Solche Mikroglia bilden Fortsätze, welche wie die Endfüßchen der Astrozyten, Teil der Glia limitans sind (Joost et al. 2019). Somit kann die erhöhte Anzahl an aktivierten Makrophagen im BN Rattenstamm mitverantwortlich sein für eine stärkeres inflammatorisches Milieu in den subpialen Läsionen. Studien zeigten auch Rattenstamm spezifische Unterschiede, vor allem zwischen Brown Norway und Lewis, in der Immunotoxizität von PMNs und Makrophagen (Contrino et al. 1992).

Einen Unterschied machten auch die Anzahl und die Akkumulationen der neutrophilen Granulozyten aus. Im RNU- und Lewis-Rattenstamm konnten eindeutig größere Cluster dieser Zellen gefunden werden. Im BN-Rattenstamm waren zwar Zellansammlungen zu finden, welche jedoch auf perivaskuläre „Cuffs“ hinwiesen, ähnlich der Beschreibungen von Voskuhl et al. (2009). In den Gewebeschnitten der Lewis und RNU Ratten konnten wir ein Schwärmen von Neutrophilen nachweisen,

welches zuvor schon in anderen Gewebetypen beschrieben wurde (Tan und Weninger 2017). Ein solches Verhalten konnten wir in den histologischen Untersuchungen der BN-Ratte nicht nachweisen. Als mögliche Ursache kann der unterschiedliche Entstehungszeitpunkt der Läsionen angenommen werden oder der bereits erwähnte Unterschied in der Immunotoxizität der PMN und Makrophagen zwischen den Rattenstämmen. Auch einen Unterschied in Gewebe und Läsionstyp konnten wir in unseren Färbungen sehen, da subpiale Läsionen weniger neutrophile Granulozyten aufwiesen als perivaskuläre Läsionen. Da subpiale Läsionen weniger Produkte aus Komplementreaktionen haben, welche als chemotaktische Stoffe auf neutrophile Granulozyten wirken, wie C3a und C5a (Ehrengruber et al. 1994), ist der chemotaktische Gradient in perivaskulären Läsionen höher. Auch in der Area postrema konnten wir kaum bis keine neutrophilen Granulozyten nachweisen.

Unterschiede in der Expression verschiedener Rattenstämmen zeigten sich schon in früheren Studien, welche sich jedoch mit anderen hirnspezifischen Proteinen beschäftigten, aber auf unterschiedliche Expressionsmuster hinweisen. Untersuchungen, welche sich vor allem mit Unterschieden von MOG befassten, zeigten schon, dass es einen Unterschied in Proteinsynthese und der RNA-Expression gibt (Pagany et al. 2003). BN Ratten haben eine um 30% höhere Expression von MOG mRNA im optischen Nerv als Lewis Ratten. Auch das Verhältnis von MOG und PLP ist in BN Ratten wesentlich höher (Pagany et al. 2003).

Wesentliche Unterschiede zwischen Rattenstämmen zeigten auch bereits Studien von Massa et al. (1987) und Günther et al. (1978), welche sich mit der Expression und Ausbildung von MHCII-Komplexen auf Astrozyten beschäftigten. Sie dokumentierten Unterschiede zwischen verschiedenen Rattenstämmen, vor allem für jene, welche für EAE-Untersuchungen verwendet werden (Günther et al. 1978; Massa et al. 1987). Lewis-Ratten wurden als wesentlich anfälliger und BN-Ratten als resistent beschrieben. Die Daten der Studien wiesen darauf hin, dass Unterschiede in den MHCII-Komplexen wesentlich verantwortlich sind für die erhöhte Anfälligkeit in EAE-induzierten Experimenten. Vor allem Astrozyten in Lewis Ratten wiesen, im Gegensatz zu jenen in BN Ratten, deutlich höhere Werte auf bei Antigen positiven MHCII-Komplexen. (Massa et al. 1987; Günther et al. 1978).

Forschungen für neuropsychiatrische Medizin zeigten schon oft, dass Arzneimittel in der Entwicklungsphase in Tierversuchen nicht dieselben Wirkungen zeigten wie in

menschlichen Probanden. Trotz einer 99% Übereinstimmung der Gene, gibt es jedoch einen wesentlichen Unterschied im Transkriptom (Howe, 6th. et al. 2018; Gibbs et al. 2004). Solche Unterschiede können Grund für gleiche Mechanismen in der Entstehung der Läsionen sein, jedoch auch für die Unterschiede in Größe und Anzahl der Läsionen, welche wir dokumentieren konnten. Aber auch Grund dafür, dass in Tierversuchen nicht das volle Spektrum der Gewebeveränderungen, wie sie in humanen Patienten vorkommen, reproduziert werden können.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Regionale Einstellungen werden auf der Karte angezeigt.	10
Abb. 2 Das schematische Bild zeigt die Aminosäurestruktur eines AQP-4-Monomers.	13
Abb. 3 Bindung des Antikörpers	14
Abb. 4 Das Komplementprotein C1q bindet an den Antikörper (AQP4-IgG), der an AQP-4 gebunden ist.	15
Abb. 5 Bindung eines Neutrophilen an einen Antikörper und die daraus resultierende Reaktionskaskade bis zur NETS-Bildung.	18
Abb. 6 Vergleich der Tiere welche einen Verlust an AQP4 in einem oder mehreren zirkumventrikulären Organen zeigten.	27
Abb. 7 Vergleich der Läsionsverteilung im ZNS.	29
Abb. 8 Läsionen im optischen Nerv in einem Versuchstier des BN Rattenstammes..	30
Abb. 9 Die Abbildung zeigt verschiedene Regionen Läsionen des BN Rattenstammes in verschiedenen Färbungen.	31
Abb. 10 Läsionen im Hippocampus.	32
Abb. 11 Zeigt die Medulla eines der Versuchstiere des BN Rattenstammes.	32
Abb. 12 Vergleich der Verteilung der Anzahl und Fläche der Läsionen in den verschiedenen Bereichen im Gehirn.	33
Abb. 13 Verteilung der Läsionen im Rückenmark.	34
Abb. 14 Vergleich der Anzahl an einwandernden ED1+ Zellen.	35
Abb. 15 Vergleich Akkumulation neutrophiler Granulozyten.	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Primärantikörper	24
Tabelle 2 Sekundärantikörper.	24
Tabelle 3 Antikörpertiter, Neurologische Symptome und Regionen mit Läsionen in den Versuchstieren des BN, RNU und Lewis Rattenstammes nach 120h Administration des AQP-4 Antikörpers.	28

Literaturverzeichnis

- Abbott, N. Joan; Rönnebeck, Lars; Hansson, Elisabeth (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In: *Nature reviews. Neuroscience* 7 (1), S. 41–53. DOI: 10.1038/nrn1824.
- Amulic, Borko; Cazalet, Christel; Hayes, Garret L.; Metzler, Kathleen D.; Zychlinsky, Arturo (2012): Neutrophil function: from mechanisms to disease. In: *Annual review of immunology* 30, S. 459–489. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.
- Bizzoco, Elisa; Lolli, Francesco; Repice, Anna Maria; Hakiki, Bahia; Falcini, Mario; Barilaro, Alessandro et al. (2009): Prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorder and phenotype distribution. In: *Journal of neurology* 256 (11), S. 1891–1898. DOI: 10.1007/s00415-009-5171-x.
- Borisow, Nadja; Mori, Masahiro; Kuwabara, Satoshi; Scheel, Michael; Paul, Friedemann (2018): Diagnosis and Treatment of NMO Spectrum Disorder and MOG-Encephalomyelitis. In: *Frontiers in neurology* 9, S. 888. DOI: 10.3389/fneur.2018.00888.
- Brädl, Monika; Misu, Tatsuro; Takahashi, Toshiyuki; Watanabe, Mitsutoshi; Mader, Simone; Reindl, Markus et al. (2009): Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. In: *Annals of neurology* 66 (5), S. 630–643. DOI: 10.1002/ana.21837.
- Brädl, Monika; Reindl, Markus; Lassmann, Hans (2018): Mechanisms for lesion localization in neuromyelitis optica spectrum disorders. In: *Current opinion in neurology* 31 (3), S. 325–333. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000551.
- Buch, D.; Savatovsky, J.; Gout, O.; Vignal, C.; Deschamps, R. (2017): Combined brain and anterior visual pathways' MRIs assist in early identification of neuromyelitis optica spectrum disorder at onset of optic neuritis. In: *Acta neurologica Belgica* 117 (1), S. 67–74. DOI: 10.1007/s13760-016-0714-2.
- Ciappelloni, Silvia; Bouchet, Delphine; Dubourdieu, Nadège; Boué-Grabot, Eric; Kellermayer, Blanka; Manso, Constance et al. (2019): Aquaporin-4 Surface Trafficking Regulates Astrocytic Process Motility and Synaptic Activity in Health and Autoimmune Disease. In: *Cell reports* 27 (13), 3860-3872.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.05.097.

- Contrino, J.; Kosuda, L.L; Marucha, P.; Kreutzer, D.L; Bigazzi, P.E (1992): The in vitro effects of mercury on peritoneal leukocytes (PMN and macrophages) from inbred brown Norway and Lewis rats. In: *Int J Immunopharmacol* 14, S. 1059. DOI: 10.1016/0192-0561(92)90150-J.
- Crane, Jonathan M.; van Hoek, Alfred N.; Skach, William R.; Verkman, A. S. (2008): Aquaporin-4 dynamics in orthogonal arrays in live cells visualized by quantum dot single particle tracking. In: *Molecular biology of the cell* 19 (8), S. 3369–3378. DOI: 10.1091/mbc.e08-03-0322.
- Delgado-Rizo, Vidal; Martínez-Guzmán, Marco A.; Iñiguez-Gutierrez, Liliana; García-Orozco, Alejandra; Alvarado-Navarro, Anabell; Fafutis-Morris, Mary (2017): Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 81. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00081.
- Diebolder, Christoph A.; Beurskens, Frank J.; Jong, Rob N. de; Koning, Roman I.; Strumane, Kristin; Lindorfer, Margaret A. et al. (2014): Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6176), S. 1260–1263. DOI: 10.1126/science.1248943.
- Domingues, Renan B.; Kuster, Gustavo W.; Lanes, Flávio; Callegaro, Dagoberto (2004): Recurrent neuromyelitis optica with diffuse central nervous system involvement: case report. In: *Arquivos de neuro-psiquiatria* 62 (2B), S. 543–546. DOI: 10.1590/s0004-282x2004000300032.
- Ehrengruber, M. U.; Geiser, T.; Deranleau, D. A. (1994): Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. In: *FEBS letters* 346 (2-3), S. 181–184. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00463-3.
- Farina, Cinthia; Aloisi, Francesca; Meinl, Edgar (2007): Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. In: *Trends in immunology* 28 (3), S. 138–145. DOI: 10.1016/j.it.2007.01.005.
- Flanagan, Eoin P.; Cabre, Philippe; Weinshenker, Brian G.; Sauver, Jennifer St; Jacobson, Debra J.; Majed, Masoud et al. (2016): Epidemiology of aquaporin-4 autoimmunity and neuromyelitis optica spectrum. In: *Annals of neurology* 79 (5), S. 775–783. DOI: 10.1002/ana.24617.

- Gibbs, Richard A.; Weinstock, George M.; Metzker, Michael L.; Muzny, Donna M.; Sodergren, Erica J.; Scherer, Steven et al. (2004): Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. In: *Nature* 428 (6982), S. 493–521. DOI: 10.1038/nature02426.
- Gleiser, Corinna; Wagner, Andreas; Fallier-Becker, Petra; Wolburg, Hartwig; Hirt, Bernhard; Mack, Andreas F. (2016): Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory Organs-A Comparative Perspective. In: *International journal of molecular sciences* 17 (9). DOI: 10.3390/ijms17091411.
- Graber, David J.; Levy, Michael; Kerr, Douglas; Wade, William F. (2008): Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4. In: *Journal of neuroinflammation* 5, S. 22. DOI: 10.1186/1742-2094-5-22.
- Granger, Vanessa; Peyneau, Marine; Chollet-Martin, Sylvie; Chaisemartin, Luc de (2019): Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 2824. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02824.
- Günther, E.; Odenthal, H.; Wechsler, W. (1978): Association between susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and the major histocompatibility system in congenic rat strains. In: *Clinical and experimental immunology* 32 (3), S. 429–434.
- Halpain, S.; Wieczorek, C. M.; Rainbow, T. C. (1984): Localization of L-glutamate receptors in rat brain by quantitative autoradiography. In: *The Journal of Neuroscience* 4 (9), S. 2247. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.04-09-02247.1984.
- Harada, Kazuki; Kamiya, Taichi; Tsuboi, Takashi (2015): Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. In: *Frontiers in neuroscience* 9, S. 499. DOI: 10.3389/fnins.2015.00499.
- Hillebrand, Sophie; Schanda, Kathrin; Nigritinou, Magdalini; Tsymala, Irina; Böhm, Denise; Peschl, Patrick et al. (2018): Circulating AQP4-specific auto-antibodies alone can induce neuromyelitis optica spectrum disorder in the rat. In: *Acta neuropathologica*. DOI: 10.1007/s00401-018-1950-8.
- Hinson, Shannon R.; Romero, Michael F.; Popescu, Bogdan F. Gh; Lucchinetti, Claudia F.; Fryer, James P.; Wolburg, Hartwig et al. (2012): Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. In: *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (4), S. 1245–1250. DOI: 10.1073/pnas.1109980108.

Howe, James R., 6th.; Bear, Mark F.; Golshani, Peyman; Klann, Eric; Lipton, Stuart A.; Mucke, Lennart et al. (2018): The mouse as a model for neuropsychiatric drug development. In: *Current biology : CB* 28 (17), R909-R914. DOI: 10.1016/j.cub.2018.07.046.

Hubbard, Jacqueline A.; Szu, Jenny I.; Binder, Devin K. (2018): The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. In: *Brain research bulletin* 136, S. 118–129. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2017.02.011.

J.L. Venero; M.L. Vizuete; A.A. Ilundáin; A. Machado; M. Echevarria; J. Cano (1999): Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs. In: *Neuroscience* 94 (1), S. 239–250. DOI: 10.1016/S0306-4522(99)00182-7.

Joost, Emely; Jordão, Marta J. C.; Mages, Bianca; Prinz, Marco; Bechmann, Ingo; Krueger, Martin (2019): Microglia contribute to the glia limitans around arteries, capillaries and veins under physiological conditions, in a model of neuroinflammation and in human brain tissue. In: *Brain structure & function* 224 (3), S. 1301–1314. DOI: 10.1007/s00429-019-01834-8.

Kawachi, Izumi (2016): Clinical characteristics of autoimmune optic neuritis 2016.

Kawachi, Izumi; Lassmann, Hans (2017): Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 88 (2), S. 137–145. DOI: 10.1136/jnnp-2016-313300.

Khakh, Baljit S.; Sofroniew, Michael V. (2015): Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. In: *Nature neuroscience* 18 (7), S. 942–952. DOI: 10.1038/nn.4043.

Kienle, Korbinian; Lämmermann, Tim (2016): Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response. In: *Immunological reviews* 273 (1), S. 76–93. DOI: 10.1111/imr.12458.

Kurosawa, Kazuhiro; Misu, Tatsuro; Takai, Yoshiki; Sato, Douglas Kazutoshi; Takahashi, Toshiyuki; Abe, Yoichiro et al. (2015): Severely exacerbated neuromyelitis optica rat model with extensive astrocytopathy by high affinity anti-

aquaporin-4 monoclonal antibody. In: *Acta neuropathologica communications* 3, S. 82. DOI: 10.1186/s40478-015-0259-2.

Lassmann, H.; Brunner, C.; Bradl, M.; Linington, C. (1988): Experimental allergic encephalomyelitis: the balance between encephalitogenic T lymphocytes and demyelinating antibodies determines size and structure of demyelinated lesions. In: *Acta neuropathologica* 75 (6), S. 566–576. DOI: 10.1007/BF00686201.

Lee, Esther K. S.; Gillrie, Mark R.; Li, Lu; Arnason, Jason W.; Kim, Jung Hwan; Babes, Liane et al. (2018): Leukotriene B4-Mediated Neutrophil Recruitment Causes Pulmonary Capillaritis during Lethal Fungal Sepsis. In: *Cell host & microbe* 23 (1), 121-133.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2017.11.009.

Lennon, Vanda A.; Wingerchuk, Dean M.; Kryzer, Thomas J.; Pittock, Sean J.; Lucchinetti, Claudia F.; Fujihara, Kazuo et al. (2004): A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. In: *The Lancet* 364 (9451), S. 2106–2112. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)17551-X.

Levin, Marc H.; Bennett, Jeffrey L.; Verkman, A. S. (2013): Optic neuritis in neuromyelitis optica. In: *Progress in retinal and eye research* 36, S. 159–171. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.03.001.

Lin, Ang; Loré, Karin (2017): Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1781. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01781.

Linington, C.; Morgan, B. P.; Scolding, N. J.; Wilkins, P.; Piddlesden, S.; Compston, D. A. (1989): The role of complement in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. In: *Brain : a journal of neurology* 112 (Pt 4), S. 895–911. DOI: 10.1093/brain/112.4.895.

Lucchinetti, Claudia F.; Mandler, Raul N.; McGavern, Dorian; Bruck, Wolfgang; Gleich, Gerald; Ransohoff, Richard M. et al. (2002): A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. In: *Brain : a journal of neurology* 125 (7), S. 1450–1461. DOI: 10.1093/brain/awf151.

Mangas, A.; Coveñas, R.; Bodet, D.; Geffard, M.; Aguilar, L. A.; Yajeya, J. (2007): Immunocytochemical visualization of D-glutamate in the rat brain. In: *Neuroscience* 144 (2), S. 654–664. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.09.045.

- Massa, P. T.; ter Meulen, V.; Fontana, A. (1987): Hyperinducibility of Ia antigen on astrocytes correlates with strain-specific susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (12), S. 4219–4223. DOI: 10.1073/pnas.84.12.4219.
- Mayadas, Tanya N.; Cullere, Xavier; Lowell, Clifford A. (2014): The multifaceted functions of neutrophils. In: *Annual review of pathology* 9, S. 181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
- Neely, J. D.; Christensen, B. M.; Nielsen, S.; Agre, P. (1999): Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. In: *Biochemistry* 38 (34), S. 11156–11163. DOI: 10.1021/bi990941s.
- Oklinski, Michal K.; Skowronski, Mariusz T.; Skowronska, Agnieszka; Rützler, Michael; Nørgaard, Kirsten; Nieland, John D. et al. (2016): Aquaporins in the Spinal Cord. In: *International journal of molecular sciences* 17 (12). DOI: 10.3390/ijms17122050.
- Pagany, Maria; Jagodic, Maja; Bourquin, Carole; Olsson, Tomas; Linington, Christopher (2003): Genetic variation in myelin oligodendrocyte glycoprotein expression and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of neuroimmunology* 139 (1-2), S. 1–8. DOI: 10.1016/S0165-5728(03)00124-3.
- Papadopoulos, Marios C.; Verkman, Alan S. (2013): Aquaporin water channels in the nervous system. In: *Nature reviews. Neuroscience* 14 (4), S. 265–277. DOI: 10.1038/nrn3468.
- Paxinos, George; Watson, Charles (2006): The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition: Elsevier.
- Popescu, Bogdan F. Gh; V.A. Lennon; J.E. Parisi; C.L. Howe; S.D. Weigand (2011): Neuromyelitis optica unique area postrema lesions. Nausea, vomiting, and pathogenic implications. In: *Neurology*.
- Ratelade, Julien; Bennett, Jeffrey L.; Verkman, A. S. (2011a): Intravenous neuromyelitis optica autoantibody in mice targets aquaporin-4 in peripheral organs and area postrema. In: *PloS one* 6 (11), e27412. DOI: 10.1371/journal.pone.0027412.

Ratelade, Julien; Bennett, Jeffrey L.; Verkman, A. S. (2011b): Intravenous neuromyelitis optica autoantibody in mice targets aquaporin-4 in peripheral organs and area postrema. In: *PloS one* 6 (11), e27412. DOI: 10.1371/journal.pone.0027412.

Ratelade, Julien; Zhang, Hua; Saadoun, Samira; Bennett, Jeffrey L.; Papadopoulos, Marios C.; Verkman, A. S. (2012): Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss. In: *Acta neuropathologica* 123 (6), S. 861–872. DOI: 10.1007/s00401-012-0986-4.

Saadoun, Samira; Papadopoulos, Marios C. (2015): Role of membrane complement regulators in neuromyelitis optica. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 21 (13), S. 1644–1654. DOI: 10.1177/1352458515571446.

Saadoun, Samira; Waters, Patrick; Bell, B. Anthony; Vincent, Angela; Verkman, A. S.; Papadopoulos, Marios C. (2010): Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. In: *Brain : a journal of neurology* 133 (Pt 2), S. 349–361. DOI: 10.1093/brain/awp309.

Saini, Harleen; Fernandez, Gregory; Kerr, Douglas; Levy, Michael (2010): Differential expression of aquaporin-4 isoforms localizes with neuromyelitis optica disease activity. In: *Journal of neuroimmunology* 221 (1-2), S. 68–72. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.02.007.

Sedgwick, J. D.; Schwender, S.; Gregersen, R.; Dörries, R.; ter Meulen, V. (1993): Resident macrophages (ramified microglia) of the adult brown Norway rat central nervous system are constitutively major histocompatibility complex class II positive. In: *The Journal of experimental medicine* 177 (4), S. 1145–1152. DOI: 10.1084/jem.177.4.1145.

Seze, J. de; Stojkovic, T.; Ferriby, D.; Gauthier, J.-Y.; Montagne, C.; Mounier-Vehier, F. et al. (2002): Devic's neuromyelitis optica: clinical, laboratory, MRI and outcome profile. In: *Journal of the neurological sciences* 197 (1), S. 57–61. DOI: 10.1016/S0022-510X(02)00043-6.

Sloan, Steven A.; Barres, Ben A. (2014): Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. In: *Current opinion in neurobiology* 27, S. 75–81. DOI: 10.1016/j.conb.2014.03.005.

- Sofroniew, Michael V.; Vinters, Harry V. (2010): Astrocytes: biology and pathology. In: *Acta neuropathologica* 119 (1), S. 7–35. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- Storoni, Mithu; Davagnanam, Indran; Radon, Mark; Siddiqui, Ata; Plant, Gordon T. (2013): Distinguishing optic neuritis in neuromyelitis optica spectrum disease from multiple sclerosis: a novel magnetic resonance imaging scoring system. In: *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 33 (2), S. 123–127. DOI: 10.1097/WNO.0b013e318283c3ed.
- Sun, Daniel; Lye-Barthel, Ming; Masland, Richard H.; Jakobs, Tatjana C. (2009): The morphology and spatial arrangement of astrocytes in the optic nerve head of the mouse. In: *The Journal of comparative neurology* 516 (1), S. 1–19. DOI: 10.1002/cne.22058.
- Sung-Min Kim; Seong-Joon Kim; Haeng Jin Lee; Hiroshi Kuroda; Jacqueline Palace; and Kazuo Fujihara: Differential diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders.
- Tabata, Hidenori (2015): Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. In: *Frontiers in neuroscience* 9, S. 114. DOI: 10.3389/fnins.2015.00114.
- Tan, Sioh-Yang; Weninger, Wolfgang (2017): Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. In: *Current opinion in immunology* 44, S. 34–42. DOI: 10.1016/j.coi.2016.11.002.
- Vignesh, Pandiarajan; Rawat, Amit; Sharma, Madhubala; Singh, Surjit (2017): Complement in autoimmune diseases. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 465, S. 123–130. DOI: 10.1016/j.cca.2016.12.017.
- Voskuhl, Rhonda R.; Peterson, R. Scott; Song, Bingbing; Ao, Yan; Morales, Laurie Beth J.; Tiwari-Woodruff, Seema; Sofroniew, Michael V. (2009): Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (37), S. 11511–11522. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1514-09.2009.
- Wang, Wei; Erbe, Amy K.; Hank, Jacquelyn A.; Morris, Zachary S.; Sondel, Paul M. (2015): NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 368. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00368.

Waters, Patrick J.; Pittock, Sean J.; Bennett, Jeffrey L.; Jarius, Sven; Weinshenker, Brian G.; Wingerchuk, Dean M. (2014): Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. In: *Clinical & experimental neuroimmunology* 5 (3), S. 290–303. DOI: 10.1111/cen3.12107.

Wingerchuk, Dean M.; Hogancamp, William F.; O'Connell, Peter C.; Weinshenker, Brian G. (1999): The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). In: *Neurology* 53 (5), S. 1107. DOI: 10.1212/WNL.53.5.1107.

Wingerchuk, Dean M.; Lennon, Vanda A.; Lucchinetti, Claudia F.; Pittock, Sean J.; Weinshenker, Brian G. (2007): The spectrum of neuromyelitis optica. In: *The Lancet Neurology* 6 (9), S. 805–815. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70216-8.

Yang, Xin; Ransom, Bruce R.; Ma, Jian-Fang (2016): The role of AQP4 in neuromyelitis optica: More answers, more questions. In: *Journal of neuroimmunology* 298, S. 63–70. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.06.002.

Zeka, Bleranda; Hastermann, Maria; Kaufmann, Nathalie; Schanda, Kathrin; Pende, Marko; Misu, Tatsuro et al. (2016): Aquaporin 4-specific T cells and NMO-IgG cause primary retinal damage in experimental NMO/SD. In: *Acta neuropathologica communications* 4 (1), S. 82. DOI: 10.1186/s40478-016-0355-y.