

# **Pathomechanische Analysen zum Untergang retinaler Ganglienzellen im Experimentellen Autoimmunen Glaukom Modell**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Oliver Willy Gramlich

geb. in Rüsselsheim

Mainz, 2011

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 18.07.2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Anmerkung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Physiologische Grundlagen.....	12
1.1.1 Auge, Retina und Sehbahn.....	12
1.1.2 Die retinalen Ganglienzellen .....	14
1.1.3 Die Glia .....	16
1.2 Immunsystem, Autoimmunität und immunprivilegierte Regionen.....	19
1.2.1 Autoimmunität.....	21
1.2.2 Immunprivileg des zentralen Nervensystems und des Auges .....	22
1.3 Glaukom, Pathogenese und das Tiermodell des Experimentellen Autoimmunen Glaukoms.....	23
1.3.1 Pathogenese des Glaukoms.....	25
1.3.2 Autoimmune Komponente der Glaukompathogenese .....	26
1.3.3 Das Experimentelle Autoimmune Glaukom Tiermodell.....	28
1.4 Multiple Sklerose, Opticusneuritis und das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis.....	29
1.4.1 Pathogenese der MS und die Experimentelle Autoimmune Enzephalitis .....	30
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>32</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
3.1 Versuchstiere und Studiendesign .....	34
3.2 Messung des intraokulären Druckes und Funduskopie.....	35
3.3 Immunisierung und Antigene.....	35
3.3.1 Myelin basisches Protein .....	36
3.3.2 Opticus- assoziierte Antigene .....	36
3.3.3 Retinale Ganglienzellschicht- assoziierte Antigene .....	36
3.3.4 Keratin.....	36
3.4 Studien zur Evaluierung des retinalen Ganglienzelluntergangs .....	37
3.4.1 Studie mit 14 Tage Laufzeit .....	37
3.4.2 Studie mit 28 Tage Laufzeit .....	38
3.4.3 Studie mit 42 Tage Laufzeit .....	38
3.5 Studien zur neuropathologischen Untersuchung .....	39
3.5.1 Longitudinale Verlaufsstudie mit ONA als Antigen .....	39

3.5.2	Histopathologische Studie in der frühen Phase des retinalen Ganglienzelluntergangs mit MBP induzierter EAE als Referenz .....	39
3.5.3	Histopathologische Studie in der fortgeschrittenen Phase des retinalen Ganglienzelluntergangs mit RGA als Antigen .....	40
3.6	Probengewinnung.....	40
3.6.1	Blutentnahme und Serumgewinnung.....	41
3.6.2	Augen, Sehnerv und Gehirnentnahme .....	41
3.7	Evaluierung der Zelldichte in der retinalen Ganglienzellschicht .....	42
3.8	Histologische Neuropathologie .....	44
3.8.1	Hämatoxylin& Eosin Färbung .....	45
3.8.2	Luxol Fast Blue Färbung .....	45
3.9	Immunhistologische Neuropathologie .....	46
3.9.1	Immunhistologischer Nachweis von Antikörperablagerungen in der Retina und im N. opticus.....	47
3.9.2	Indirekte Immunhistochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung glaukopathophysiologischer Aspekte .....	47
3.10	Untersuchung des humoralen IgG Antikörperrepertoires gegen okuläres Gewebe .....	49
3.11	Statistik.....	50
3.11.1	T-Test und Tukey's HSD Post Hoc Test .....	50
3.12	Material- und Geräteliste.....	52
3.13	Antikörper, Chemikalien und Medikamente .....	54
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
4.1	In Vivo Parameter .....	56
4.1.1	Enzephalitis-Score .....	56
4.1.2	Intraokulärer Druck.....	56
4.1.3	Funduskopie .....	59
4.2	Dichteverteilung von Neuronen und Glia in Flatmounts .....	59
4.3	Histopathologie und Demyelinisierung des N. opticus .....	64
4.4	Immunhistologische Neuropathologie .....	67
4.4.1	Detektion von IgM und IgG Autoantikörperablagerungen .....	67
4.4.2	Caspasen .....	71
4.4.3	Untersuchung der mikroglialen Verteilung in Retina und N. opticus .....	74
4.5	Zunehmende IgG Antikörperreaktionen gegen okuläres Gewebe .....	79
4.5.1	Verlauf von IgG Antikörperreaktionen der 28 Tage andauernden Studie .....	79
4.5.2	Verlauf von IgG Antikörperreaktionen der 42 Tage andauernden Studie .....	83
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
5.1	Methodische Aspekte .....	87
5.1.1	Induktion der neurodegenerativen Prozesse im EAG und EAE Modell .....	87

---

5.1.2	Intraokulärer Druck und Funduskopie.....	89
5.1.3	Kresylviolett-färbung und Evaluation der retinalen Zelldichte .....	89
5.1.4	Histologie.....	93
5.1.5	Detektion der IgG Antikörperreaktionen gegen okuläres Gewebe .....	94
5.2	Pathophysiologische Hypothese zum Antikörper-vermittelten Ganglienzelltod.	97
5.2.1	Experimentelles Autoimmunes Glaukom.....	97
5.2.2	Experimentelle Autoimmune Enzephalitis.....	103
5.3	Bedeutung der Ergebnisse für die Glaukopathogenese .....	105
5.4	Ausblick .....	108
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>130</b>
8.1	Anhang 1: Färbungen .....	130
8.2	Anhang 2: p-Werte des intraokulären Druckes nach Tukey's Post Hoc Test..	134
8.3	Anhang 3: Vergleich der Färbemuster von IgG Ablagerungen und LFB/N im Sehnerv eines MBP immunisierten Tieres .....	135
8.4	Anhang 4: p-Werte der IgG Antikörperreaktionen nach Tukey's Post Hoc Test	136
	<b>Danksagung.....</b>	<b>137</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>138</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>139</b>

## **Anmerkung**

Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind zum Teil in den nachfolgend aufgeführten Veröffentlichungen enthalten und in Tagungsbeiträgen vorgestellt worden:

### **Publikationen:**

**O.W. Gramlich**, S.C. Joachim, P.F. Gottschling, P. Laspas, C. Cuny, N. Pfeiffer, F.H. Grus (2011): "*Ophthalmopathology in rats with MBP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis*", Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011 Feb 23. (Epub ahead of print)

C. Cuny, S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, P.F. Gottschling, N. Pfeiffer, F.H. Grus (2010): "*Repeated intraocular pressure measurement in awake Lewis rats does not bias retinal ganglion cell survival*", Curr Eye Res, 35(11): 1034-1039

S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, P. Laspas, H. Müller, P.F. Gottschling, V. Stahl, C. Cuny, J. Reichmann, N. Pfeiffer, F.H. Grus (2010): "*Immunoreactivity in animals after immunization with ocular antigens*", Journal of Vision, (in Begutachtung)

P. Laspas, **O.W. Gramlich**, H. Müller, C. Cuny, P.F. Gottschling, N. Pfeiffer, H.B. Dick, S.C. Joachim, F.H. Grus (2010): "*Autoreactive antibodies and loss of retinal ganglion cells induced by ocular antigens*", Invest Ophthalmol Vis Sci, (in Revision)

S.C. Joachim, T. Jehle, C. Dimitriu, **O.W. Gramlich**, N. Boehm, D. Dirk, W.A. Lagreze, N. Pfeiffer, F.H. Grus (2010): "*Effect of ischemia duration on antibody response in a model of retinal ischemia-reperfusion*", Mol Vis, (in Begutachtung)

### **Vorträge auf internationalen Konferenzen:**

**O.W. Gramlich:** „*Complex protein profiles in aqueous humor of Experimental Autoimmune Glaucoma animal model (EAG)*“, 106. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin 2008

---

**O.W. Gramlich:** „*Deposits of Antibodies in Retina Correlates with a Retinal Ganglion Cell Loss in Animals with Experimental Autoimmune Glaucoma*“, 107. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Leipzig 2009

**O.W. Gramlich:** „*Microglia Invasion in Retina During Retinal Ganglion Cell Loss in Animals with Experimental Autoimmune Glaucoma*“, 108. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin 2010

**Posterbeiträge auf internationalen Konferenzen:**

**O.W. Gramlich,** S.C. Joachim, J. Reichmann, N. Pfeiffer, F.H. Grus: „*Complex Protein Profiles in Aqueous Humor of Animals with Experimental Autoimmune Glaucoma (EAG)*“, ARVO, Ft. Lauderdale, FL, USA 2008

J. Reichmann, S.C. Joachim, **O.W. Gramlich,** N. Pfeiffer, F.H. Grus: „*Retinal Ganglion Cell Degeneration Through Immunization with Ocular Antigens*“, ARVO, Ft. Lauderdale, FL, USA 2008

P.F. Gottschling, S.C. Joachim, **O.W. Gramlich,** N. Pfeiffer, F.H. Grus: „*Retinal ganglion cell loss in an Experimental Autoimmune Glaucoma animal model is antigen dependent (myelin basic protein and optic nerve homogenate)*“, 106. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin 2008

**O.W. Gramlich,** S.C. Joachim, P.F. Gottschling, V. Stahl, P. Laspas, N. Pfeiffer, F.H. Grus: „*Antibody accumulation in retina correlates with a loss of retinal ganglion cells in animals with Experimental Autoimmune Glaucoma (EAG)*“, 8th Annual Meeting „Molecular and Cellular Neurobiology“ Johannes Gutenberg-Universität, Mainz 2008

P.F. Gottschling, S. C. Joachim, **O.W. Gramlich,** N. Pfeiffer, F.H. Grus: „*Retinal ganglion cell loss in an Experimental Autoimmune Glaucoma animal model: Immunization with eye-related vs. non-eye-related antigens*“, 8th Annual Meeting „Molecular and Cellular Neurobiology“ Johannes Gutenberg-Universität, Mainz 2008

---

**O.W. Gramlich**, S.C. Joachim, P.F. Gottschling, C. Cuny, V. Stahl, P. Laspas, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Antibody Deposits in Retina Correlate With Loss of Retinal Ganglion Cells in an Experimental Autoimmune Glaucoma Model”*, ARVO, Ft. Lauderdale, FL, USA 2009

S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, P. Laspas, P.F. Gottschling, C. Cuny, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Auto-Retinal Antibodies in Animals With Experimental Autoimmune Glaucoma”*, ARVO, Ft. Lauderdale, FL, USA 2009

P.F. Gottschling, S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, C. Cuny, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Time-Course of Retinal Ganglion Cell Loss in an Experimental Autoimmune Glaucoma Animal Model”*, ARVO, Ft. Lauderdale, FL, USA 2009

**O.W. Gramlich**, S.C. Joachim, V. Stahl, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Accumulation of Antibodies and Activation of Müller Cells in Retina of Animals with Experimental Autoimmune Glaucoma”*, 9th Annual Meeting „Molecular and Cellular Neurobiology“ Johannes Gutenberg-Universität, Mainz 2009

**O.W. Gramlich**, S.C. Joachim, V. Stahl, C. Cuny, P.F. Gottschling, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Invasion of Activated Microglia Cells in Retina During Slow Progressive Retinal Ganglion Cell Loss in an Experimental Autoimmune Glaucoma Model”*, ARVO, Ft. Lauderdale, FL, USA 2010

V. Stahl, S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, P. Laspas, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Sequential Increase of Müller Glia in A Non-Intraocular-Pressure Related Glaucoma Model”*, ARVO, Ft. Lauderdale, FL, USA 2010

P. Laspas, S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, P.F. Gottschling, C. Cuny, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Immunization With Ocular Antigens Leads to Loss of Retinal Ganglion Cells and Increased Immunoreactivity Against Ocular Tissues”*, ARVO, Ft. Lauderdale, FL, USA 2010



---

**O.W. Gramlich**, S.C. Joachim, P.F. Gottschling, P. Laspas, C. Cuny, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Ophthalmopathology in Rats with MBP-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis”*, Rhine-Main Neuroscience Network (rmn<sup>2</sup>), 1. meeting, Oberwesel 2010

S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, S.F. Pirro, H.B. Dick, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Immunoreactivity in Animals with Glaucomatous Retinal Ganglion Cell Loss Through A Retinal Antigen”*, Rhine-Main Neuroscience Network (rmn<sup>2</sup>), 1. meeting, Oberwesel 2010

D. Hoffmann, S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, P. Laspas, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Sequential Increase of Müller Glia in a Non-Intraocular-Pressure Related Glaucoma Model”*, Rhine-Main Neuroscience Network (rmn<sup>2</sup>), 1. meeting, Oberwesel 2010

S.F. Pirro, S.C. Joachim, **O.W. Gramlich**, C. Cuny, P.F. Gottschling, N. Pfeiffer, F.H. Grus: *“Invasion of Activated Microglia Cells in Retina During Slow Progressive Retinal Ganglion Cell Loss in an Experimental Autoimmune Glaucoma Model”*, Rhine-Main Neuroscience Network (rmn<sup>2</sup>), 1. meeting, Oberwesel 2010

---

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADCC	antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bidest.	doppelt destilliert
BRS	Blut-Retina-Schranke
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
Cy 3	Cyanine 3
d.h.	das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
EAG	Experimentelles Autoimmune Glaukom
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GFAP	saures Gliafaserprotein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H&E	Hämatoxin & Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
Iba1	ionized calcium binding adaptor molecule 1
IF	Immunfluoreszenzmikroskopie
IFA	inkomplettes Freund's Adjuvans
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
inl	innere Körnerschicht
IOP	intraokulärer Druck
ipl	innere plexiforme Schicht
kg	Kilogramm
LFB	Luxol Fast Blue
MBP	Myelin basisches Protein
mg	Milligramm
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter

---

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOG	Myelinoligodendroglykoprotein
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
N.	Nervus
n. I.	nach Immunisierung
NaCl	Natriumchlorid
nfl	Nervenfaserschicht
nm	Nanometer
NTG	Normaldruckglaukom
onl	äußere Kömerschicht
opl	äußere plexiforme Schicht
os	äußeres Segment
PAS	Perjod-Schiff
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid Protein
PNS	peripheres Nervensystem
POAG	primäres Offenwinkleglaukom
PTX	Pertussis Toxin
RA	rheumatoide Arthritis
rgcl	retinale Ganglienzellschicht
RGZ	retinale Ganglienzelle
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
rpe	retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
sec	Sekunde
TRITC	Tetramethylrhodamine-Isothiocyanate
XEM	Xylolersatzmedium
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
ÜN	Über Nacht

## 1 Einleitung

“*Losing your nerves? Maybe it's the antibodies.*“ Dieses Zitat deutet an, dass im Rahmen der Forschung zu neurodegenerativen Erkrankungen aktuell die Bedeutung von neuronal reaktiven Antikörpern einen neuen Stellenwert einnimmt (Diamond, Huerta et al. 2009). Bei einigen klassischen autoimmunen Erkrankungen, wie der Myasthenia gravis, sind die Beteiligung der Antikörper bereits seit Jahren gut erforscht. Die betroffenen Patienten besitzen Autoantikörper gegen z. B. den nikotinischen Acetylcholin Rezeptor und der muskelspezifischen Tyrosinkinase der motorischen Endplatten (Conti-Fine, Milani et al. 2006). Die spezifischen Antikörper blockieren dabei die neurotransmittal wirksamen Zentren der Rezeptoren, sodass keine Übertragung des Reizes auf die Muskelzelle möglich ist und es zusätzlich zur immunvermittelnden Reduktion dieser Rezeptoren kommt. Symptomatisch stellt sich das Bild einer zunehmenden Erschlaffung der quergestreiften Muskulatur in wechselnden Muskelgruppen ein (Pourmand 1997). Bei ca. 75% der Erkrankten sind initial die Augenlidheber betroffen, während im voranschreitenden Stadium die Skelettmuskulatur der oberen Extremitäten, des Halses und des Thoraxes stärker beeinträchtigt wird (Stojkovic and Behin 2010). Pathomechanisch gesehen ist der Ursprung auf der humoralen Seite des Immunsystems zu finden, wobei die Erkrankung ebenfalls systemisch manifestiert ist. Doch spielen Autoantikörper auch bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), welches immunologisch als weitgehend isolierten gilt, zunehmend eine Rolle. Auch bei der Multiplen Sklerose (MS) werden seit Jahrzehnten Autoantikörper diskutiert. Hier kommt es ebenfalls zu einer muskulären Atrophie aufgrund des fehlenden neuronalen Stimulus. Das Problem liegt allerdings nicht in der Reizübertragung an der Synapse, bzw. an der Endplatte, sondern vielmehr in der Reizweiterleitung über das myelinisierte Axon (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000; Trapp and Nave 2008). Die MS ist durch eine Verminderung des Muskeltonus gekennzeichnet, welcher sich zunächst schubweise und später in kontinuierlicher Phase etabliert. Einher gehen diese akuten Schübe meist mit chronischen Schmerzzuständen der Patienten. Pathophysiologisch ist die Reizweiterleitung im ZNS aber auch im peripheren, motorischen Nervensystem durch Inflammation und Demyelinisierung der Axone autoimmun maßgeblich durch T-Zellen, also durch die zelluläre Komponente vermittelt (Fletcher, Lalor et al. 2010; O'Brien, Gran et al. 2010). Interessanterweise treten gleichfalls autoreaktive Antikörper gegen Bestandteile der Myelinscheide, wie das Myelin basische Protein (MBP) (O'Connor, Chitnis et al. 2003), das Myelinoligodendroglykoprotein (MOG) (Vojdani, Vojdani et al. 2003), sowie das Proteolipid Protein (PLP) auf (Warren, Catz et al. 1994). Humorale Autoantikörper gegen ersteres besitzen auch „gesunde Menschen“ im Rahmen der

natürlichen, angeborenen Autoimmunität (Hedegaard, Chen et al. 2009). Aktuelle Studien zeigen, dass die Erhöhung von MBP spezifischen IgG Autoantikörpern in kausalem Zusammenhang mit der Erkrankung steht. Dabei wurden erstmals proteolytische Eigenschaften der MBP-Autoantikörper gegen das MBP selbst nachgewiesen. Diese fehlten bei der Vergleichsgruppe gänzlich. Auch korrelierten der erhöhte Titer und die proteolytische Aktivität mit dem fortgeschrittenen Krankheitsstatus der Patienten (Ponomarenko, Durova et al. 2006; Ponomarenko, Durova et al. 2006).

Veränderungen der humoralen Autoimmunität sind nicht alleinig Phänomene der Myasthenia und der MS. Während der letzten 15 Jahre konnten ebenfalls veränderte Autoantikörperreaktionen beim Glaukom nachgewiesen werden (Joachim, Grus et al. 2003; Grus, Joachim et al. 2008; Wax 2010). Das Glaukom ist weltweit die zweit häufigste Erblindungsursache und beschreibt eine heterogene Gruppe von okulären Erkrankungen, welche durch den langsamen, aber progressiven Verlust von retinalen Ganglienzellen und deren Axone definiert ist (Coleman 1999; Bunce and Wormald 2006; Quigley and Broman 2006). Die betroffenen Personen erleiden eine progrediente Verschlechterung des Visus mit deutlicher Beeinträchtigung im Gesichtsfeld. Zurück zuführen ist dies auf die zunehmend eingeschränkte Weiterleitung von Signalen aus der photosensitiven Schicht der Retina, über die retinale Ganglienzelle (RGZ) zum visuellen Cortex. Das Glaukom muss daher ebenfalls als chronische neurodegenerative Erkrankung gesehen werden. Die aktuellen Forschungen zur Ursache fokussieren zahlreiche Schwerpunkte, die neben den mechanischen Faktoren wie dem erhöhten Augeninnendruck, genetische Dispositionen oder vaskuläre Dysregulationen der retinalen Gefäße einbeziehen. Bezogen auf die autoimmunen Mechanismen konnten beträchtliche Alterationen von IgG Antikörpern gegen okuläres Gewebe sowohl im Serum, aber auch in der okulären Flüssigkeit selbst, dem Kammerwasser, nachgewiesen werden (Joachim, Pfeiffer et al. 2005; Joachim, Bruns et al. 2007; Joachim, Reichelt et al. 2008). Hingegen existieren bisher nur Indizien für die Beteiligung einer zellulären Komponente. Welche Funktionen hinter der veränderten Autoimmunität stecken, ob sie epiphänomenal oder als Ursache des Ganglienzellverlustes zu deuten ist, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Auf den ersten Blick weisen die beiden neurodegenerativen Erkrankungen MS und Glaukom kaum Gemeinsamkeiten auf, jedoch bezeichnen einige Aspekte nach detaillierter Recherche überraschende Übereinstimmungen. Neben der bereits erwähnten humoralen Autoimmunität, ist erstaunlicherweise im Frühstadium der MS meist ebenfalls ein deutlicher Visusverlust, welcher auf einer akuten Inflammation des Nervus opticus (Opticusneuritis)

beruht, zu diagnostizieren. Auch hier scheint der Pathomechanismus der Opticusneuritis zunächst klassisch und maßgeblich T-Zell vermittelt zu sein (Frick 1988; Stinissen, Raus et al. 1997). Nachdem die akute Phase, meist nach immunmodulierender Behandlung, zunächst überwunden ist, hält die Visusverschlechterung in den meisten Fällen jedoch an (Shams and Plant 2009). Vieles spricht dafür, dass das langsam progressive Sterben der RGZ durch humorale Mechanismen bedingt ist (van Venrooij and Pruijn 2000). Diese Beobachtungen geben Anlass die Beteiligung von Autoantikörpern am autoimmun assoziierten retinalen Ganglienzellverlust bei der Glaukomerkrankung mittels eines Experimentellen Autoimmun Glaukom (EAG) Tiermodell näher zu untersuchen. Da für die MS ein bereits sehr gut etabliertes Modell und zahlreiche pathophysiologischen Hypothesen existieren, wird dieses als Vergleichsmodell herangezogen. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt allerdings auf dem EAG Modell.

## **1.1 Physiologische Grundlagen**

Um den Mechanismus des retinalen Ganglienzellverlustes besser verstehen zu können, werden zunächst die anatomischen und physiologischen Grundlagen des visuellen Systems erörtert. Da bei beiden Erkrankungen, MS und Glaukom, autoimmun vermittelte Prozesse angesprochen werden, werden anknüpfend an die physiologischen Grundlagen die Themen Immunsystem und Autoimmunität, sowie deren Besonderheit im zentralen Nervensystem erläutert. Aufbauend darauf sollen die beiden neurodegenerativen Erkrankungen, sowie die dazugehörigen Tiermodelle vorgestellt werden.

### **1.1.1 Auge, Retina und Sehbahn**

Das Auge wird während der Embryogenese aus Anteilen der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm gebildet (Wehner and Gehring 1995). Daraus entwickeln sich in konzentrischen Lagen Sklera, Aderhaut und aus dem Neuroektoderm die Retina. Sklera und Aderhaut sind aus Derivaten der Hirnhäute entstanden. Aus der Sklera geht posterior die durchsichtige Kornea hervor und bildet gleichzeitig das bulbäre Abschlussgewebe. Unter der Sklera liegt die Aderhaut, in der zentral die Regenbogenhaut (Iris) und die Pupille angeschlossen sind. Im Zentrum dieser ist die Linse an den Fasern des Ziliarkörpers aufgehängt. Rückseitig bildet die Retina die innerste, halbkreisförmige Schicht. Den Raum zwischen Linse und Retina, dem retinalen Spalt, füllt der gallertartige Glaskörper aus (Campbell 1997). Das Spalten- und Hohlraumssystem des Auges ist vom durchsichtigen Kammerwasser erfüllt. Dieses wird im Ziliarkörper aus Bestandteilen des Serums gebildet und enthält neben zahlreichen Nährstoffen, immunmodulierende Substanzen und

Antioxidantien (De Berardinis, Tieri et al. 1964). Das Kammerwasser folgt einem dynamischen Kreislauf und gelangt durch die Pupille in den vorderen Augabschnitt und verlässt diesen im Kammerwinkel (Winkel zwischen Iris und Kornea) durch den Schlemmschen Kanal. Der Abfluss wird über muskelverwandte Zellen des Trabekelmaschenwerks am Eingang zum Schlemmschen Kanal reguliert. Durch das Verhältnis von Produktionsvolumen und Abflussvolumen entsteht ein hydrostatischer Druck welcher maßgeblich zur Formerhaltung des Auges beiträgt (Vincent, Serre et al. 1991).

Im Mittelpunkt der neuronalen Bestandteile des Auge steht die Retina mit dem Nervus opticus, welche visuelle Reize in einem Wellenlängenbereich von 350–800 nm in chemoelektrische Signale umwandelt, verarbeitet und weiterleitet. Das erste Neuron im visuellen System stellen die beiden stabförmigen oder zapfenförmigen Photorezeptorzelltypen dar, in denen Lichtreize in elektrische Reize transformiert werden. Die Abbildung 1 zeigt eine histologische Übersicht der Retina mit den charakteristischen Schichten. Die Zellkörper der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht (onl), wobei die äußeren, photoaktiven Segmente (os) im retinalen Pigmentepithel (rpe) eingebettet liegen. Die äußere plexiforme Schicht (opl) beschreibt die synaptische Verbindung auf die zweiten Neurone der Sehbahn, den Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen. Die drei Neurozelltypen selbst stellen die innere Körnerschicht (inl) dar, worauf die innere plexiforme Schicht (ipl) mit den Verknüpfungen auf die retinalen Ganglienzellen als drittes Neuron folgt (Grehn 2006; Sanes and Zipursky 2010). Die Axone der RGZs bilden über der Ganglienzellschicht (rgcl) die Nervenfaserschicht (nfl) aus.

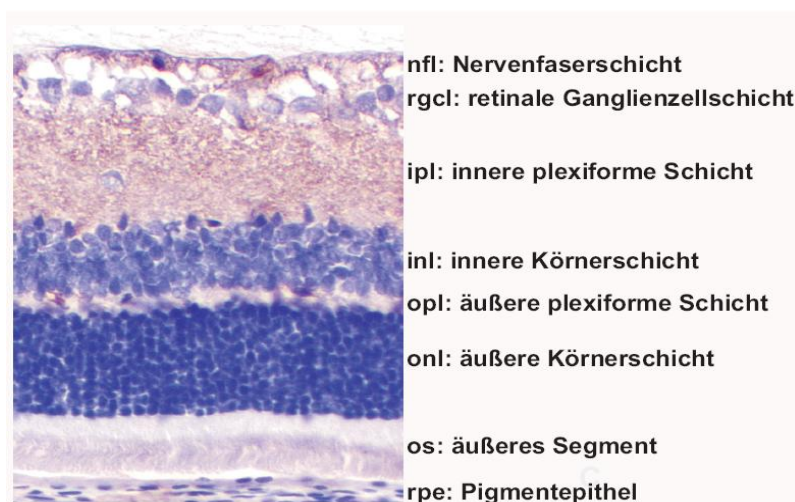


Abbildung 1: Histologische Übersicht der einzelnen Schichten im retinalen Querschnitt nach H&E Färbung. Quelle: Oliver Gramlich

Sie bündeln sich zum Sehnervenkopf und verlassen an der Lamina cribrosa, einer ringförmigen Bindegewebsstruktur, das Auge und bilden den Nervus opticus. Umgeben ist der Sehnerv von der Sklera äquivalenten Dura mater. Im optischen Trakt, welcher mit dem N. opticus beginnt, passieren die Axone der RGZs zunächst das Chiasma opticum. Dort verlaufen die Nervenfasern so, dass die visuelle Information der linken Felder beider Augen in die rechte Hemisphäre des Cortex und umgekehrt übertragen werden. Erst im Corpus geniculatum laterale werden die Axone der Ganglienzellen weiter verschaltet und laufen als Radiatio optica zur primären Sehrinde (Miller 1996; Sanes and Zipursky 2010).

### 1.1.2 Die retinalen Ganglienzellen

Die Verteilung von RGZs innerhalb der Retina ist keinesfalls homogen. Vielmehr sind die Ganglienzellen, je nach Spezies und hier am humanen Beispiel, im fovealen Areal konzentrierter und in der Makula zudem schichtweise übereinander gepackt. In den peripheren Abschnitten vermindert sich zunehmend die Anzahl der RGZ, wobei auch deren Morphologie deutlich von den zentralen Neuronen unterscheidbar ist. In den zentralen Bereichen dominieren Ganglienzellen mit relativ dünnem Axon, schmalen Zellkörper und kleinen Dendriten. Neurone mit großem Zellkörper und dicken Axonen, sind zwar ebenfalls in zentral zu finden, jedoch peripher prominenter (Carelli, Ross-Cisneros et al. 2004). Die RGZs werden in magnozelluläre (große) und parvozelluläre (kleine) Ganglienzellen unterteilt. Die beiden Arten unterscheiden sich nicht nur in ihre Form, sondern auch physiologisch anhand ihrer unterschiedlichen Fortleitungsgeschwindigkeit und Wiederholung der Reizantwort (Rodieck and Brening 1983; Watanabe and Rodieck 1989). Die magnozellulären Ganglienzellen repräsentieren 10% der ca. 1,2 Millionen Nervenfasern im N. opticus und der Retina (Fredericks, Giolli et al. 1988). Sie reagieren phasisch auf Lichtreize und besitzen dadurch eine geringe räumliche, dafür aber eine hohe, zeitliche Auflösung. Zudem weisen die magnozellulären RGZs eine hohe Kontrast und Bewegungsunterscheidung auf und sind daher für die Bewegungs-, Tiefen- und Kontrastwahrnehmung verantwortlich (Merigan 1989). Die parvozellulären RGZs sind für eine hohe räumliche Auflösung, mit nachteiliger zeitlicher Auflösung, verantwortlich. Bei diesem Neuronentyp steht die Verarbeitung von Farbsignalen zu lasten des Kontrastes im Vordergrund. Sie reagieren tonisch auf Lichtreize, haben relativ niedrige Nervenleitgeschwindigkeiten und sind deshalb für die Sehschärfe und die Farbwahrnehmung verantwortlich (De Monasterio and Gouras 1975). Dieser Zelltyp stellt 80% der Nervenfasern des N. opticus. Bei den restlichen 10% handelt es sich koniozellulären RGZs. Sie zeichnen sich durch einen kleinen Zellkörper aus, ähnlich dem der parvozellulären RGZs, bestehen aus zwei Dendritenbäumen und bilden eine direkte



Verbindung mit den Blauzapfen verschalteten Bipolarzellen (Wehner and Gehring 2007). Die Axone sind nur schwach myelinisiert und ziehen in die visuellen Reflexzentren. Das koniozelluläre System ist maßgeblich an der Pupillensteuerung beteiligt.

Die Axone der RGZs liegen in der Nervenfaserschicht in radspeichenartiger Anordnung vor und verlassen das retinale Segment am Sehnervenkopf. Die Nervenfasern sind in diesem Abschnitt noch nicht myelinisiert und relativ reich an Mitochondrien (Abbildung 2). Spätestens nach Passage der Lamina cribrosa liegen sie stark myelinisiert vor und verfügen nur noch über vereinzelte Mitochondrien (Carelli, Ross-Cisneros et al. 2004). Somit herrscht ein asymmetrisches Verhältnis zwischen der Verteilung von Mitochondrien und der Myelinscheide, welches aus stoffwechselphysiologischer Sicht von enormer Bedeutung ist.

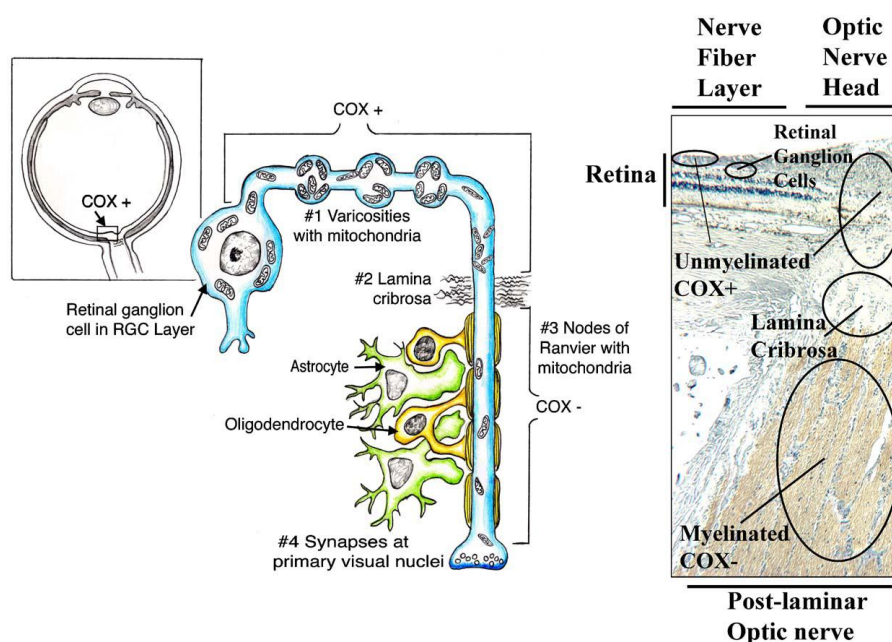


Abbildung 2: Retinales Ganglienzellsystem nach Carelli et al.: Illustration über die Verteilung von Mitochondrien in retinalen Ganglienzellen anhand von Cytochrom C Oxidase (COX). Im linken oberen Bild ist zunächst eine Übersicht des Bulbus gezeigt. Die Box repräsentiert das Areal der vergrößerten schematischen Übersicht mit der Verteilung von Mitochondrien (COX<sup>+</sup>) im Soma. Demnach sind die unmyelinisierten Axone in der Nervenfaserschicht reich an Mitochondrien bis etwa zum Durchtritt der Lamina cribrosa. Ab diesem Punkt sind die Axone myelinisiert und Mitochondrien sind nur noch vereinzelt unter den Ranvierschen Knoten zu finden. Das rechte Bild zeigt die Myelinisierung der Axone in einem sagittalen Querschnitt durch einen humanen Sehnervenkopf nach immunhistochemischer Färbung des Myelin basischen Proteins (MBP).

Die Nervenleitgeschwindigkeit in unmyelinisierten Axonen ist, verglichen mit der saltatorischen Weiterleitung über die ranviersche Schnüfung, relativ langsam und

stoffwechselintensiv. Weiter sind Mitochondrien auf Supplementation mit Metaboliten und Sauerstoff, aber auch auf Beseitigung der Stoffwechselprodukte, z.B. metabolisches Wasser angewiesen (Waxman 1978). Darüber hinaus besitzen Mitochondrien nur eine befristete Lebensdauer, die bei weitem nicht an die der Neurone heranreicht. In der Literatur sind für Mitochondrien Halbwertszeiten von 30-40 Tage angegeben (Wehner and Gehring 2007). Somit müssen „verbrauchte Mitochondrien“ ersetzt werden, was zum einen zytoplasmatische Transportwege voraussetzt und zum anderen auf eine gewisse Kernnähe angewiesen ist. Außerdem bedarf die Reizweiterleitung über das verhältnismäßig lange, myelinisierte Axon ebenfalls ATP. Die grundlegende Ursache dieser Missverteilung ist bis dato jedoch nur hypothetisch und eindeutige Ergebnisse fehlen. Alles deutet darauf hin, dass es sowohl in der Retina als auch in N. opticus unterstützende Zelltypen im Bezug auf den Stoffwechsel, die Myelinisierung und die Supplementation geben muss, die Gliazellen.

### 1.1.3 Die Glia

Das Nervensystem besteht maßgeblich aus den beiden Zelltypen Neuron und Glia. Die Gliazellen sind in allen neuronalen Geweben der Vertebraten präsent und können anhand ihrer physio-morphologischer Merkmale in drei Hauptformen eingeteilt werden: Astroglia, Oligodendroglia und Mikroglia.

Die Astrogliazellen verdanken ihren Namen ihrer sternförmigen Form. Vom Zellzentrum gehen zahlreiche zytoplasmatische Fortsätze aus, die wie Strahlen erscheinen und ein dichtes Netzwerk mit anderen Gliazellen und Neuronen ausbilden. Das Zytoplasma ist reich an Glykogen, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten wie Vimentin und dem sauren Gliafaserprotein (GFAP) (Cohen, Sivron et al. 1994). Gap-Junctions schaffen die klassischen Zell-Zell Verbindungen und ermöglichen so, neben dem Informationsaustausch, ebenfalls den Transport von Ionen und Metaboliten über weite Distanzen hinweg (Araque and Navarrete 2010). Physiologisch sind den Astroglia eine ganze Reihe an Funktionen zugeschrieben, welche die Funktionsfähigkeit des neuronales Gewebes gewährleisten. Beginnend bei der Organogenese des ZNS sind neuronale Differenzierung, das Wachstum von Neuriten, sowie die Richtungsführung des axonalen Wachstums, die Synaptogenese und der Metabolismus maßgeblich durch Astrozyten vermittelt (Kettenmann and Verkhratsky 2008). Auch im adulten ZNS ist der neuronale Metabolismus abhängig von den Gliazellen, bei dem meist ein Transfer von Glykogen zu den Axonen stattfindet (Brown, Baltan Tekkok et al. 2004). Unerlässlich für neuronales Überleben sind gleichfalls die Produktion essentieller, neurotropher Faktoren, sowie die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Kontrolle des

extrazellulären Milieus. Dafür besitzen die glialen Membranen Kanäle für Ionen wie Kalium, Natrium oder Chlorid. Sie verfügen Rezeptoren für Neurotransmitter wie Noradrenalin, Glutaminsäure und Azetylcholin. Damit sind sie in der Lage zu registrieren, welche chemisch gesteuerte, bioelektrische Aktivität an den benachbarten Neuronen gerade abläuft und diese zu begünstigen. Die Astrozyten unterstützen die Übertragung der Nervenimpulse an der Synapse, indem überschüssige Transmitter aufgenommen werden und insbesondere die Glutamatkonzentration durch Ligandenbindung reguliert wird (Deitmer 2000). Die Aufrechterhaltung der ionischen und chemischen Zusammensetzung des Extrazellulärraums hat damit direkten Einfluss auf Überleben und Aktivität von Nervenzellen.

Von grundlegender Bedeutung für die Funktionalität der Retina und speziell für die Informationstransduktion zu und von den RGZs ist die Müller-Zelle. Mittlerweile konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Müller-Zelle astroglialen Ursprungs ist (Marchesani 2005). Dabei handelt es sich um längsgestreckte Zellen, die mit ihren Endfüßchen und den epiretinalen Astrozyten den inneren Abschluss der Retina ausbilden. Der Zellkörper liegt in der inneren Körnerschicht, wobei die untere Endigung an den äußeren Segmenten der Photorezeptoren mündet. Dabei entstehen Verbindungen zu allen neuronalen Zelltypen, sowie zu den retinalen Blutgefäßen. Die Müllerglia kann als Kern einer funktionellen Einheit angesehen werden, an dem ca. 10 Neurone beteiligt sind. In erster Linie werden den Müller-Zellen metabolische Eigenschaften zugesprochen, welche grundsätzlich durch den Stoffaustausch mit Neuronen, mit Blutgefäßen des retinalen Pigmentepithels, sowie des Glaskörpers und dem subretinalen Spalt gekennzeichnet sind (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Gleichfalls werden alle oben genannten neuronal wichtigen Funktionen wie Aufrechterhaltung der Ionen Homöostase und Glutamatrückgewinnung aber auch retinal-spezifische Aufgaben wie Kalium- und Wasser Homöostase und die Beseitigung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) von den Müller-Zellen bewerkstelligt (Bringmann, Pannicke et al. 2009).

Astrozyten und Müller-Zellen können jedoch unter bestimmten pathologischen Umständen wie z.B. Ischämien, Traumata, Inflammationen, mechanischen Strapazen oder neurodegenerativen Erkrankungen in einen reaktiven Phänotypus umgewandelt werden. Zunächst dient diese reaktive Gliose der Neuroprotektion indem, neben der Neutralisation von ROS, die ansteigenden Glutamat- und Kaliumkonzentrationen abgepuffert werden (Sofroniew and Vinters 2010). Das Markenzeichen der Gliose stellt die vermehrte Expression von GFAP dar (Pekny and Nilsson 2005). Problematisch wird es für die Neurone, wenn der pathologische Stimulus über längere Zeit anhält oder periodisch auftritt und somit

die Pufferkapazitäten der Astrozyten den kritischen Punkt überschreiten. Ist dies der Fall wird aus der konservativen reaktiven Gliose eine proliferierende Gliose. Zugunsten des eigenen Überlebens migrieren die Astroglia entweder aus den geschädigten Arealen oder leiten gerade im ZNS die gliale Narbenbildung ein. Besonders die Müller-Zellen neigen durch Eigenmodulation bei okulären Erkrankungen zur Proliferation, wohin gehend die zentralnervöse Astrogliareaktion stark durch Zellen der Umgebung gesteuert wird (Fletcher, Downie et al. 2008; Sofroniew and Vinters 2010).

Die Oligodendroglia stellen den zweithäufigsten glialen Zelltyp und sind die myelinbildenden Glia des Nervensystems. Ihre wichtigste Funktion ist es, die Myelinscheide der Axone während der Entwicklung des Nervensystems zu bilden, diese instand zu halten oder ggf. Axone zu remyelinisieren (Keirstead and Blakemore 1999; Richardson, Kessaris et al. 2006). Im ZNS werden mehrere Neuronen von einer Oligodendrozyte myelinisiert, während im peripheren Nervensystem (PNS) die Schwannsche Zelle (ebenfalls eine Oligodendrozyte) nur ein Neuron elektrisch isoliert (Stevens and Fields 2000). Als funktioneller Baustein der saltatorischen Reizweiterleitung, besteht die Myelinscheide aus ca. 75-80% Lipiden, meist Phospholipide und Cholesterin und zu 20-25% aus Proteinen. Die Hauptproteine in mengenmäßiger Reihenfolge sind MBP, PLP, sowie MOG (Graca 1988; Bradl and Lassmann 2010). Oligodendrozyten sind stoffwechselphysiologisch betrachtet hoch aktiv, wobei der Großteil des hergestellten ATPs für die Myelinisierung und deren Instandhaltung verbraucht wird. Ein geringer Teil, bei den Astrozyten ist es der Hauptanteil, der Metabolite wird an die Axone und deren Neurone übertragen. Allerdings besitzen Oligodendroglia nur geringe Mengen Glutathion, was sie verbunden mit der hohen Stoffwechselrate relativ anfällig für oxidativen Stress macht (Thorburne and Juurlink 1996).

Der dritte Gliazelltyp, der besonders bei pathologischen Vorgängen eine wichtige Rolle spielt, ist die Mikroglia. Sie sind hämatopoetischer Herkunft und haben funktionelle Ähnlichkeit mit systemischen Immuneffektorzellen. Damit gehören die Mikroglia im eigentlichen Sinne dem mononukleär-phagozytären System an und stellen das zelluläre Abwehrsystem des zentralen Nervensystems dar (Graeber and Streit 2010). Unter normalen Bedingungen sind die Mikroglia in einem ramifizierten Zustand, indem sie weite Zell-Zell Verzweigungen mit anderen Mikroglia zu einer Art Netzwerk ausbilden. Dadurch wird die neuronale Umgebung überwacht und so eindringende Mikroorganismen wie Viren, Bakterien oder Fremdmolekülen aber auch pathologische Ereignisse rasch dedektiert. Finden solche Ereignisse statt, werden die Mikroglia aktiviert und sind in der Lage sich amöboid in das beschädigte Area zu bewegen. Dabei können die Mikroglia eine ganze Reihe an Oberflächenrezeptoren

exprimieren, vor allem die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) der Klasse I und II (Kim and de Vellis 2005; Graeber and Streit 2010). Eine Subpopulation der Mikroglia wirken zytotoxisch, andere werden nach ihrer Aktivierung zu Makrophagen und können neben der Phagozytose von sterbenden oder fremden Zellen, Antigene präsentieren. Eine weitere essentielle Aufgabe besteht in der Sezernierung von neuronal und glial wirksamen Chemokinen und dient zur Kontrolle der umliegenden Zelltypen (Soulet and Rivest 2008; Neumann, Kotter et al. 2009). Andere Mikroglia, die bereits mit den Effektormikroglia in Interaktion waren, fungieren als „ByStander“ an Blutgefäßen. Dort treten sie mit T-Zellen in Kontakt und präsentieren die bereits prozessierten Antigene zur systemischen Antikörperproduktion (Raivich, Bohatschek et al. 1999). Eine Aktivierung im pathologischen Sinne findet, ähnlich wie bei den Astrozyten, bei infektiösen, entzündlichen, traumatischen, ischämischen, neoplastischen oder degenerativen Läsionen statt (Raivich, Bohatschek et al. 1999).

## **1.2 Immunsystem, Autoimmunität und immunprivilegierte Regionen**

Das Immunsystem besteht im Wesentlichen aus zwei Subsystemen: der angeborenen, unspezifischen Abwehr und der adaptiven, spezifischen Abwehr. Zu den unspezifischen Abwehrsystemen gehören in erster Linie die physiologischen Barrieren der gewebsabschließenden Schichten und die Epithelien. Weiter gibt es eine ganze Reihe an zellulär vermittelten Prozessen die Pathogene anhand ihrer Oberflächensignatur mittels Rezeptoren als fremd erkennen und eliminieren. Hierzu zählen z.B. die Phagozytose durch Makrophagen oder die Attacke durch natürliche Killer-Zellen und Granulozyten. Der Toll-like Rezeptor ist einer dieser Rezeptortypen und dient zur Erkennung der Pathogen-assoziierten molekularen Muster von Strukturproteinen auf Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten (Kayama and Takeda 2010). Die angeborene Immunabwehr funktioniert allerdings auch auf umgekehrtem Wege, indem körpereigene von körperfremden Zellen anhand des bereits angesprochenen Haupthistokompatibilitätskomplex unterschieden werden können. Praktisch besitzen alle kernhaltigen Körperzellen, die nicht zum Immunsystem gehören, an ihrer Membranoberfläche MHC-Komplexe der Klasse I. Zellen des Immunsystems hingegen tragen MHC Klasse II Komplexe (Campbell 1997). Verfügen Zellen über keinen MHC Komplex werden diese eliminiert. Weiter stellt die Aktivierung des Komplementsystems über den Lecithin und den alternativen Weg eine wichtige Komponente der unspezifischen Abwehr dar.

Die adaptive, spezifische Immunabwehr ist durch ihre Anpassung an neue Pathogene charakterisiert und gliedert sich in die humorale Abwehr und in die zellvermittelte Abwehr.

Die Komponenten dieses Systems sind in der Lage spezifische Strukturen, meist körperfremde Proteine, Kohlenhydrate oder Peptide, die entweder frei oder als Oberflächenstrukturen vorliegen, als Antigen zu erkennen (Wehner and Gehring 1995). Antigene definieren sich darüber „Antikörper generierend“ wirksam zu sein oder durch spezifische Rezeptoren der Lymphozyten erkannt zu werden. Während der Embryogenese entstehen aus pluripotenten Zellen die beiden Lymphozytenklassen: die B-Zellen der humoralen Abwehr und die T-Zellen im Zentrum der zellvermittelten Abwehr (Wehner and Gehring 1995). Reife B- und T-Zellen tragen auf ihrer Membran verschiedene Antigen-Rezeptoren und differenzieren nach Antigenkontakt zu Effektorzellen aus. Die B-Zellen werden zu Plasmazellen und sezernieren spezifische Antikörper äquivalent des stimulierenden Antigens ins Plasma oder differenzieren zu Gedächtniszellen (Moser and Leo 2010). Die Antikörper werden aus multigenen Proteinfamilien gebildet und als Immunglobuline zusammengefasst. Sie bestehen aus vier Polypeptidketten welche variable und konstanten Regionen aufweisen. Die Antikörperbindestelle wird aus Anteilen beider variablen Regionen der jeweilig schweren (H-) Kette und leichten (L-) Kette ausgebildet. Ihre Variabilität erlangen sie durch heterogene Aminosäuresequenzen im Rahmen der somatischen Rekombination. Dabei werden die unterschiedliche Allele der jeweiligen Gene für die leichte und schwere Kette bzw. auch der T-Zell Rezeptoren zufällig miteinander kombiniert, Dabei wird von ca.  $10^{12}$  Kombinationsmöglichkeiten ausgegangen (Brack, Hirma et al. 1978; Moser and Leo 2010). Die konstanten Schaffregionen der H-Ketten werden als Fc-Fragment bezeichnet und sind funktional für die Opsonierung und Anlagerung der Komplementproteine im klassischen Weg zuständig. In diesem Zusammenhang bedeutet Opsonierung die Markierung der Pathogene, wobei diese nicht durch die Antikörper selbst zerstört werden können. Vielmehr blinden die Antikörper einen oder mehrere Antigen-Antikörper-Komplexe aus und werden über den Fc Teil via Fc Rezeptor von phagozytierende Zellen erkannt. Diese internalisieren den gesamten Antigen-Antikörper-Komplex und lysieren ihn (Campbell 1997). Durch die Komplexbildung können Pathogene weitgehend inaktiviert werden, beispielsweise durch Agglutination (Verklumpung) Die Immunglobuline lassen sich fünf Immunglobulinfamilien zusammenfassen IgM, IgG, IgA, IgD und IgE. Dabei kann funktional bei IgG nochmals in 4 Subtypen unterschieden werden.

Die Aktivierung von B-Zellen kann neben der direkten Bindung eines Antigens über zwei weitere Zelltypen erfolgen. Sobald ein Makrophage ein Pathogen durch Phagozytose aufgenommen hat, wird das Antigenfragment durch den MHC-Klasse-II-Komplex an der Membranoberfläche für T-Zellen präsentiert. Diese erkennen den MHC II Komplex über ihren

T-Zell Rezeptor, wobei verschiedene Typen von T-Zellen unterschieden werden können. Das Zusammenspiel der verschiedenen Typen dient zur Modulation der zellvermittelnden Immunantwort. Erkennen T-Helferzellen z.B. als erstes den MHC-Klasse-II-Komplex des Makrophagen, welcher nun aus einer Kombination von Eigen und Fremd besteht, initiieren sie die adaptive Immunantwort. Dies geschieht, neben der Bildung von Zytokinen wie Interferone und Interleukine, durch die Proliferation zu Zellklonen. Anschließend können die T-Helferzellklone B-Zellen stimulieren mit der Folge der spezifischen Antikörperproduktion oder die zelluläre Antwort über weitere T-Zellen verstärken. Regulatorische T-Zellen dienen dabei der Kontrolle der Immunreaktion und verhindern eine überschießende Immunantwort durch Suppression. Sie modulieren so gleichzeitig die immune Selbsttoleranz (Sakaguchi 2000). Auf die Antigene im MHC-Klasse-I-Komplex von körpereigenen Zellen reagieren zytotoxische T-Zellen. Nach pathogenem Ereignis können körpereigene Zellen intrazelluläre Peptide als Epitope in den MHC Komplex einbauen und so eine krankhafte Veränderung dem Immunsystem mitteilen. Die zytotoxischen T-Zellen interagieren mit diesen veränderten MHC I Komplexen und sezernieren zahlreiche Zytokine, welche die Apoptose der betreffenden Zelle einleitet (Crotzer and Blum 2010).

### 1.2.1 Autoimmunität

Von zentraler Bedeutung ist die Fähigkeit des Immunsystems zwischen körpereigenem und körperfremdem zu unterscheiden. Diese Fähigkeit wird als Immuntoleranz bezeichnet. Zentral wird dies durch positive und negative Selektion von reifenden T-Zellen im Thymus erreicht. Grundlage ist die Ausprägung von MHC I und MHC II Molekülen, sowie diversen körpereigenen Peptiden (Autoantigene) am Thymusepithel, woran die Affinität der T-Zell Rezeptoren getestet wird. Kommt es zu keiner Bindung wird die T-Zelle in die Apoptose überführt. Ist hingegen die Affinität so hoch, dass die T-Zelle aktiviert wird, wird sie ebenfalls der Apoptose zugeführt. Die negative und positive Selektion führt daher nur zur Reifung von T-Zellen mit mäßiger Affinität zum MHC Komplex. Diese erkennen im adulten Zustand körpereigenes, werden aber nicht von diesem aktiviert (Blackman, Kappler et al. 1990). Jedoch können nicht alle Autoantigene im Thymus exprimiert werden und die T-Zelle kommt unweigerlich mit unbekanntem Autoantikörpern in Kontakt. In der Ausbildung der peripheren Toleranz wird ihre Aktivierung maßgeblich durch Anergie nach Ausbleiben der Co-Aktivierung, durch Deletion bei hohen Antigenkonzentrationen oder durch regulatorische T-Zellen unterdrückt (Gatzka and Walsh 2007; Srinivasan and Frauwirth 2009). Resultat bleibt jedoch, dass jeder Organismus ein natürliches Repertoire an Autoantikörpern, sowie

autoreaktiven T- und B- Zellen besitzt (Kohler, Bayry et al. 2003). Der natürlichen Autoimmunität wird normalerweise keine destruktive Relevanz zugesprochen und verhält sich bei gesunden Menschen weitgehend konstant (Oppezzo and Dighiero 2003). Autoaggressive Zustände im Rahmen einer autoimmunen Erkrankung können jedoch durch das Ungleichgewicht der regulatorischen Systeme entstehen. Die genauen Mechanismen sind bis dato nicht eindeutig geklärt. Neben genetischen Dispositionen gehen einige Hypothesen von einer Störung während der positiven Selektion im Thymus aus, sodass hyperaffine T-Zellen entstehen. Diskutiert werden ebenfalls Möglichkeiten einer unzureichenden Unterdrückung bestimmter T-Zellen durch die regulatorischen T-Zellen und die Stimulans des gesamten Immunsystems durch größere Mengen an wiederkehrenden Autoantigenen.

### 1.2.2 Immunprivileg des zentralen Nervensystems und des Auges

Manche Organe sind in der Lage eine Immunreaktion nach Auftreten von Antigenen zu tolerieren oder zu unterdrücken. Hierzu zählen das ZNS (Carson, Doose et al. 2006) samt dem Auge (Zhou and Caspi 2010), die Testikel, die Plazenta und der Fötus, aber auch der Thymus selbst (Ferguson, Green et al. 2002). Physiologisch entstehen das Immunprivileg des Gehirns sowie das des Auges durch die räumliche Trennung vom systemischen Immunsystem und der Ausbildungen einer immunologischen Eigenmodulation. Die Trennung wird mit Hilfe der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bzw. der Blut-Retina-Schranke (BRS) erreicht. Die beiden Barrieren bestehen aus zerebralem Endothel des kontinuierlichen Typs, die sich durch fehlenden Fenestrierung und die wenigen endozytotischen Vesikel auszeichnen. Die Ausbildung von Tight-junctions sorgen für eine enorme Stabilität der endothelialen Zell-Zell Verknüpfung und macht eine parazelluläre Diffusion fast unmöglich (Risau, Esser et al. 1998). Zusammen mit den Perizyten und den Astrozyten bilden die Endothelzellen einen dynamisch regulierenden Zellverband, wobei die Astrozyten mehr als 95% der Kapillaroberfläche bedecken. Sie bewerkstelligen den intrazellulären und damit selektiven Transportweg aus dem Kapillarlumen. Die Perizyten sind Zellen mesenchymaler Herkunft mit Basallamina und pluripotenten Eigenschaften. Ihre wesentliche Aufgabe ist es das Kapillarlumen zu regulieren. Astrozyten und Perizyten bilden so eine zusätzliche Barriere gegen immunokompetenten Zellen und Antikörper aus dem Blutstrom (Krause, Kunz et al. 1993). Es stellt sich allerdings die Frage welchen Nutzen ein solches Immunprivileg besitzt, da eigentlich die Inflammation zwei wichtige Vorteile besitzt, nämlich die Vermittlung der Homöostase im Gewebe und die Abwehr von Pathogenen. Die Nachteile, eine T-Zell und Makrophagen bedingte Inflammation verursacht neurotoxische Umstände und führen



gleichzeitig zur Schwellung des Gewebes. Da sich das Gehirn auf Grund seiner Lage im Schädel nur beschränkt ausdehnen kann, ohne dadurch periphere Inflammationen zu provozieren, müssen andere Strategien verfolgt werden. Weiter sind die immunkompetenten Zellen über die Steuerung durch Zytokinen befähigt, entweder die Reparatur von beschädigten Zellen zu begünstigen oder den Zelltod einzuleiten. Werden innerhalb der neuronalen Schaltkreise Schlüsselneurone beseitigt, ist dies meist mit kognitiven und motorischen Defiziten verbunden, die nach synaptischer Neuformung nicht mehr adaptiert werden können (Carson, Doose et al. 2006). Im Auge werden ganz ähnliche Ziele verfolgt. Dort wird die Inflammation zu Gunsten des Visuserhalts unterdrückt (Streilein 2003; Zhou and Caspi 2010). In einigen Studien konnten immunsuppressive Eigenschaften dem Kammerwasser zugeordnet werden. Scheinbar tagen lösliche Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Neuropeptide im Kammerwasser dazu bei, dass T-Zellen nach Antigenkontakt nicht proliferieren und Interferone produzieren (Streilein 1999). Darüber hinaus sind im Kammerwasser ebenfalls diverse Antikörper vorhanden, deren Antikörpermuster allerdings Unterschiede zum Serum aufweisen. Komplettiert wird die Immunsuppression von diversen Molekülen auf okulären Parenchymzellen (retinales Pigmentepithel, Iris, Ziliarkörper), aber auch von der Retina, die entweder die Aktivierung immunokompetenter Zellen direkt verhindern oder diese z.B. über Fas/FasLigand zur Apoptose zwingen (Griffith, Brunner et al. 1995).

### **1.3 Glaukom, Pathogenese und das Tiermodell des Experimentellen Autoimmunen Glaukoms**

Das Glaukom umfasst eine heterogene Gruppe von okulären Erkrankungen, bei der die Pathologie bis zum heutigen Tage nur unzureichend geklärt werden konnte. Die Erkrankung wird häufig unter dem Pseudonym „Grüner Star“ verallgemeinert und meist mit der Tatsache eines erhöhten Augeninnendruckes (IOP) in Verbindung gebracht (Pfeiffer, Krieglstein et al. 2002). Jedoch ist aus weitreichenden Studien bekannt, dass nicht alle Glaukompatienten einen dauerhaft erhöhten IOP zeigen, sondern nur 60-75% der Betroffenen pathologische IOP Werte von mehr als 21 mmHg aufweisen (Sommer, Tielsch et al. 1991). Bei ca. 30% aller Glaukompatienten ist eine glaukomatöse Schädigung nachzuweisen, jedoch auch ein physiologisch normaler Druck (Quigley 1993). Anders herum leiden viele Patienten unter einem erhöhten IOP, der okulären Hypertension, ohne dass initial ein Glaukomschaden vorliegt (Pfeiffer 2005). Somit können nicht alle Phänomene der Erkrankung mit einem erhöhten Augeninnendruck erklärt werden. Der erhöhte IOP ist deshalb mittlerweile nicht

mehr Teil der Definition des Glaukoms, gilt aber weiterhin als wichtigster Risikofaktor. Nach der European Glaucoma Society (EUGS) definiert sich die Erkrankung durch den progressiven und irreversiblen Untergang von retinalen Ganglienzellen und deren Axone (EUGS 2003). Dabei beschreibt sie eine morphologische und physiologische Veränderung der Retina und des Sehnervenkopfes. Das Leitsymptom ist der allmählich fortschreitende visuelle Verlust in bestimmten Teilen des Gesichtsfeldes (Skotome). Die charakteristische Skotombildung beginnt meist zentral mit einem halbkreisförmigen nasales Skotom, welches in Richtung des blinden Fleckes zuwandert. Das folgende Stadium ist durch ein weiteres nasales, jedoch unten liegendes Skotom gekennzeichnet. Letztendlich führt der Gesichtsfeldverfall zur vollständigen Erblindung. Für das Jahr 2020 werden weltweit nahezu 80 Millionen Erkrankte erwartet, wobei alle Altersgruppen betroffen sein könnten und das Risiko bei über 40-Jährigen deutlich ansteigt (World Health Organization 2004; Quigley and Broman 2006). Da aber von einem schleichenden Beginn ausgegangen werden muss, den die Betroffenen zunächst nicht bemerken, wird die Erkrankung erst sehr spät diagnostiziert. Damit dürfte die tatsächliche Zahl an Erkrankten deutlich höher liegen. Eine Prognose ist ebenfalls meist problematisch, da bei Auftreten der ersten Anzeichen des Gesichtsfeldverfalls bereits 20-40% der Ganglienzellen irreversibel geschädigt sind (Guo and Cordeiro 2008).

Es lassen sich primäre und sekundäre Formen des Glaukoms unterscheiden. Die primären Glaukome beruhen auf spontanem Auftreten der Erkrankung. Glaukome, die als Folgeerkrankungen oder auf bestimmte Ursachen zurückzuführen sind, werden als sekundäre Glaukome bezeichnet. Ursachen können z.B.: Traumata des Auges, Inflammationen, Tumorbildung oder die Einnahme bestimmter Medikamente sein (Augustin and Collins 2001). Die wichtigsten Vertreter der primären Glaukome sind das Primäre Offenwinkelglaukom (POAG) und das Normaldruckglaukom (NTG). Das POAG stellt mit einem Anteil von ca. 60-90% den häufigsten Typ dar (Lang 2004). Dabei ist der IOP, bei offenem Kammerwinkel, höher als 21 mmHg, Der typische Verlauf beschreibt den Verlust von retinalen Ganglienzellen, sowie die Schädigung der Papille samt Sehnerv (Sommer, Tielsch et al. 1991). Beim NTG werden ebenfalls glaukomatöse Schädigungen der Retina diagnostiziert, jedoch bei physiologisch normalem IOP. Langzeitmessungen zeigten keine Manifestation bei Werten über 21 mmHg, aber durchaus stärkere Schwankungen im Normbereich mit Tendenzen zu einem verminderten IOP (Sowka 2005). Zu den wichtigsten Vertretern der sekundären Glaukome zählen das Pseudoexfoliationsglaukom, das Pigmentdispersionsglaukom und das Neovaskularisationsglaukom.

### 1.3.1 Pathogenese des Glaukoms

Es existieren unterschiedliche Hypothesen zur Pathogenese des Glaukoms, wobei jedoch keine dieser Theorien ausreichend ist, um alleinig alle Aspekte der Erkrankung zu erklären. Sie sind daher eher als kollektive Mechanismen anzusehen, deren Interaktionen schließlich zum Untergang der retinalen Ganglienzellen führen. Neben der bereits angesprochenen Problematik des IOPs, der zum einen erhöht sicherlich auf mechanischem Wege negativ einwirkt und zum anderen durch Verminderung pathophysiologische Einflüsse besitzt. In indirektem Zusammenhang mit dem IOP stehen Fehlregulationen des okulären Blutflusses. Vor allem Autoregulationen und druckinduzierte Störungen in den retinalen Gefäßen initiierten häufig retinale Ischämien und Reperfusionsschäden mit anschließendem Ganglienzellverlust (Flammer and Orgul 1998; Flammer, Orgul et al. 2002). Bei ischämischen Ereignissen, sowie der Reperfusion entstehen erhöhte Mengen an freie Radikalen und ROS (Galang, Sasaki et al. 2000). Während die freien Radikale über Stickstoffmonoxid Reaktionen zu Nitratverbindungen die Wiederaufnahme von Glutamats hemmen (Flammer, Orgul et al. 2002), führen hohe Konzentrationen an ROS zu intrazellulären Schädigung. Speziell die Membransysteme der Mitochondrien werden durch Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale geschädigt. Zerfallen die Mitochondrien werden Komponente der Elektronentransportkette wie Zytochrom C freigesetzt. Dieses wiederum zählt zu den Apoptose-einleitenden Molekülen und moduliert unter anderem die Caspase vermittelte Apoptose. Ein weiterer Aspekt, der die Einleitung der Apoptose begünstigt ist der fehlende, bzw eingeschränkte Transport neurotropher Faktoren. Sie wirken der Apoptoseinduktion entgegen, indem sie die zellulären Mechanismen für Überleben aktivieren (Vrabec and Levin 2007). Bei Schädigungen des Sehnervens z.B. nach mechanischer Kompression, ist der retrograde Transport neurotropher Faktoren aus dem Neocortex zu den retinalen Ganglienzellen primär nur beeinträchtigt. Der progradierte Verlust an RGZ verstärkt die zunehmende Verminderung sekundär dadurch, dass sich die Anzahl der Axone als Transportwege ebenfalls proportional vermindert. Im Zusammenhang mit mechanischem Stress ist gleichfalls die Aktivierung der Müller-Zellen zu nennen. Nicht nur in verschiedenen Tiermodellen, sondern bei POAG Patienten, aber auch beim NTG konnte eine reaktive Gliose in den Retinae via GFAP Immunhistologie und quantitativer PCR nachgewiesen werden (Tanihara, Hangai et al. 1997; Tezel, Chauhan et al. 2003; Inman and Horner 2007). Wie bereits erläutert, kann die Aktivierung der Gliazellen zunächst als neuroprotektiven Aspekt gewertet werden. Hält die Gliose allerdings über einen längeren Zeitraum an, bedingt sie zwangsläufig den Anstieg an exzitatorischem Glutamat. Bezogen

auf die Toxizität von Glutamat besitzen Neurone gegenüber Gliazellen ungünstigerweise einen relativ niedrigen Schwellenwert (Lipton and Rosenberg 1994). Eine Erhöhung des Glutamatspiegels im Glaskörper und im Kammerwasser konnte in vergangenen Studien gleichermaßen bei Glaukompatienten und in Glaukom Tiermodellen nachgewiesen werden (Dreyer, Zurakowski et al. 1996). Neben den zahlreichen Theorien wird die Beteiligung des Immunsystems vor dem Hintergrund einer autoimmunen Fehlsteuerung ebenfalls in Betracht gezogen (Grus, Joachim et al. 2008; Wax 2010).

### 1.3.2 Autoimmune Komponente der Glaukompathogenese

Mittlerweile belegen zahlreiche Studien eine Veränderung der natürlichen Autoimmunität bei Glaukompatienten im Bezug auf Antikörperreaktionen gegen neuronale bzw. okuläre Antigene (Grus and Sun 2008). Erstmals konnten Wax et al. Ende der 90iger Jahre bei Patienten mit Normaldruckglaukom eine erhöhte Reaktivität von Antikörpern gegen das Sjögren's Syndrom A Antigen, sowie das Hitzeschockprotein (HSP) 60 zeigen (Wax, Barrett et al. 1994; Wax, Tezel et al. 1998). Inzwischen sind mehrere Glaukomformen hinsichtlich ihrer Autoantikörper untersucht worden, wobei der Fokus nicht nur auf den humoralen Autoantikörpern im Serum lag, sondern ebenfalls Kammerwasserproben inkludiert wurden. Die Ergebnisse waren dahingehend interessant, dass im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten nicht nur erhöhte sondern auch erniedrigte Antikörperreaktionen detektiert werden konnten (Joachim, Wuenschig et al. 2007). Derweil wurden diverse Proteine mit antigenem Charakter über immunoproteochemische und massenspektrometrische Verfahren identifiziert. Neben ubiquitären Proteinen mit chaperonen Eigenschaften wie HSP27 (Grus, Joachim et al. 2004), HSP60 (Joachim, Bruns et al. 2007),  $\alpha$ - $\beta$ -Crystallin (Joachim, Bruns et al. 2007) sind ebenfalls einige neuronale und okuläre Strukturproteine wie MBP (Joachim, Reichelt et al. 2008), Vimentin (Joachim, Bruns et al. 2007), GFAP (Joachim, Reichelt et al. 2008),  $\alpha$ -Fodrin (Joachim, Bruns et al. 2007), Glykosaminoglykane (Tezel, Edward et al. 1999) sowie zahlreiche funktionelle Proteine bekannt.  $\gamma$ -Enolase (Maruyama, Ohguro et al. 2000), neuronsepezifische  $\gamma$ -Enolase (Ikeda, Maruyama et al. 2002) oder Glutathion-S-Transferase (GST) (Yang, Tezel et al. 2001) beziehen sich auf letzteres, wobei diese Proteine für die Zellhomöostase essentiell sind. Anzumerken ist außerdem, dass gerade bei den beiden astroglialen Strukturproteine GFAP und Vimentin verminderte Antikörperreaktionen bei Glaukompatienten zu verzeichnen waren und beide Proteine während der reaktiven Gliose verstärkt exprimiert werden. Umgekehrt zeigten sich gegen MBP erhöhte Antikörpertiter, wie sie auch bei MS Patienten im Serum und in der

zerebrospinalen Flüssigkeit vorkommen (Paterson, Day et al. 1981; Warren and Catz 1994). Somit scheint es übereinstimmende Antigene und korrespondierende Antikörperreaktionen innerhalb verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen zu geben. Inwieweit die Alteration der natürlichen Autoimmunität bezogen auf die Antikörperrepertoire und deren Reaktivität eine epiphänomenale Bedeutung aufweist oder als Ursache zu werten ist, kann bis dato nicht geklärt werden. Einige der Antikörperreaktionen sind sicherlich epiphänomenalen Ursprungs, deren Titer im Verlauf der Erkrankung ansteigt. Gerade Antikörpertiter gegen MBP korrelieren häufig mit dem Voranschreiten des Krankheitsstatus bei der MS und sind als diagnostischer Marker in der Diskussion (Ponomarenko, Durova et al. 2006). Unklar ist dabei zu welchem Zeitpunkt und durch welches initiale Ereignis die Erhöhung des MBP-Autoantikörpers resultiert, was wiederum für einen kausalen Zusammenhang spricht. Selbiges ist für die MBP-Antikörperalterationen innerhalb der Glaukompathogenese gültig. In diesem Zusammenhang sind generell mehrere Fragen zu stellen, wieso überhaupt kann eine systemische Immunantwort auf ein Protein aus einer immunprivilegierten Region entstehen, durch welche immunkompetenten Zellen ist sie vermittelt, welche Funktion besitzen die Autoantikörper und an welcher Stelle findet die autoimmune Fehlregulation statt? Mit verschiedenen Autoantikörpern werden protektive und regulatorische Eigenschaften assoziiert. Mechanistisch wird davon ausgegangen, dass diese Autoantikörper zum einen direkt an Zielmoleküle binden und so ihrer physiologische Funktion beeinflussen und zum anderen Oberflächenrezeptoren manipulieren, um auf diese Weise spezifisch die Produktion von Botenstoffen zu veranlassen oder zu hemmen (Poletaev and Osipenko 2003). Ungeachtet dessen bleibt trotzdem das Rätsel des epiphänomenalen oder kausalen Zusammenhangs weiter bestehen. Bei MBP deutete es sich bereits an, dass es Argumente für beide Seiten gibt. So verhält es sich auch bei HSP27, GST und  $\gamma$ -Enolase. Das sekundäre Auftreten jener Autoantikörper ist anhand der immunen Stimulans durch den Verlust von RGZs zu erklären (Wax, Tezel et al. 1998). Durch experimentelle Ansätze konnte jedoch gezeigt werden, dass jeder besagte Autoantikörper gleichfalls in der Lage ist die Apoptose in neuronalen Zellen zu induzieren (Tezel and Wax 2000; Yang, Tezel et al. 2001; Maruyama, Maeda et al. 2002). Weiter wurde ebenfalls die molekulare Mimikry, ähnlich wie bei der MS, mit der autoimmunen Komponente der Glaukomerkrankung in Verbindung gebracht (Romano, Li et al. 1999). Beides spräche wieder für einen kausalen Zusammenhang. Zur Klärung, ob der Untergang von RGZ in vivo antigenspezifisch auf autoimmunem Wege ausgelöst werden kann, wurde das Experimentelle Autoimmune Glaukom (EAG) Tiermodell entwickelt. Angenommen es wäre der Fall, würde dies die These

---

der kausalen Bedeutung von Autoantikörpern in der Pathogenese des Glaukoms weiter untermauern.

### 1.3.3 Das Experimentelle Autoimmune Glaukom Tiermodell

Es existieren bereits zahlreiche und gut etablierte Tiermodelle zum Glaukom, welche entweder mit einer Erhöhung des IOP arbeiten oder den Verlust von RGZ auf chirurgischem und medikamentösem Wege auslösen. Ein chronisch erhöhter IOP kann durch Laser-Photokoagulation des Trabekelmaschenwerkes (WoldeMussie, Ruiz et al. 2001; Levkovitch-Verbin, Quigley et al. 2002), Kauterisierung einer oder mehrerer Episkleralvenen (Shareef, Garcia-Valenzuela et al. 1995), Injektion von hypersaliner Kochsalzlösung in die Episkeralvene (Morrison, Moore et al. 1997) oder die Injektion von Mikropartikel in die vordere Augenkammer (Sappington, Carlson et al. 2010) induziert werden. Ein Ganglienzellverlust ohne Erhöhung des IOPs wird durch Ischämie und Reperfusion der Retina (Smith and Baird 1952; Adachi, Takahashi et al. 1996; Joo, Choi et al. 1999), Manipulation des Sehnervens (Kielczewski, Pease et al. 2005) oder durch intravitreale Injektion von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat (Siliprandi, Canella et al. 1992) ausgelöst. Jedes dieser Modelle beleuchtet dabei nur einen Teilspekt der Glaukompathogenese und keines untersucht die autoimmune Komponente. Aufbauend auf den Daten der autoreaktiven Antikörperreaktion und deren Antigene konnte erstmals für HSP27 und HSP60 gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit diesen Proteinen zum Untergang von RGZ führen (Wax, Yang et al. 2002; Wax, Tezel et al. 2006; Joachim, Grus et al. 2009). In unserer Arbeitsgruppe wurde das EAG Modell durch weitere Antigene und verschiedene neuro-okuläre Homogenate ergänzt und mit ophthalmologische Untersuchungsmethoden wie Funduskopien und Messung des IOP ausgebaut (Gramlich 2007). Bis dato sind jedoch über die neurodegenerativen und pathomechanischen Grundlagen des EAG Modells z.B. welche Komponenten den RGZ Verlust auslösen, begünstigen oder vermitteln und über welchen Weg die Apoptose gesteuert ist, noch wenig bekannt. Durch die engmaschige Messung des IOP während der Studien, mit dem Ergebnis eines physiologisch normalen Druckes, kann der Verlust von RGZ nicht mit der Erhöhung des IOP assoziiert werden.

## 1.4 Multiple Sklerose, Opticusneuritis und das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis

Der neurodegenerativen Pathophysiologie der MS liegt eine autoimmun vermittelte, chronische Inflammation mit Demyelinisierung des ZNS sowie des N. opticus zugrunde (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000; Korn 2008; Petrescu, Pascu et al. 2008). Die Entzündung des Sehnervs gilt als initiales Leitsymptom und tritt bei ca. 20% der Betroffenen auf. Gleichzeitig stellt die Opticusneuritis den wichtigsten Risikofaktor dar (Shams and Plant 2009; Clark, Kebede et al. 2010). Bei einer Mehrzahl der Patienten mit Opticusneuritis manifestiert sich ein deutlicher Visusverlust mit Beeinträchtigung im zentralen Gesichtsfeld. Die frühsymptomatische Beeinträchtigung im visuellen System wird im Rahmen der MS Diagnostik (oder Opticusneuritis) mit Hilfe von visuell evozierten Potenzialen (VEP) untersucht. Zur Reizdarbietung werden beispielsweise blitzevozierte Potentiale angeboten um damit anhand der Potentialdifferenz an der Sehrinde die Latenzzeit sowie die Amplitude zu bestimmen. Daraus lassen sich Muster ableiten, die nicht nur krank oder gesund repräsentieren, sondern Aufschluss über den Ort und die Stärke der Schädigung geben (Borg, Dawes et al. 1993; Borg, Nixon et al. 1994; Hood, Odel et al. 2003). Da die Opticusneuritis nicht immer zwangsläufig mit der MS in Verbindung steht, sondern gleichfalls durch andere Ursachen bedingt ist, wie z. B.: durch generalisierte Infektionserkrankungen, ist zudem eine umfangreiche Differenzialdiagnostik zur Erkundung der Grunderkrankung nötig (Wingerchuk, Lennon et al. 2006; Lagreze 2009). Die Entzündung an sich wird meist mit Antibiotika und Kortikoiden behandelt. Bei 60% der Erkrankten kann der Visus erhalten bzw. verbessert werden, wohin gehend 40% der Erkrankten unter anhaltender Verminderung der Sehfähigkeit oder permanenten Visusverlust leiden (Beck, Cleary et al. 1992). Bezogen auf die ophthalmologischen Gesichtspunkte wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass es während einer MS bedingten Opticusneuritis zur Verdünnung der retinalen Nervenfaserschicht kommt, was einen Verlust von RGZ sowie deren Axone indiziert (Arnold 2005). Unter symptomatischen Gesichtspunkten verläuft das Anfangsstadium der MS in isolierten Arealen des ZNS. Je nachdem, wo der lokale Entzündungsherd aktiv ist, werden die Ausprägungen als „*Clinically isolated syndromes*“ zusammengefasst. Betroffen sind häufig, wie hier am Beispiel der Opticusneuritis die Sehnerven, aber auch Abschnitte im Klein- und Stammhirn, sowie das Rückenmark. Sind Stammhirnareale involviert, äußert sich dieses durch Schluckbeschwerden, Sprechstörungen und Ataxien. Allgemeine Sensibilitätsstörungen und Schmerzzustände, Paresen oder ein spastischer Muskeltonus sind auf Inflammationsherde im thorakalen Abschnitt des Rückenmarks zurück zu führen (Miller,

Barkhof et al. 2005; Miller, Barkhof et al. 2005). Tritt ein Symptom akut auf oder manifestiert sich ein neues, wird dies als Schub definiert. Im Laufe der Erkrankung kombinieren bzw. addieren sich die Symptome aus zunächst schubweisen Verlaufsformen (schubförmig remittierende MS). Diese gehen dann bei ca. 50% der Betroffenen in die sekundär progrediente MS, einhergehend mit einer langsamen aber stetigen Zunahme der neuronalen Dysfunktionen mit stärkerer vegetativen Beteiligung, über (Weinshenker, Bass et al. 1989). Im späten Stadium ist die MS von zunehmenden körperlichen, angefangen bei Funktionsstörungen der Blasen- und Darmaktivität und psychischen Belastungen gekennzeichnet, welche von allgemeiner Ermüdbarkeit über Verlust kognitiver Fähigkeiten bis hin zur Demenz reichen (Rao 1996; Ghaffar and Feinstein 2007).

In den letzten drei Jahrzehnten wurde eine Prävalenz der MS in Europa von 83 zu 100.000 ermittelt. Nach den epidemiologischen Daten erkranken deutlich mehr Frauen als Männer (2:1) und betroffen sind besonders die Altersgruppe von 35-64 Jahren (Pugliatti, Rosati et al. 2006).

#### 1.4.1 Pathogenese der MS und die Experimentelle Autoimmune Enzephalitis

Trotz der zahlreichen Hypothesen sind auch hier, ähnlich wie beim Glaukom, die Ätiologie nicht geklärt. Wie eingangs beschrieben ist es unbestritten, dass es sich bei der MS um eine autoimmun vermittelte Krankheit handelt. Maßgeblich beteiligt an der Demyelinisierung sind T-Zellen, B-Zellen und Autoantikörper. Fraglich ist, wie es zum Ausbruch der degenerativen Autoimmunität kommt. Diskutiert werden momentan, neben der genetischen Disposition, vor allem Modulationen des Immunsystems nach viralen Infekten in der Kindheit (Lundmark, Duvefelt et al. 2007; Salvetti, Giovannoni et al. 2009; Zuvich, McCauley et al. 2010).

Dabei spielt der Mechanismus der molekularen Mimikry eine entscheidende Rolle. Sie entsteht, wenn Peptidsequenzen aus Pathogenen homologe Strukturen mit natürlichen Autoantigenen aufweisen. Für die MS kommen bevorzugt Antigene der Myelinscheide in Frage. Nach Antigenkontakt werden folglich spezifische Antikörper produziert, die dann sowohl das pathogene Antigen als auch das körpereigene erkennen (Libbey, McCoy et al. 2007). Nach Infektion mit Epstein Barr Virus oder dem Herpes Virus steigt das Risiko einer MS Erkrankung (Lunemann, Jelcic et al. 2008; Voumvourakis, Kitsos et al. 2010). In der Tat wurden in viralen Peptiden vermehrt Sequenzhomologien mit neuronalen Proteinen entdeckt. Anhand einer virusinduzierten molekularen Mimikry des PLPs konnte tierexperimentell eine T-Zell Antwort, welche mit einer Demyelinisierung im ZNS gekoppelt war, ausgelöst werden (Olson, Eagar et al. 2002; Croxford, Olson et al. 2005). Beide Observationen sind fester



Bestandteil der Pathophysiologie zum Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE). Das klassische EAE Modell basiert auf der Immunisierung von verschiedenen Rodentia und Primaten mit Extrakten aus meist bovinen Gehirnen. Die Immunisierungen wurden oftmals mit Vehikeln und verstärkenden Substanzen kombiniert, wobei sich die immunogenen Reaktionen quantitativ und qualitativ mit komplettem oder inkomplettem Freund's Aduvans und Pertussis Toxin steigern ließen. Pathophysiologisch zeigten sich die Symptome der MS mit Paralysen, Demyelinisierungen im ZNS, Infiltration von T-Zellen und dem Nachweis von autoreaktiven Antikörpern (Levine and Wenk 1965; Swanborg 1995; Wekerle 2008). In relativ kurzer Zeit konnten die tatsächlichen enzephalogenen Proteine, die zur Induktion nötig waren bis auf ihre Peptidsequenz identifiziert werden. Wenig verwunderlich war, dass die kompetentesten gleichzeitig diejenigen Antigene waren, gegen die die meisten MS Patienten Autoantikörper besitzen und allesamt Strukturproteine der Myelinscheide sind: MBP, PLP und MOG (Swanborg 1995; Krishnamoorthy and Wekerle 2009). Bezogen auf die Opticusneuritis, war es ebenfalls möglich diese durch die Immunisierung mit PLP oder MOG in der Maus zu induzieren (Shao, Huang et al. 2004; Shindler, Ventura et al. 2008). Für PLP konnte ein signifikanter Verlust von RGZ bei gleichzeitiger Demyelinisierung des Sehnervens nachgewiesen werden (Shindler, Guan et al. 2006; Shindler, Ventura et al. 2008). Zu den Auswirkungen einer MOG Immunisierung auf RGZ gibt es momentan nur Vermutungen (Shao, Huang et al. 2004) und für MBP noch keine Daten.

---

## 2 Zielsetzung

In den vergangenen Jahren konnten zahlreiche Studien die Veränderung des natürlichen Repertoires an Autoantikörpern bei verschiedenen Glaukomformen aufzeigen. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie einer autoimmunen Komponente in der Pathogenese des Glaukoms. Einige Antigene der autoreaktiven Antikörper konnten bereits identifiziert werden, wobei neben verschiedenen HSPs auch zahlreiche, neuronal assoziierte Strukturproteine wie das Myelin basische Protein (MBP) oder das saure Gliafaserprotein (GFAP) und einige neurophysiologische Proteine vertreten sind. Um das neurodegenerative Potential dieser Antigene zu untersuchen wurde das EAG Modell entwickelt, mit dem der Verlust von retinalen Ganglienzellen (RGZ) in Ratten durch die Immunisierung von beispielsweise HSPs ausgelöst werden konnte. Jedoch sind bei den Glaukompatienten nicht einzelne Antikörperreaktionen verändert, sondern vielmehr zeigt sich das Bild eines komplexen Autoantikörpermusters gegen ubiquitäre Proteine, Proteine der Retina und Proteine des Sehnervens. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe die Wirkung der Immunisierung eines komplexen Gemisches des Sehnervproteoms auf die RGZ untersucht. Durch die Applikation der opticus-assoziierten Antigene war ebenfalls ein signifikanter Verlust von RGZ nach 10 Wochen zu verzeichnen. Unklar war dabei wie der Verlust vermittelt wird und nach welcher Laufzeit der Ganglienzellverlust erstmals signifikant wird. Die primäre Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, die Auswirkungen der Immunisierung opticus-assoziierten Antigene zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Laufzeiten von 14, 28 und 42 Tagen wurden gewählt, um die Phasen mit möglichem langsam progradienten RGZ Verlust zu untersuchen. Weiter ist für das EAG Modell vorgesehen, das Homogenat mit den opticus-assoziierten Antigene gegen ein Homogenat, bestehend aus Antigenen der retinalen Ganglienzellschicht zu tauschen. Damit soll erstmals der Effekt retina-assoziierten Antigene und die daraus resultierenden Antikörperreaktionen auf die RGZ untersucht werden. Durch Untersuchungen am EAE Modell ist das neurodegenerative Potential von MBP weitgehend bekannt, jedoch liegen keinerlei ophthalmologische Daten vor. Ebenfalls ist innerhalb der EAE unbekannt, ob die Immunisierung von MBP einen Verlust von RGZ induziert. Hier besteht die Möglichkeit ophthalmologische Gesichtspunkte der Glaukompathogenese vergleichend in beiden Modellen zu untersuchen. Darüber hinaus soll die MBP induzierte EAE als interne Referenz des Immunisierungsversuches angesehen werden, um so die Wirkungsweise und den Verlauf des EAG Modells interpretieren zu können. Zu diesem Zweck wird das MBP zu allen drei Studienzeitpunkten als Antigen eingesetzt. Eine Studie besteht damit aus einer Kontrollgruppe, einer Gruppe immunisiert mit

---

einem der beiden Homogenate und eine Gruppe, welche mit MBP immunisiert wird. Um herauszufinden, ob der mögliche Ganglienzellverlust antigenspezifisch ist, wird additiv bei der 28 Tage andauernden Studie Keratin als nicht neuronales Antigen einer vierten Gruppe appliziert. Die primären Untersuchungsparameter während der Studien sind die Messung des IOP sowie die funduskopischen Untersuchungen. Nach Ablauf der Studien erfolgen die Evaluierung und statistische Analyse der retinalen Ganglienzelldichten.

Aufbauend sind drei weitere Studien mit ähnlichem Design geplant, mit dem Ziel eine Hypothese zum retinalen Ganglienzelluntergang für beide Modelle anhand klassischer Histopathologie und immunhistochemischen Färbemethoden zu erarbeiten. Grundlegend gilt es festzustellen, ob nach Hämatoxylin&Eosin und Luxol Fast Blue Färbung Infiltrate und Demyelinisierungen im Sehnerv nachweisbar sind. Damit kann nicht nur zweifelsfrei geklärt werden, ob möglicherweise eine Opticusneuritis bei der MBP induzierten EAE vorliegt, sondern ebenfalls ob Demyelinisierungsvorgänge innerhalb der EAG Pathogenese eine Rolle spielen. Ebenfalls von grundlegender Bedeutung ist das Auftreten von Autoantikörpern in der Retina und im Sehnerv der Versuchstiere. Diese Beweisführung gilt als essenzielle Grundlage für das Modell, denn unter der Annahme, dass der RGZ Verlust Antikörper vermittelt ist, müssten Antikörperablagerungen nach Immunisierung in den betreffenden Geweben nachweisbar sein. Darüber hinaus stellt sich die Frage, inwieweit sich die Reaktivität des humoralen Antikörperrepertoires nach Immunisierung im Studienverlauf verändert und ob spezifische Antikörperreaktionen gegen okuläres Gewebe auftreten. Diese Analyse soll anhand eines adaptierten immunhistochemischen Färbeverfahrens bewerkstelligt werden.

Durch die immunhistologische Darstellung verschiedener Caspasen in der Retina soll geklärt werden, ob die RGZ über den extrinsischen oder den intrinsischen Apoptoseweg sterben. Beide Wege repräsentieren Teilaspekte der Glaukompathogenese, die entweder (auto-)immun oder durch oxidativen Stress induziert sind. Im Zusammenhang mit der möglichen Apoptose von RGZ soll die Beteiligung der Mikroglia als immunokompetente Zelle des ZNS quantitativ und qualitativ charakterisiert werden. Hierzu ist das morpho-physiologische Studium der Mikroglia mittels Immunhistologie unter Verwendung des mikroglialen Markers Iba1 geplant.

Die tierexperimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation dienen somit grundlegenden zur Beantwortung pathomechanischer Fragestellungen zu Antikörper vermittelten Aspekten innerhalb neurodegenerativer Erkrankungen.

### **3 Material und Methoden**

Material und Methoden sind zusammenfassend aufgeführt. Zunächst wird die tierexperimentelle Methodik erläutert und anschließend die immunhistochemischen und immunhistoproteochemischen Ansätze beschrieben. Die Material- und Gerätelisten befinden abschließend am Ende des Kapitels.

#### **3.1 Versuchstiere und Studiendesign**

Alle Tierversuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland Pfalz genehmigt und wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz mit einem 12 h Tag/Nacht Zyklus bei konstanten 23°C untergebracht. Basierend auf vorherigen Studien wurden für alle Experimente männliche Lewis-Ratten von Charles River Laboratories verwendet. Die Tiere besitzen eine erhöhte Empfindlichkeit bezüglich autoimmuner und inflammatorischer Störungen und eignen sich deshalb besonders zur Untersuchung autoimmun mediierter Neurodegeneration und autoaggressiver Schädigungen. Als Beispiele sind die experimentelle autoimmun Encephalomyelitis (EAE) oder die Adjuvans-induzierte Arthritis zu nennen (Levine and Wenk 1965; Sternberg, Wilder et al. 1990; Swanborg 1995; Mannie, Swanborg et al. 2009).

Nach primärer Untersuchung, sowie Markierung der Versuchstiere in zufälliger Reihenfolge, erfolgte die Induktion neurodegenerativer Prozesse durch die intraperitoneale Injektion mit Antigenen in Kombination mit inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) und Pertussis Toxin (PTX). Die jeweiligen Kontrollgruppen (CO) erhielten nur IFA, PTX und Natriumchlorid (NaCl) als Ersatzlösung anstelle des Antigens.

Für alle Studien wurde ein standardisierter Untersuchungszyklus im zwei Wochen Rhythmus eingehalten. Dieser beinhaltete neben der allgemeinen Untersuchung, die wiederholte Messung des intraokulären Druckes mittels Applanationstonometer, die Blutentnahme aus der Schwanzvene, sowie die Funduskopie unter Narkose. Routinemäßig wurden die Versuchstiere wöchentlich gewogen. Zur Evaluierung der Ausgangsparameter als Baseline wurde dieser Zyklus erstmalig vor der Immunisierung durchgeführt. Nach den Immunisierungen wurden die Tiere engmaschig auf neurologische Defizite untersucht. Aus den Studien zur EAE ist bekannt, dass sich ca. ab dem 7. Tag nach Immunisierung bei den Versuchstieren Lähmungen der Extremitäten bis hin zur Paralyse ausbilden können. Schweregrad und Beginn der Lähmung (Enzephalitis-Score oder EAE-Score) sind abhängig vom der Applikationsweise, den verwendeten Antigenen, deren Konzentration, sowie von den verschiedenen Adjuvansen (Davis 1999). Die Eingruppierung in einen Schweregrad erfolgt

nach den aufgeführten Symptomen (Devaux, Enderlin et al. 1997). Der Enzephalitis-Score ist im Rahmen der EAE standardisiert:

Schweregrad 0 = asymptotische Tiere

Schweregrad 1 = Paralyse des Schwanzes

Schweregrad 2 = Paralyse des Schwanzes, Schwächung der Hinterbeine

Schweregrad 3 = Paralyse der Hinterbeine

Schweregrad 4 = Paralyse der Hinterbeine, Schwächung der Vorderbeine

Schweregrad 5 = Komplette Paralyse, Tod

Nach Ablauf der Studienlaufzeit wurden alle Tiere mit Kohlendioxid getötet und eine Herzpunktion zur finalen Blutentnahme durchgeführt. Für die histologischen Untersuchungen wurden Augen, Sehnerv und Gehirn präpariert und in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

### **3.2 Messung des intraokulären Druckes und Funduskopie**

Die nicht-invasive Messung des intraokulären Druckes mit dem Applanationstonometer TonoPen XL (Medtronic, Basweiler, Deutschland), sowie die anschließende Funduskopie wurde nach Vorgabe von Cuny et al. durchgeführt (Cuny, Joachim et al. 2010).

Der Wert des IOPs wurde bei nicht narkotisierten Ratten unter kornealer Oberflächenanästhesie mit Oxybuprocain 0,4% gemessen. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt erfolgten zehn Messungen pro Auge. Daraus ließen sich der Mittelwert, Standardabweichung (SD) und der statistische Fehler (SE) für jedes Tier berechnen.

Die Funduskopie erfolgte unter intramuskulärer Ketanest-Xylazin Narkose mit einer Dosierung von 5 mg/kg Xylazin und 45 mg/kg (Wiesner and von Hegel 1985). Um eine Mydriasis einzuleiten wurde zuvor Mydriatikum auf die Kornea appliziert. Der Fundus konnte, nach Begradigung der natürlichen Korneakrümmung unter Verwendung von Deckglas und Methocel Gel, auf pathophysiologische Veränderungen untersucht werden. Zur Dokumentation wurden die Fundi mit einer Digitalkamera fotografiert. Nach dem Procedere wurden die Augen vorsorglich mit Bepanthen und einer antibakteriellen Salbe versorgt. Neben dem Wärmeerhalt während der Narkose und bis zum vollständigen Erwachen der Tiere wurden stets die Vitalparameter kontrolliert.

### **3.3 Immunisierung und Antigene**

Die Injektionen wurden immer am Tag der Immunisierungen aus den drei Komponenten: dem Antigen, inkomplettes Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin hergestellt. Mit einer Luer-

Lok Spritze, versehen mit 20 oder 21 Gauge Nadeln, wurde die Immunisierung intraperitoneal in den linken unteren Quadranten des Abdomens verabreicht. Unmittelbar nach der Immunisierung und dann in täglichen Abständen wurden die Versuchstiere auf Bewegungsstörungen, Blutungen, Knotenbildung und Entzündungen rund um die Injektionsstelle untersucht.

### 3.3.1 Myelin basisches Protein

Zur Induktion der EAE wurde ein aufgereinigtes Proteingemisch des Myelin basischen Proteins verwendet, welches die „enzephalogenen Peptide“ MBP<sub>68-86</sub>, MBP<sub>73-86</sub> und MBP<sub>87-99</sub> enthielt. Es stammte aus bovinem Gehirn und wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt.

### 3.3.2 Opticus- assoziierte Antigene

Zur Herstellung eines Proteinhomogenates opticus-assoziierter Antigene (ONA) wurden bovine Sehnerven verwendet. Diese wurden zuvor gereinigt, die umgebende Faszie entfernt und mit Mörser und Pistill unter Stickstoffzugabe zu einem feinen Pulver homogenisiert. Anschließend wurde dieses Pulver in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford 1976) ermittelt und die Immunisierungslösung auf 8 mg/ml eingestellt.

### 3.3.3 Retinale Ganglienzellschicht- assoziierte Antigene

Hierbei handelte es sich um ein Homogenat bestehend aus Antigenen der retinalen Ganglienzellschicht (RGA). Aus frischen bovinen Bulben wurde die Retina entnommen und diese sorgfältig in PBS gewaschen. Zur Isolation der retinalen Ganglienzellschicht wurde die Eigenschaft der inneren plexiformen Schicht als retinale Schwachstelle zur Trennung ausgenutzt. Zunächst wurden Teilstücke der Retina (ca. 2x2 cm) auf Filterpapier überführt, sodass die retinale Ganglienzellschicht nach oben orientiert war. Das Präparat wurde für eine Stunde im Inkubator bei 37°C getrocknet. Unter mikroskopischer Kontrolle ließ sich die Ganglienzellschicht in einem mit PBS gefüllten Wasserbad ab präparieren. Diese konnte in flüssigem Stickstoff eingefroren und durch Mörsern homogenisiert werden. Die Immunisierungslösung wurde ebenfalls auf 8 mg/ml eingestellt.

### 3.3.4 Keratin

Aufgereinigtes Keratin (KER) aus bovinen Hufen wurde als nicht-neurales Antigen mit einer Konzentration von 1mg/ml verwendet. Es ist kommerziell erhältlich und diente zum

Beweis, dass der Untergang von retinalen Ganglienzellen auf eine Immunantwort neuronal-assoziierte Proteine zurückzuführen ist.

### **3.4 Studien zur Evaluierung des retinalen Ganglienzelluntergangs**

Es erfolgten im Rahmen dieser Arbeit drei Studien zur Evaluierung des retinalen Ganglienzelluntergangs als Primärparameter. Alle waren als Endzeitstudien mit Laufzeiten von 14, 28 und 42 Tagen konzipiert. Bei Immunisierung hatten die Tiere ein Alter von 6-7 Wochen und ein Gewicht von 220-270 g. Zur Bestimmung der Ausgangsparameter als Baseline wurden bei jeder Studie vor der Immunisierung standardisiert folgende Maßnahmen durchgeführt:

1 Woche vor Immunisierung: Gewöhnung der Tiere an den Untersucher, Augeninnendruckmessung zum Training des Verfahrens

3 Tage vor Immunisierung: Blutentnahme aus der Schwanzvene

2 Tage vor Immunisierung: Augeninnendruckmessung und Funduskopie

#### **3.4.1 Studie mit 14 Tage Laufzeit**

Tag 0: Immunisierung (Antigene plus inkomplettes Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin)

Gruppen:

MBP: 1 mg/ml MBP + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=5)

ONA: 8 mg/ml ONA + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=5)

CO: 1 ml NaCl 0,9% + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=5)

Tag 1: Untersuchung der immunisierten Tiere, bei Auffälligkeiten engmaschige Überwachung

2 Wochen nach Immunisierung: Augeninnendruckmessung und Funduskopie

Alle Tiere werden getötet, Herzpunktion zur Blutentnahme, Augen- und Sehnervenentnahme, Gehirnentnahme

### 3.4.2 Studie mit 28 Tage Laufzeit

Tag 0: Immunisierung (Antigene plus inkomplettes Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin)

Gruppen:

MBP: 1 mg/ml MBP + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=5)

ONA: 8 mg/ml ONA + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=5)

KER: 1 mg/ml Keratin + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=5)

CO: 1 ml NaCl 0,9% + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=5)

Tag 1: Untersuchung der immunisierten Tiere, bei Auffälligkeiten engmaschige Überwachung

2 Wochen nach Immunisierung: Blutentnahme aus der Schwanzvene, am Folgetag Augeninnendruckmessung und Funduskopie

4 Wochen nach Immunisierung: Augeninnendruckmessung

Alle Tiere werden getötet, Herzpunktion zur Blutentnahme, Augen- und Sehnervenentnahme, Gehirnentnahme

### 3.4.3 Studie mit 42 Tage Laufzeit

Tag 0: Immunisierung (Antigene plus inkomplettes Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin)

Gruppen:

MBP: 1 mg/ml MBP + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=10)

RGA: 8 mg/ml RGA + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=10)

CO: 1 ml NaCl 0,9% + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=10)

Tag 1: Untersuchung der immunisierten Tiere, bei Auffälligkeiten engmaschige Überwachung

2 Wochen nach Immunisierung: Augeninnendruckmessung und Funduskopie, am Folgetag Blutentnahme aus der Schwanzvene

4 Wochen nach Immunisierung: Blutentnahme aus der Schwanzvene, am Folgetag Augeninnendruckmessung und Funduskopie, Booster-Immunisierung mit der halben Antigen-Dosis der ursprünglichen Immunisierung sowie 250 µl IFA + 1,5 µg PTX

6 Wochen nach Immunisierung: Augeninnendruckmessung, Funduskopie, anschließend Tötung aller Tiere, Herzpunktion zur Blutentnahme, Augen- und Sehnervenentnahme, Gehirnentnahme.



### 3.5 Studien zur neuropathologischen Untersuchung

Um die statistische Sicherheit des Ganglienzellverlustes 14 und 28 Tage nach Immunisierung zu gewährleisten, wurden beide Augen jedes Versuchstieres für Evaluierung verwendet. Zur Berechnung der Ganglienzelldichte zur 42 Tage Studie genügte ein Auge pro Tier. Aufgrund der limitierten Anzahl von Augen, Sehnerven und Gehirne der Evaluierungsstudien wurden für die neuropathologischen Untersuchung drei weitere Studien durchgeführt. Die Versuchstiere der einzelnen Studien waren ebenfalls in einem Alter von 6-7 Wochen und hatten ein Gewicht von 220-270 g

#### 3.5.1 Longitudinale Verlaufsstudie mit ONA als Antigen

Tag 0: Immunisierung (Antigene plus inkomplettes Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin)

Gruppen:

ONA: 8 mg/ml RGA + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=15)

CO: 1 ml NaCl 0,9% + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=15)

Tag 1: Untersuchung der immunisierten Tiere, bei Auffälligkeiten engmaschige Überwachung

8 Tage nach Immunisierung: Fünf Tiere pro Gruppe werden getötet, Herzpunktion zur Blutentnahme, Augen- und Sehnervenentnahme, Gehirnentnahme. Augeninnendruckmessung und Funduskopie einen Tag vor Tötung. Für die übrigen Studiengruppen: Augeninnendruckmessung und Funduskopie, am Folgetag, Blutentnahme aus der Schwanzvene.

14 Tage nach Immunisierung: Fünf Tiere pro Gruppe werden getötet, Herzpunktion zur Blutentnahme, Augen- und Sehnervenentnahme, Gehirnentnahme. Augeninnendruckmessung und Funduskopie einen Tag vor Tötung. Für die übrigen Studiengruppen Augeninnendruckmessung und Funduskopie, am Folgetag, Blutentnahme aus der Schwanzvene.

22 Tage nach Immunisierung: Alle verbleibenden Tiere pro Gruppe werden getötet, Herzpunktion zur Blutentnahme, Augen- und Sehnervenentnahme, Gehirnentnahme. Augeninnendruckmessung und Funduskopie einen Tag vor Tötung.

#### 3.5.2 Histopathologische Studie in der frühen Phase des retinalen Ganglienzelluntergangs mit MBP induzierter EAE als Referenz

Zur Untersuchung der neurodegenerativen Prozesse in der Frühphase mittels histologischen und immunhistochemischen Methoden wurde eine Studie mit den Antigenen MBP, RGA,

ONH in Anlehnung des klassischen Studiendesigns der EAE durchgeführt. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Pathomechanismus der EAE und des EAG Modells mit seinen beiden Homogenaten zu detektieren, werden die Versuchstiere aller Antigengruppen sowie der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt eines akuten EAE-Score der MBP immunisierten Tiere getötet.

2 Tage vor Immunisierung: Allgemeine Untersuchung; Fundus Untersuchung

Tag 0: Immunisierung (Antigene plus inkomplettes Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin)

Gruppen:

MBP: 1 mg/ml MBP + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=5)

RGA: 8 mg/ml RGA + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=3)

ONA: 8 mg/ml ONA + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=2)

CO: 1 ml NaCl 0,9% + 500 µl IFA + 3 µg PTX (n=3)

10- 14 nach Immunisierung: Die mit MBP immunisierten Tiere werden je nach EAE-Score zwischen dem 10. und 14. Tag getötet. Dabei wird die Hochphase der Lähmung als Todeszeitpunkt festgelegt. Alle anderen Tiere werden anteilmäßig im gleichen Zeitraum simultan der Lähmung, aber spätestens nach 14 Tagen getötet.

### 3.5.3 Histopathologische Studie in der fortgeschrittenen Phase des retinalen Ganglienzelluntergangs mit RGA als Antigen

Aufgrund der Annahme, dass sich die neurodegenerative Hochphase des potentiell weniger pathogenen Antigens RGA aufgrund der retinalen Spezifität um den 42. Tag nach Immunisierung manifestiert, wurde eine weitere Studie mit diesem Antigen bei kongruenter Laufzeit durchgeführt. Die histologischen Untersuchungen zur retinalen Antikörperablagerung inkludierten hier neben der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie die konfokale Mikroskopie. Das Studiendesign, das Antigen samt Immunisierung und die Durchführung waren identisch zur 42 Tage dauernden Studie. Die Gruppengrößen wurden auf n=10 festgelegt.

### 3.6 Probengewinnung

Im Verlauf der Studien und nach Tötung der Versuchstiere wurden Blutproben entnommen. Alle weiteren Proben, sowie alle Organe zur histologischen Untersuchung wurden post mortem gewonnen. Für weitere Studien, die jedoch nicht Bestand dieser Arbeit waren, wurden zusätzlich Organe, Kammerwasser und Liquor entnommen.

### 3.6.1 Blutentnahme und Serumgewinnung

Zur Punktion der dorsalen Schwanzvenen wurde die Ratte in eine spezielle „Rat Restrainer“ Plexiglasröhre gesetzt, sodass durch Aussparungen Extremitäten und Schwanz gut zugänglich waren. Zur Verbesserung der peripheren Durchblutung wurde die Ratte vor der Blutentnahme drei Minuten lang mit einer Rotlichtlampe bestrahlt und anschließend der Schwanz mit warmes Wasser von proximal nach distal gereinigt. Die Blutentnahme erfolgte mit einer 1 ml Einwegspritze und einer 27 Gauge Kanüle bevorzugt im unteren Drittel des Schwanzes. In der Regel konnte so problemlos 1 ml Blut abgenommen werden. Das Blut wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert.

Direkt nach der Tötung wurde Blut durch Herzpunktion gewonnen, hierfür fanden eine 1 ml-Luer-Lok-Einwegspritze und eine 20 Gauge-Kanüle Verwendung. Die Ratten wurden auf dem Rücken gelagert und die Vorderläufe in Lebendstellung gebracht. Ca. 1 cm unterhalb der Axillarlinie und 5 mm links parasternal wurde punktiert. Es konnten so zwischen 7 ml und 14 ml Vollblut gewonnen werden. Bis zur Zentrifugation wurden die Blutproben für 30 min auf Eis gelagert und anschließend in einer Biozentrifuge eine halbe Stunde lang bei 12.000 g und einer Temperatur von 7°C zentrifugiert. Der Serum Überstand wurde anschließend abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Serumproben wurden für spätere Untersuchungen bei -80°C gelagert.

### 3.6.2 Augen, Sehnerv und Gehirnentnahme

Unmittelbar nach der Tötung der Tiere und der Gewinnung von Blut, Kammerwasser und Liquor folgte zunächst die Entnahme beider Augen mit Erhaltung des vorderen Sehnervenabschnittes und abschließend die Gehirnentnahme. Die Bulbi wurden zunächst in 4% PFA für zwei Stunden fixiert und anschließend in PBS bei 4°C aufbewahrt. Aus diesen Bulben wurde die Retina als Flachpräparat (Flatmount) entnommen und wie nachfolgend beschrieben gefärbt. Das Gehirn wurde samt Rückenmark ab Höhe der Kauda und den verbleibenden Opticii am Chiasma opticum entnommen und ebenfalls in 4% Formalin fixiert. Zur histopathologischen Untersuchung von Transversalschnitten der Sehnerven und dem Chiasma opticum wurden diese separat am Gehirn entnommen.

Die Bulben für die Anfertigung von Querschnitten, sowie alle anderen Präparate zur histologischen oder immunhistologischen Untersuchung wurden in einem Tissue Tek Einbettautomaten nach Standardprogramm paraffiniert und anschließend zu Paraffinblöcken ausgegossen.

### 3.7 Evaluierung der Zelldichte in der retinalen Ganglienzellschicht

Zur Evaluierung der Zelldichte in der retinalen Ganglienzellschicht wurden die Flatmounts nach Allcutt et al. mit Kresylviolett (Nissl) gefärbt (Allcutt, Berry et al. 1984). Die Kresylviolett-färbung ist eine Standardfärbung für neuronale Gewebe und basiert auf der Anfärbung basophiler Strukturen wie RNA und DNA durch Oxazin-Farbstoffe. Die Zellkerne werden dabei blau und die Nissl-Schollen (raues endoplasmatische Retikulum) violett gefärbt, der Hintergrund bleibt ungefärbt bis schwach violett (Romeis and Böck 1989).

Nach Präparation der Retinae zu den kleeblattförmigen Flatmounts wurden diese zunächst in PBS gewaschen und anschließend in einer auf- und absteigenden Ethanolreihe (EtOH, je 3 min) und Xylol-Ersatzmedium (XEM, 5 min) de- und rehydriert:

70% EtOH → 80% EtOH → 100% EtOH → 100% EtOH → XEM.

Es folgte die Inkubation in saurer (pH 4), 1%iger Kresylviolettlösung für 10 min und die anschließende Differenzierung durch Entfärben in 70% EtOH (+ 2 Tropfen Eisessig) und aufsteigender Alkoholreihe für je 3 min sowie in XEM für 5 min. Danach wurden die Präparate mit Eukitt und Deckglas eingedeckt. Nach Trocknung über Nacht wurden in Anlehnung an andere Studien mit Ganglienzellzählungen acht Photographien in definierten Arealen des Flatmounts angefertigt (Li, Barnes et al. 2005; Holcombe, Lengefeld et al. 2008). Mit je einer Distanz von zwei Kamerafeldern, lagen vier Areale zentral neben der Papille und weitere vier peripher an der Ora serrata. Die kresylviolett gefärbten Zellen in der Ganglienzellschicht wurden durch ein Olympus Vanox-T Mikroskop bei 100x Vergrößerung fotografiert. Das Mikroskop war mit einer Hitachi CCD Kamera und einem Computer samt DISKUS Software für histologische Untersuchungen ausgestattet. Nach Verblindung und Konvertierung der Bilder in jpg- Formate wurden die Kresylviolett<sup>+</sup> Zellen manuell ausgezählt und dabei in drei Zelltypen unterschieden. Die computergestützte Auszählung geschah ebenfalls verblindet, wobei das Cell counter Plug-in in der Software ImageJ verwendet wurde. Die Unterscheidung der drei Zelltypen erfolgte anhand gut beschriebener morphologischer Kriterien wie Zellgröße, Form, Lokation, sowie Struktur und Größe der Nissl-Substanz (Stone 1965; Sievers, Hausmann et al. 1987; Gellrich and Gellrich 1996). Endothelzellen wurden von weiteren Analysen gänzlich ausgeschlossen. Zellen mit unregelmäßiger Umrandung, einem prominenten Nukleolus und einem minimalen Kerndurchmesser von mehr als 8 µm wurden als Neurone klassifiziert. Um die Morphologie und Distribution von Gliazellkernen innerhalb der Retina für die Zellunterscheidung zu studieren wurden zusätzlich einige Flatmounts gesunder Tiere immunhistochemisch mit anti-

Iba1 Antikörpern spezifisch für Mikroglia und anti-GFAP Antikörpern spezifisch für Astroglia und Müller-Zellen gefärbt (Abbildung 3). Gliazellkerne sind rund bis sternförmig, ohne sichtbaren Nukleolus und meist dunkelblau gefärbt, wobei ihre Kerngröße stets unter 8  $\mu\text{m}$  liegt. Manche sind halbmondförmig oder flach und liegen meist neben Neuronen.

Die Anzahl an Zellen wurde anhand der Bildgröße auf die allgemein verwendete Einheit Dichte pro Quadratmillimeter mit Hilfe eines festen Multiplikators berechnet. Die Schrumpfung der Flatmounts während den Hydrierungen und Differenzierungen sind eine bekannte Beobachtung, wobei allgemein davon ausgegangen wird, dass diese studienbezogen für alle Gruppen konstant ist (Stone 1965; Perry 1979). Eine Evaluierung der Schrumpfung wurde deshalb nicht durchgeführt. Der interspezifische Vergleich der Zelldichten wurde mit dem Tukey HSD Post Hoc Test analysiert (siehe Kapitel 3.11 Statistik).

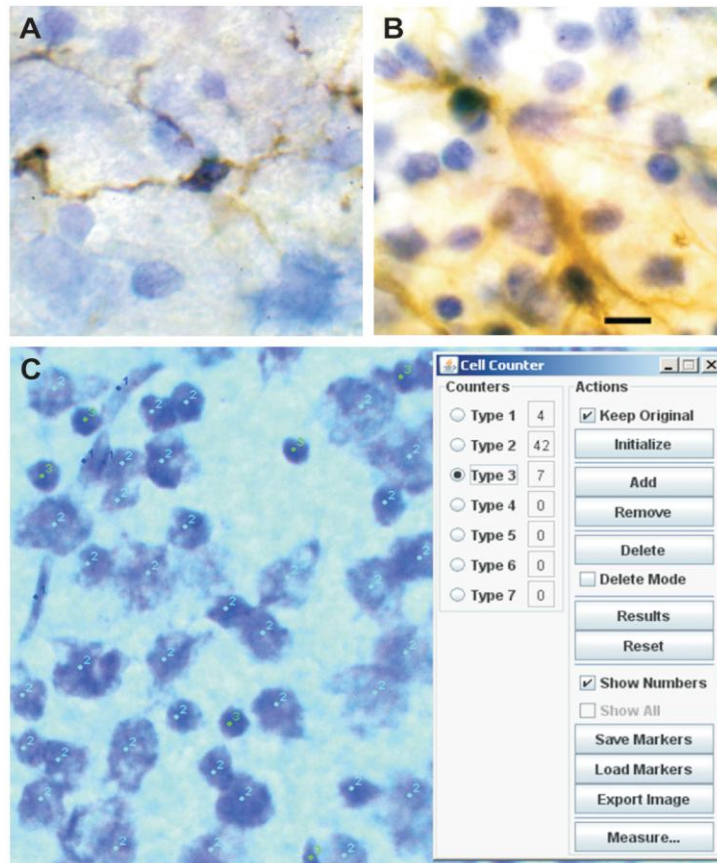


Abbildung 3: Evaluierung der retinalen Zelldichte nach morphologischem Studium von Iba1<sup>+</sup> Mikroglia (A) und GFAP<sup>+</sup> Astrozyten (B) Zellkernen im Flatmount. Zur Zellzählung nach Kresylviolett-färbung wurde der Cell counter in Image J verwendet (C), wodurch die Zellkerne der Endothelzellen (Typ 1), der Neurone (Typ 2) und der Gliazellen (Typ 3) direkt markiert wurden.

### 3.8 Histologische Neuropathologie

Nach klassischer neuropathologischer Färbemethoden wie Hämatoxylin&Eosin (H&E) Färbungen oder verschiedenen Varianten der Luxol Fast Blue (LFB) Färbung wurden Bulbenquerschnitte, transversale Opticusschnitte, sowie horizontale Gehirnschnitte angefertigt. Abhängig vom Gewebe wurden die Präparate in verschiedenen Schnittdicken von 1-10 µm auf dem Rotationsmikrotom geschnitten und auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung der Schnitte bei 37°C und 60°C wurde 3x10 min in Xylol entparaffiniert und in absteigenden Ethanolreihe je 5 min rehydriert:

3x Xylol → 100% EtOH → 100% EtOH → 96% EtOH → 96% EtOH → 70% EtOH → A. dest.

Die Präparation der Gewebsschnitte für immunhistochemische (IHC) und immunfluoreszenzmikroskopische (IF) Färbungen wurde standardisiert und nach gleichem Procedere wie oben durchgeführt. Die weiteren Schritte sind in den spezifischen Färbemethoden im Anschluss beschrieben. Alle Präparate, nach histologischer und immunhistochemischer Färbung, wurden durch das Olympus Vanox-T Mikroskop begutachtet und mit der DISKUS Software analysiert und dokumentiert. Ausgesuchte Präparate wurden zusätzlich mit der digitalen Spiegelreflexkamera fotografiert.

### 3.8.1 Hämatoxylin& Eosin Färbung

Zur deskriptiven morphologischen Untersuchung der Gewebe auf pathologische Aberrationen wurde die H&E Färbung nach Standardprotokoll für paraffiniertes Gewebe von Mayer mit Mayer's Hämatoxylin und gelblichem Eosin durchgeführt (Romeis and Böck 1989). Die Färbelösungen wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt.

### 3.8.2 Luxol Fast Blue Färbung

Mit der nach Kluver und Barrera modifizierten Luxol Fast Blue (Solvent Blue 38) Färbung lassen sich Myelinscheiden in nahezu jedem neurologischem Gewebe darstellen. Die LFB Färbung wurde mit der Nissl (LFB/N) Färbung (Kluver and Barrera 1953), sowie mit der Perjud-Schiff Färbung (LFB/PAS) wie beschrieben kombiniert (Schmidt, Gerber et al. 2010). Die Details zur Durchführung und Ansätze der H&E und LFB Färbungen sind im Anhang 1 beigefügt.

Zur Evaluierung der Schädigungen des N. opticus im Bezug auf Demyelinisierung und pathologische Aberration wurde ein für solche Untersuchungen gängiges 0-3 Punkte System angewendet. Der Schweregrad wurde von 0 für keine Demyelinisierung, über 1 mit einigen, wenigen lokalen Herden, bis 2 für mehrere Herde und 3 für größere Areale mit Demyelinisierung angegeben (Gran, Zhang et al. 2002; Shindler, Ventura et al. 2008). Weiter spielten die Observationen von Ödemen, Größe des Axoplasmas und die allgemeine Organisation von Neurofilamenten der Axone, wie sie ebenfalls bei ähnlichen Studien beobachtet wurden, eine Rolle bei der Eingruppierung (Saggu, Chotaliya et al. 2008; Joos, Li et al. 2010). Der Grad an Demyelinisierung wurde für jeden Schnitt in der LFB und der LFB/N durch zwei unabhängige Untersucher bestimmt. Für die statistischen Analysen wurde der Mittelwert aus beiden Färbungen und beider Untersucher verwendet.

### 3.9 Immunhistologische Neuropathologie

Die immunhistologischen Färbungen der Gewebsschnitte wurden nach direkter und indirekter Methode durchgeführt. Nach Entparaffinierung erfolgten die Antigendemaskierung, sowie der spezifische Block in 0,1%iger Triton X-100/PBS Lösung. Je nach verwendeten Antikörpern und abhängig von den unterschiedlichen Schnittdicken (1-20  $\mu\text{m}$ ) wurde die Antigendemaskierung im Dampfgerar bei 95°C mit verschiedenen Pufferlösungen bewerkstelligt. Zum Einsatz kamen folgende Blocklösungen und Puffer:

0,1 M PBS: Zum Spülen und Waschen der Schnitte nach den Antigendemaskierung und Blocken sowie vor dem Eindecken. 10,9 g di-Natriumhydrogenphosphat + 3,2 g Natriumdihydrogenphosphat + 90 g Natriumchlorid lösen in 1 l Aqua dest. und auf pH 7,4 einstellen. Den Puffer vor gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

0,1%ige Triton X-100/PBS Lösung: 500 ml PBS + 0,5 ml Triton X-100

Block Lösung: 200 ml 0,1% Triton X-100/PBS Lösung + 1 g BSA + 0,5 ml Ziegen Serum (Normal Goat Serum)

Tris-EDTA Puffer: 1,21 g Tris-Base und 0,37 g EDTA in 1000 ml Aqua dest. gelöst ergibt eine Lösung mit pH 9. Anschließend 0,5 ml Tween 20 zugeben und gut schütteln.

TRS-Puffer: Dabei handelt es sich um den DAKO Citrat-Puffer (pH 6) als Konzentrat. Nach Anleitung von DAKO mit Aqua dest. 1:10 verdünnen.

Waschpuffer: Waschpufferkonzentrat von DAKO zum Spülen und Waschen der Schnitte nach den Antikörperinkubationen. Nach Anleitung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

Alle Puffer, Inkubationszeiten, sowie die verwendeten primär und sekundär Antikörper und deren Verdünnungen sind anschließend in Tabelle 1 aufgeführt. Für die Quantifizierungen der IHC wurden Meerrettichperoxidase- (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper verwendet und vor Antigendemaskierung die endogene Peroxidase durch 10 minütige Inkubation in 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung (30%ige  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung, 1:100 mit PBS verdünnt) geblockt. Die Immunreaktion wurde mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Reaktion sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin oder in 1:2 verdünntem Hämalaun, sowie die Differenzierung und Dehydrierung. Die Präparate wurden xylovermittelt mit Eukitt eingedeckt. Die Sekundärantikörper für die IF waren mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Tetramethylrhodamine-Isothiocyanate (TRITC) oder Cyanin 3 (Cy 3) gekoppelt. Dies ermöglichte zusätzlich die Kombination einzelner Methoden zur Doppelfärbung. Sämtliche



Präparate der IF wurden zur Kernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) versetztem Vectashild eingedeckt und unmittelbar im Anschluss mit dem Nikon Eclipse TE 2000 Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Düsseldorf) untersucht. Das TE 2000 verfügte über eine gekühlte schwarz-weiß CCD Kamera und Lucia G/F Software. Für die konfokale Mikroskopie wurde das Leica TCS SP5 mit der dazugehörigen Software LAS AF verwendet.

### 3.9.1 Immunhistologischer Nachweis von Antikörperablagerungen in der Retina und im N. opticus

Das Vorhandensein von IgG und IgM Autoantikörpern in der Retina und im N. opticus sollte via direkter Methode nachgewiesen werden. Hierzu erfolgte die Adaption des bereits beschriebenen Verfahrens zur Detektion von Autoantikörpern in Gehirnschnitten (Chan, Palestine et al. 1985; Ross, Zhou et al. 2008) an serielle Bulbenquerschnitte (1 und 3  $\mu\text{m}$ ) und Opticuschlängsschnitte (5  $\mu\text{m}$ ). Zur Detektion wurden entweder ein goat anti-rat IgG (H+L) Antikörper oder ein goat anti-rat IgM ( $\gamma$ -Kette) Antikörper, beide HRP-gekoppelt, verwendet. Die Ablagerungen wurden anhand der Länge der Retinae, sowie die Anzahl der Ablagerungen pro Querschnitt quantifiziert (Ablagerungen/mm). Zur Vereinheitlichung der Quantifizierung mussten alle verwendeten Bulbenquerschnitte durch den Sehnervenkopf geschnitten sein. Zur Untermauerung des Auftretens von Autoantikörpern wurde die Detektion mehrfach unabhängig mittels IF und goat anti-rat Antikörpern für Gesamt-IgG (Fc Fragment) sowie deren Subtypen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>3</sub> wiederholt. Weiter wurde die Autoantikörperfärbung mit den nachfolgenden indirekten Methoden zum Nachweis von aktiven Caspasen und Mikroglia als Doppelfärbung kombiniert.

### 3.9.2 Indirekte Immunhistochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung glaukopathophysiologischer Aspekte

Zum Studium der pathologischen Veränderungen im N. opticus und der Retina, welche letztendlich zur Apoptose der retinalen Ganglienzellen führen, diese entweder einleiten oder prozessieren, wurden verschiedene Caspasen und die Mikroglia untersucht. Alle verwendeten primären Antikörper sind nachfolgend aufgelistet:

Caspase 3: Effektorcaspase, modelliert durch Caspase 8 und 9. Das Auftreten von Caspase 3 oder der gespaltenen Form bedeutet irreversible Einleitung der Apoptose. Der verwendete Antikörper rabbit anti-Caspase 3 detektiert beide Formen.

Caspase 8: Initialcaspase 8, spaltet inaktive Pro-Caspasen (maßgeblich jedoch die Vorläuferform von Caspase 3) zu Effektorcaspasen. Caspase 8 selbst wird durch Fas

Ligand oder TNF- $\alpha$  vermittelten Zelltod aktiviert. Verwendeter Antikörper: rabbit anti-Caspase 8.

Caspase 9: Die Initialcaspase 9 ist an den mitochondrial vermittelten Apoptoseweg nach Cytochrom C Ausschüttung gekoppelt und stellt bereits bei Auftreten den „point of no return“ innerhalb der Apoptosekaskade dar. Sie spaltet wiederum die Pro-Caspase 3 und 7 zu Effektorcaspasen. Zur Detektion wurde ein rabbit anti-Caspase 9 Antikörper verwendet. Aufgrund der bekannten Problematik bei der Caspasedetektionen, wie schwache Intensitäten und kurzlebige Fluoreszenzen, erfolgte die Evaluierung von Caspase 3, 8 und 9 direkt nach IF am Mikroskop. Dabei wurde der Grad an retinaler Caspaseaktivität im gesamten Bulbenquerschnitt durch zwei unabhängige Untersucher mittels 0-3 Schema (0=keine Caspase<sup>+</sup> Intensität, 1=Schwache Caspase<sup>+</sup> Intensität (Aktivität) in einzelnen Zellen der retinalen Ganglienzellschicht, 2=deutliche Caspase<sup>+</sup> Intensität in mehreren Zellen der retinalen Ganglienzellschicht und 3=starke Caspase<sup>+</sup> Intensität in mehreren Zellen der retinalen Ganglienzellschicht) begutachtet.

Iba1: Das ionisierte Kalzium-bindende Adaptermolekül 1 ist spezifisch nur in Makrophagen und Mikroglia exprimiert. Es interagiert mit der Zellmembran und lässt nach Färbung morphologische Veränderungen der Zellen unterscheiden. Zur Detektion diente ein rabbit anti-Iba1 Antikörper. Die Expression von Iba1 und die Zellmorphologie korreliert mit dem Zellstatus. Simultan zu den Autoantikörperdetektionen wurde die retinale Länge ermittelt. Anschließend erfolgten die Quantifizierung der Mikroglia nach Visualisierung mit DAB und Hämalaun Gegenfärbung. Dabei wurde die Menge in jeder retinalen Schicht, sowie die Unterscheidung in den aktivierten oder ruhenden, ramifizierten Status anhand morphologischer Kriterien (Ito, Imai et al. 1998; Soulet and Rivest 2008; Ebner, Casson et al. 2010) erhoben. Innerhalb der Opticuslängsschnitte wurde eine „region of interests“ (ROI) mit Hilfe von Adobe Photoshop in der Größe von 244 x 244  $\mu\text{m}$  ausgeschnitten und darin die mit Immunfluoreszenz markierte Mikroglia analysiert.

Tabelle 1: Übersicht zur Immunhistochemie. ÜN= Inkubation über Nacht, RT= Raumtemperatur

Epitop	Antigendemas- kierung	Block	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Caspase 3	Tris- EDTA 20'	Blocklösung 45'	rabbit-anti Caspase 3, 1:50 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, 2 x ÜN bei RT	goat anti-rabbit IgG Cy 3, 1:300 in PBS, 5 h bei RT
Caspase 8	Tris- EDTA 20'	Blocklösung 45'	rabbit-anti Caspase 8, 1:200 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, 2 x ÜN bei RT	goat anti-rabbit IgG Cy 3, 1:300 in PBS, 5 h bei RT
Caspase 9	Tris- EDTA 20'	Blocklösung 45'	rabbit-anti Caspase 9, 1:200 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, 2 x ÜN bei RT	goat anti-rabbit IgG Cy 3, 1:300 in PBS, 5 h bei RT
Iba 1	TRS 30'	Blocklösung 30'	rabbit-anti Iba 1, 1:500 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, ÜN bei RT	goat anti-rabbit IgG HRP, 1:400 in PBS, 3 h bei RT goat anti-rabbit IgG Cy 3, 1:400 in PBS, 3 h bei RT
IgG	TRS 45'	Blocklösung 45'	goat anti-rat IgG (H+L) HRP, 1:400 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, 6 h bei RT	
	TRS 45'	Blocklösung 45'	goat anti-rat IgG (H+L) FITC, 1:400 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, ÜN bei RT	
	TRS 45'	Blocklösung 45'	goat anti-rat IgG (H+L) TRITC, 1:400 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, ÜN bei RT	
IgG <sub>1</sub>	TRS 45'	Blocklösung 45'	goat anti-rat IgG <sub>1</sub> (spezifische I chain) FITC, 1:400 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, ÜN bei RT	
IgG <sub>2a</sub>	TRS 45'	Blocklösung 45'	goat anti-rat IgG <sub>2a</sub> (spezifische I chain) FITC, 1:400 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, ÜN bei RT	
IgG <sub>2b</sub>	TRS 45'	Blocklösung 45'	goat anti-rat IgG <sub>2b</sub> (spezifische I chain) FITC, 1:400 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, ÜN bei RT	
IgG <sub>3</sub>	TRS 45'	Blocklösung 45'	goat anti-rat IgG <sub>3</sub> (spezifische I chain) FITC, 1:400 in 0,1%ige Triton X-100/PBS, ÜN bei RT	
IgM	TRS 45'	Blocklösung 30'	goat anti-rat IgM (γ-Kette) HRP, 1:500 in PBS, 6 h bei RT	
	TRS 45'	Blocklösung 30'	goat anti-rat IgM (γ-Kette) FITC, 1:500 in PBS, 6 h bei RT	

### 3.10 Untersuchung des humoralen IgG Antikörperrepertoires gegen okuläres Gewebe

Die Untersuchung der humoralen IgG Antikörperantwort beruht auf den Grundlagen der klassischen Tissue Array Methodik. Dabei handelt es sich um eine immunhistochemische Methode, mit der die humoralen Antikörperreaktionen gegen verschiedenste Gewebe untersucht werden können. Das Prinzip basiert darauf, dass Gewebeproben aus nativen oder kranken Geweben ausgestanzt werden und in einen Paraffinblock überführt werden. Der Block wird anschließend geschnitten und nach herkömmlicher IHC Methodik behandelt. Serum von Patienten oder von Versuchstieren dient als Quelle der primären Antikörper und wird direkt auf dem Objektträger inkubiert. Die Immunreaktionen können anschließend mit IgG spezifischen Sekundärantikörpern visualisiert und analysiert werden (Battifora 1986; Battifora and Mehta 1990). Patel et al. sowie Chan et al. veränderten diesen Ansatz und analysierten damit Immunreaktionen von Serumantikörpern gegen okuläres Gewebe (Chan, Palestine et al. 1985; Patel, Ohbayashi et

al. 2005). Nach Kombination beider Methoden und deren Optimierung konnte im Rahmen dieser Arbeit ein reproduzierbarer und sensitiver Test entwickelt werden, mit dem die humorale Antikörperreaktion der Versuchstiere gegen gesundes Retina- und Sehnervgewebe analysiert werden konnte. Die Gewebe stammten von gesunden Lewis Ratten, woraus 1  $\mu\text{m}$  dicke Bulbenquerschnitte (**Retina Arrays**) und Sehnervenquerschnitte (**Opticus Arrays**) hergestellt wurden. Das Procedere mit Herstellung der Paraffinblöcken, Schneiden, Entparaffinierung, Blocken war identisch zu den in Kapitel 3.9 beschriebenen Methoden. Das Serum zur Inkubation als Erstantikörper wurde entsprechend dem Studiendesign (siehe 3.4) vor und nach der Immunisierung gewonnen. Es wurden die humoralen Immunreaktionen der Kontrolle, sowie der ONA, MBP und Keratin immunisierten Gruppen der 28 Tage andauernden Studie, sowie das der Kontrolle, der RGA und der MBP Gruppe 42 Tage n. I. analysiert und jeweils longitudinal verglichen. Die Inkubation des 1:200 in PBS verdünnten Serums dauerte bei Bulbenquerschnitte 4 h und bei Sehnervenquerschnitten 2½ h. Anschließend wurden die Präparate intensiv 3x10 min in PBS gewaschen. Die Detektion der gebundenen humoralen IgG Antikörpern erfolgte mit den gleichen Antikörpern, welche auch für die immunhistochemische Detektion der Autoantikörper verwendet wurden (Kapitel 3.9.1). Die Inkubationszeiten betragen 2 h bzw. 1¼ h. Nach Visualisierung mit DAB wurde mit Hämalaun gegengefärbt und anschließend xyloolvermittelt eingedeckt. Die Analyse der Intensitäten wurde entsprechend an das 0-3 Schema von Tezel et al. adaptiert und von drei unabhängigen Untersuchern durchgeführt.

### 3.11 Statistik

Alle erhobenen Daten wurden zunächst in dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel erfasst. Bei den verblindeten Analysen durch unabhängige Untersucher wurden die gemittelten Werte unter Voraussetzung, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzelwerten der Untersucher gab, zur Statistik verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programms Statistica. P-Werte von  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Werte sind als gruppenspezifische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben.

#### 3.11.1 T-Test und Tukey's HSD Post Hoc Test

Zur Untersuchung zweier Gruppen im direkten Vergleich wurde der T-Test verwendet. Bei diesem Hypothesentest werden Erwartungswerte der Anzahl an Messdaten mit unbekannter

Standardabweichung geprüft. Die Messdaten, z.B. Anzahl an Mikroglia oder retinaler Ganglienzellen müssen normalverteilt sein.

Beim inter- und intraspezifischen Vergleich mehrerer Gruppen wurde der Tukey HSD Post Hoc Test angewendet. Post Hoc Tests werden nach der Varianzanalyse von Messdaten durchgeführt, wenn die Null-Hypothese verworfen wurde. Dabei wird anhand des Mittelwertes untersucht, ob sich eine Gruppe signifikant von einer anderen unterscheidet (Backhaus, Erichson et al. 2000; Bley Müller 2000).

### 3.12 Material- und Geräteliste

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Allgemein</b>	
Bechergläser, verschiedene Größen	Schott, Mainz
Dampfgarer	Severin Elektrogeräte, Sudern
Deckgläser 24 mm x 50 mm	Diagonal, Münster
Einmalpasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalpipetten	Fisher, Frankfurt
Einmaluntersuchungshandschuhe	MaiMed, Neuenkirchen
Elektronischer Timer	Hager, Saarbrücken
Eppendorf Tube-Ständer	Fisher, Frankfurt
Falcon Tubes 15 ml und 50 ml	Fisher, Frankfurt
Filter Selectra	Carl Schleicher & Schuell, Einbeck
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr premium, Biberach
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Hanau
Inkubator	Horo, Ostfildern
Kaltlichtquelle macrospot 1500	Kaiser Fototechnik, Buchen
Kamera Cybershot 7.2 Megapixel	Sony, Berlin
Kleenex	WePa, Amsberg
Kühlschrank	Liebherr premium, Biberach
Molinea Plus 60 cm x 40 cm Saugunterlagen	Hartmann, Heidenheim
Objektträger 76 mm x 26 mm	Diagonal, Münster
OP-Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Pinzetten	neoLab, Heidelberg
Pipetten, diverse	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, diverse	Eppendorf, Hamburg
Plastikkäfig 1 l	Ferplast, Nürnberg
Präparierbestecke	Geuder, Heidelberg
Safe Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Schnappdeckelgläser 40 ml	VWR, West Chester, PA, USA
Schutzbrille	Uvex, Fürth
Sharpsafe Sammelbehälter	Frontier Medical Products, Köln
Skalpelle	Braun, Melsungen
Vortexer Reax top	Heidolph, Kehlheim
Waage 2000 g	Soehnle, Nassau
Zentrifuge Biofuge primo R (kühlbar)	Heraeus, Hanau
<b>Blutentnahme, Immunisierung, Funduskopie, Präparation</b>	
Dreifußstativ	VWR, West Chester, PA, USA
Hamilton Microliter-Spritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Heizkissen	Beurer, Ulm

Einmalspritzen Injekt-F 1 ml	Braun, Melsungen
Einmalspritze Luer-Lok Tip 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 3 20 G 0,9 mm x 40 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 3 21 G 0,8 mm x 40 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Sterican 27 G 0,4 mm x 40 mm	Braun, Melsungen
Plastipak Luer 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Rat restraining tube	VWR, West Chester, PA, USA
Rotlichtlampe infraphil 100 W	Philips, Drachten, Holland

#### Messung des intraokulären Druckes

Tonopen XL	Medtronic, Minneapolis, MN, USA
Tonopen Spitzenhüllen	Medtronic, Minneapolis, MN, USA

#### Kohlendioxid-Tötung

Druckminderer	Rhöna, Fulda
Exsikkator Kartell	Binasco, Italien
Kohlendioxid	Messer Griesheim, Griesheim

#### Histologie

Eukitt	Merck, Darmstadt
Färbeküvetten	VWR, West Chester, PA, USA
Färbegestell, Glas	VWR, West Chester, PA, USA
Adhäsions-Objektträger Superfrost Plus	Menzel Gläser, Braunschweig
Rotationsmikrotom Biocut 2030	Reichert-Jung, Depthey, NY, USA
Tissue Tek Einbettautomat	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

#### Mikroskopie und Fotografie

Kamera Hitachi HV-C20 A	Hitachi, Tokyo, Japan
Kamera Canon EOS 400D	Canon, Krefeld
Kamera Cybershot 7.2 Megapixel	Sony, Berlin
Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop	Leica, Mannheim
Mikroskop Vanox-T	Olympus, Hamburg
Nikon Eclipse TE 2000	
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf

#### Computer und Software

Office 2007	Microsoft, USA
Statistica Version 8.0	Statsoft, Hamburg
Diskus Mikroskopische Dokumentation 4.30.5	Technisches Büro Hilgers, Königswinter
Farblaserdrucker Tektronix Phaser 750N	Xerox, Neuss
LAS AF	Leica, Mannheim
Lucia G/F Software	Nikon, Düsseldorf
Adobe Photoshop	Adobe Systems Incorporated; San Jose, CA, USA

ImageJ  
Corel Draw X4

NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>  
Corel Corporation, Ottawa, Canada

### 3.13 Antikörper, Chemikalien und Medikamente

Bezeichnung	Hersteller
<b>Allgemein</b>	
Alkoholisches Hautantiseptikum	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Flüssiger Stickstoff	Messer Griesheim, Griesheim
Formalin	VWR, West Chester, PA, USA
Paraformaldehyd	VWR, West Chester, PA, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Cambrex, Verviers, Belgien
<b>Antigene und Immunisierung</b>	
Inkomplettes Freund's Adjuvans	Sigma, Steinheim
Pertussis Toxin	Calbiochem, Darmstadt
Myelin basisches Protein	Sigma, Steinheim
Keratin	MP Biomedicals, Solon, OH, USA
Natriumchloridlösung 0,9%	Braun, Melsungen
<b>Antikörper</b>	
goat anti-rat IgG (H+L) HRP	Pierce Immunopure, Rockford, IL, USA
goat anti-rat IgM ( $\gamma$ -Kette) HRP	Pierce Immunopure, Rockford, IL, USA
goat anti-rat IgG (Fc Fragment) TRITC	GenWay Biotech, San Diego, CA, USA
goat anti-rat IgG 1 FITC	GenWay Biotech, San Diego, CA, USA
goat anti-rat IgG 2a FITC	GenWay Biotech, San Diego, CA, USA
goat anti-rat IgG 2b FITC	GenWay Biotech, San Diego, CA, USA
goat anti-rat IgG 3 FITC	GenWay Biotech, San Diego, CA, USA
goat anti-rabbit IgG Cy 3	Linaris, Wertheim-Bettingen
rabbit anti-Caspase 3	Gene Tex, Irvine, CA, USA
rabbit anti-Caspase 8	Bioworld Technologies, St. Louis Park, MN, USA
rabbit anti-Caspase 9	Bioworld Technologies, St. Louis Park, MN, USA
rabbit anti-Iba1	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan
<b>Färbung</b>	
Acetat	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, >99,8%, vergällt	Roth, Karlsruhe
Eosin gelblich	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Kresylviolett	Merck, Darmstadt



Mayer´s Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Schiffsches Reagenz	Merck, Darmstadt
Solvent Blue 38	Merck, Darmstadt
Wasser, bidest	DB, Heidelberg
Xylol-Ersatzmedium XEM	Vogel Medizintechnik, Gießen
Xylol	Merck, Darmstadt

#### Immunhistochemie

BSA	Sigma, Steinheim
Citrat Puffer	DAKO, Hamburg
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Diaminobenzidin	DCS Systems, Hamburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Normal Goat Serum	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim
Vectashild	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Waschpufferkonzentrat	DAKO, Hamburg
Wasserstoffperoxidlösung	Sigma, Steinheim

#### Medikamente

Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen
Floxal	Bausch & Lomb, New York, NY, USA
Gentamicin-POS Augensalbe	Ursapharm, Saarbrücken
Ketamin-ratiopharm 10 mg/ml (Ketamin)	Ratiopharm, Ulm
Methocel 2% (Hypromellose)	Omni Vision, Puchheim
Mydriatikum Stulln (Tropicamid)	Pharma Stulln, Stulln
Novesine 0,4% (Oxybuprocain)	Omni Vision, Puchheim
Rompun 2% (Xylazin)	Bayer, Leverkusen

## 4 Ergebnisse

Im Ergebnisteil wurden die beiden Immunisierungstiermodell nicht gesondert behandelt.

### 4.1 In Vivo Parameter

Die Versuchstiere vertrugen die Immunisierung im Allgemeinen sehr gut. Nach den Injektionen waren keine Irritationen rund um die Injektionsstelle zu begutachten. Besonders wurde auf Nachblutungen und Knotenbildungen kontrolliert. Auch je eine Stunde nach der Immunisierung waren die Tiere agil und zeigten keinerlei motorische oder sensorische Defizite.

#### 4.1.1 Enzephalitis-Score

Gemäß den Beobachtungen bei Studien zur EAE zeigten einige der Versuchstiere, welche mit MBP immunisiert wurden, zwischen dem neunten und 14. Tag einen positiven Enzephalitis-Score. Ein MBP immunisiertes Tier verstarb über Nacht am 12. Tag n. I. mit einem Enzephalitis-Score von 2. Tiere der Kontrollgruppe, der RGA Gruppe sowie der Keratin Gruppe zeigten zu keinem Zeitpunkt neurologische Auffälligkeiten oder einen Enzephalitis-Score. Lediglich bei zwei Tieren der ONA Gruppe wurden neurologische Defizite (0-1) der hinteren Extremitäten einmal am 7. und am 12. Tag nach Immunisierung festgestellt. Die Tiere waren am darauf folgenden Tag vollständig genesen.

#### 4.1.2 Intraokulärer Druck

Nach statistischer Untersuchung des intraokulären Druckes mittels Tukey's Post Hoc Test fanden sich keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen und zwischen Beginn und Ende der jeweiligen Studien mit den Laufzeiten 14, 28 und 42 Tage. Bei der 14 Tage dauernden Studie lagen die Mittelwerte zu Studienbeginn bei 12,49 mmHg und zu Studienende bei 12,44 mmHg. Die Veränderungen zwischen den Gruppen, sowie zwischen den Zeitpunkten waren mit einem p-Wert von  $p \geq 0,79$  (siehe Tabelle 2 A, Anhang 2 A) statistisch nicht signifikant.

Bei der Studie mit einer Laufzeit von 28 Tagen fanden sich hinsichtlich des intraokulären Druckes ebenfalls keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen, welche immunisiert mit MBP, ONA und dem nicht neuronal assoziierten Keratin immunisiert wurden, sowie zwischen den verschiedenen Zeitpunkten (Tabelle 2 B, Anhang 2 B). Hier lag der Mittelwert während der gesamten Studie bei 12,61 mmHg und ist vergleichbar mit den Messwerten der 14 Tage Studie. Weder zwischen den Zeitpunkten Baseline, 14 Tage n.I. und

28 Tage n.l. noch zwischen den verschiedenen Gruppen fanden sich signifikante Unterschiede ( $p \geq 0,52$ ).

Auch nach einer Laufzeit von 42 Tagen und einer Booster-Immunsierung nach 28 Tagen konnten keine signifikanten Veränderungen des intraokulären Druckes zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten festgestellt werden. Der Mittelwert über die gesamte Laufzeit lag bei 14,27 mmHg. Auch hier wiesen weder die Veränderungen zwischen den Messzeitpunkten noch die Unterschiede zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von  $p \geq 0,4$  eine statistische Signifikanz auf (Tabelle 2 C, Anhang 2 C).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Immunsierung mit den Antigenen MBP, ONA oder RGA, sowie Keratin nicht zu einer Erhöhung des Augeninnendruckes führt.

Tabelle 2 A-C: Mittelwerte, Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE) des intraokulären Druckes bei den Studien mit 14, 28 und 42 Tage Laufzeit. Die Tabellen stammen aus der Analyse mit Statistica.

Tabelle 2 A: 14 Tage Laufzeit

Gruppe Zeitpunkt	IOP (mmHg) Mittelwert	N	IOP SD	IOP SE
CO	12,42	20	0,57	0,13
Baseline	12,59	10	0,63	0,20
14 Tage n. l.	12,24	10	0,47	0,15
MBP	12,57	20	0,66	0,15
Baseline	12,50	10	0,73	0,23
14 Tage n. l.	12,63	10	0,62	0,20
ONA	12,42	20	0,77	0,17
Baseline	12,38	10	0,61	0,19
14 Tage n. l.	12,46	10	0,93	0,29
Alle Gruppen	12,47	60	0,66	0,09

Tabelle 2 B: 28 Tage Laufzeit

Gruppe Zeitpunkt	IOP Mittelwert	N	IOP SD	IOP SE
CO	12,60	30	0,75	0,14
Baseline	12,84	10	0,89	0,28
14 Tage n. l.	12,57	10	0,82	0,26
28 Tage n. l.	12,38	10	0,50	0,16
MBP	12,69	26	0,86	0,17
Baseline	13,24	10	0,84	0,26
14 Tage n. l.	12,49	8	0,55	0,19
28 Tage n. l.	12,20	8	0,83	0,29
ONA	12,45	30	0,70	0,13
Baseline	12,91	10	0,72	0,23
14 Tage n. l.	12,17	10	0,70	0,22
28 Tage n. l.	12,27	10	0,44	0,14
KER	12,70	30	0,75	0,14
Baseline	12,90	10	0,70	0,22
14 Tage n. l.	12,69	10	0,87	0,28
4 Wochen	12,51	10	0,69	0,22
Alle Gruppen	12,61	116	0,76	0,76

Tabelle 2 C: 42 Tage Laufzeit

Gruppe Zeitpunkt	IOP(mmHg) Mittelwert	N	IOP SD	IOP SE
CO	14,16	78	1,91	0,22
Baseline	14,03	20	1,74	0,39
14 Tage n. l.	14,66	20	1,60	0,36
28 Tage n. l.	13,87	20	1,78	0,40
42 Tage n. l.	14,08	18	2,49	0,59
MBP	14,09	78	1,90	0,21
Baseline	13,90	20	1,57	0,35
14 Tage n. l.	14,34	20	1,70	0,38
28 Tage n. l.	14,08	20	2,03	0,45
42 Tage n. l.	14,01	18	2,37	0,56
RGA	14,57	80	2,04	0,23
Baseline	14,09	20	1,94	0,43
14 Tage n. l.	14,91	20	1,94	0,43
28 Tage n. l.	15,35	20	1,74	0,39
42 Tage n. l.	13,92	20	2,31	0,52
Alle Gruppen	14,27	236	1,95	0,13

### 4.1.3 Funduskopie

Die Untersuchungen des Fundus zeigten bei keinem Versuchstier vor oder während der Studien pathologische Veränderungen. Es konnten keine Einblutungen oder Neovaskularisationen festgestellt werden. Weiter waren keine Exkavation oder sonstige glaukomatöse Beschädigungen zu eruieren. Die Funduskopien eines MBP immunisierten Tieres sind stellvertretend für alle Versuchstiere in Abbildung 4 dargestellt.

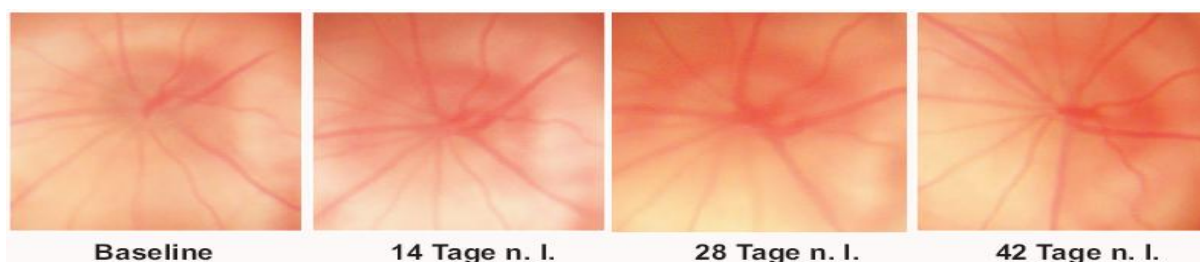


Abbildung 4: Funduskopie zur Baseline, 14 Tage n. I., 28 Tage n. I. sowie 42 Tage n. I. eines MBP immunisierten Tieres. Die Aufnahmen zeigen keinerlei pathologischer Veränderungen.

## 4.2 Dichteverteilung von Neuronen und Glia in Flatmounts

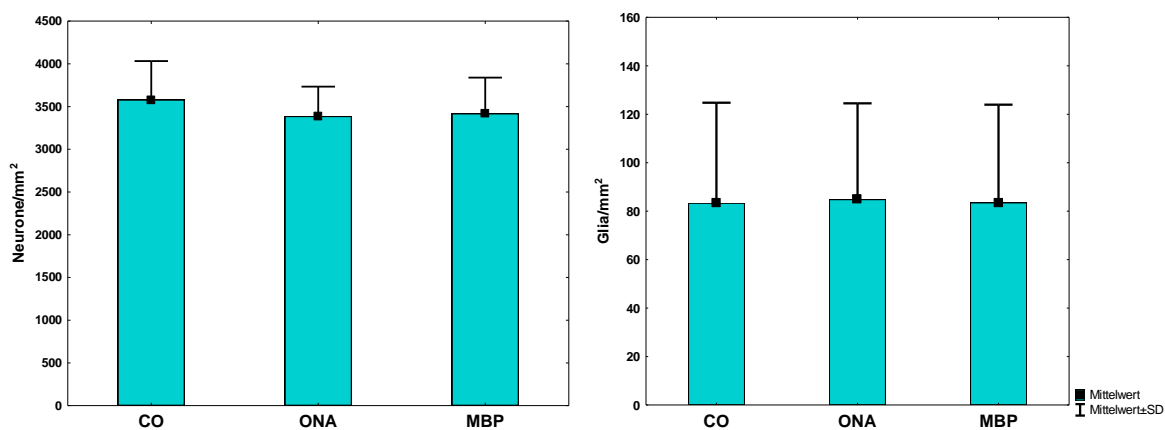
Nach Kresylviolett färbung der Flatmounts erfolgte die Zählung der drei Zelltypen, wobei die Endothelzellen von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Die Anzahl an epiretinal liegenden Glia wurde ohne Unterscheidung in Astrozyten oder Mikroglia ebenfalls quantitativ erhoben. Gliazellen, die unterhalb der retinalen Ganglienzellschicht liegen konnten aufgrund der Fokussierebene nicht detektiert werden.

Die Anzahl an Zellen wurde anhand der Bildgröße auf die allgemein verwendete Einheit Dichte pro Quadratmillimeter berechnet und statistisch für jede Studie individuell mittels Tukey's Post Hoc Test ausgewertet. Dabei wurde die Zelldichte von Neuronen und Glia in den acht Arealen als Gesamtanzahl untersucht, sowie einzeln in den je vier zentralen und den vier peripheren Arealen analysiert. Bereits 14 Tage n. I. konnte ein signifikanter Verlust von retinalen Ganglienzellen gegenüber der Kontrollgruppe mit  $3579 \pm 453$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  ( $\pm$ SD) für die Antigene MBP mit  $3419 \pm 419$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  und  $p=0,049$ , sowie für ONA mit  $3387 \pm 346$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  und  $p=0,014$  festgestellt werden. Die Anzahl der Glia veränderte sich dabei nicht. Bei der separaten Analyse der je vier zentralen und vier peripheren Areale zeigte sich, dass der neuronale Zellverlust in den zentralen Arealen der immunisierten Tiere deutlich signifikant war ( $p < 0,043$ ), in den peripheren jedoch nicht

( $p > 0,36$ ; Abbildung 5 A). Damit liegt der Ursprung während des frühen Stadiums des retinalen Ganglienzelluntergangs in den zentralen Arealen der Retina.

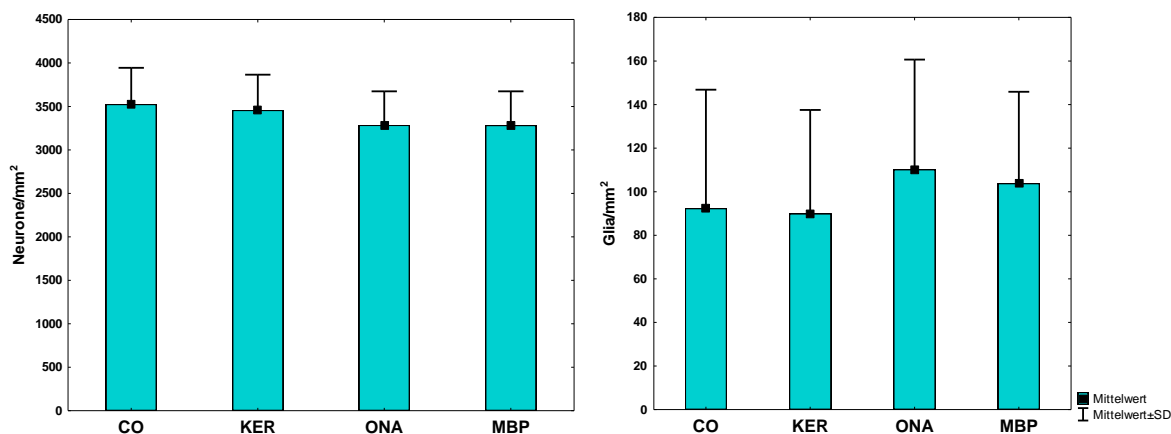
Deutlich progressiver, bei gleichen Antigen zeigte sich der gesamt betrachtet Verlust 28 Tage n. I.. Hier waren die Verluste in beiden immunisierten Gruppen (ONA mit  $3286 \pm 387$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  und MBP mit  $3285 \pm 389$  Neuronen/ $\text{mm}^2$ ) mit  $p = 0,001$  hoch signifikant. Wohin gehend die Immunisierung mit dem nicht neuronal-assoziierten Antigen Keratin mit  $3457 \pm 408$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  gegenüber der Kontrollgruppe mit  $3525 \pm 418$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  keinen signifikanten Verlust ( $p = 0,75$ ) auslösen konnte. Bei separater Betrachtung der Areale, zeigte sich hier die Verlagerung des Zelluntergangs von zentral nach peripher, sowie die leichte Zunahme der Glia. Alle Zahlen sind detailliert in Abbildung 5 B dargestellt.

Dieser Trend wiederholte sich bei der Analyse der 42 Tage andauernden Studie mit einer Booster-Immunisierung nach 28 Tagen. Gegenüber der Kontrollgruppe mit einer gesamt berechneten Zelldichte von  $3805 \pm 38$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  waren auch hier die Dichte der Neuronen bei beiden immunisierter Gruppen mit  $3571 \pm 364$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  für die RGA Gruppe und  $3544 \pm 615$  Neuronen/ $\text{mm}^2$  bei der MBP Gruppe mit  $p < 0,033$  signifikant erniedrigt. Ebenfalls war der signifikante Verlust in den peripheren Arealen zu detektieren. Im peripheren Areal konnte erstmals auch eine signifikante Zunahme von Gliazellen mit  $p = 0,03$  bei der mit MBP immunisierten Gruppe verzeichnet werden. Die Kontrolle wies in diesem Areal eine Gliadichte von  $111 \pm 46$  Glia/ $\text{mm}^2$  gegenüber  $144 \pm 44$  Glia/ $\text{mm}^2$  der MBP Gruppe auf. Zur Übersicht sind alle Daten dieser Studie in Abbildung 5 C zusammengefasst.



	Gruppe	N	Neurone/mm <sup>2</sup>	p vs CO	Glia/mm <sup>2</sup>	p vs CO
Zelldichte gesamt	CO	72	3579±453		83±41	
	ONA	70	3387±346	0,014	84±39	0,97
	MBP	72	3419±419	0,049	83±40	0,99
Zelldichte zentral	CO	36	3801±335		76±34	
	ONA	34	3473±317	0,0001	76±32	0,99
	MBP	36	3613±330	0,043	77±35	0,98
Zelldichte peripher	CO	36	3357±450		90±47	
	ONA	36	3307±356	0,86	92±44	0,97
	MBP	36	3225±413	0,36	89±44	0,99

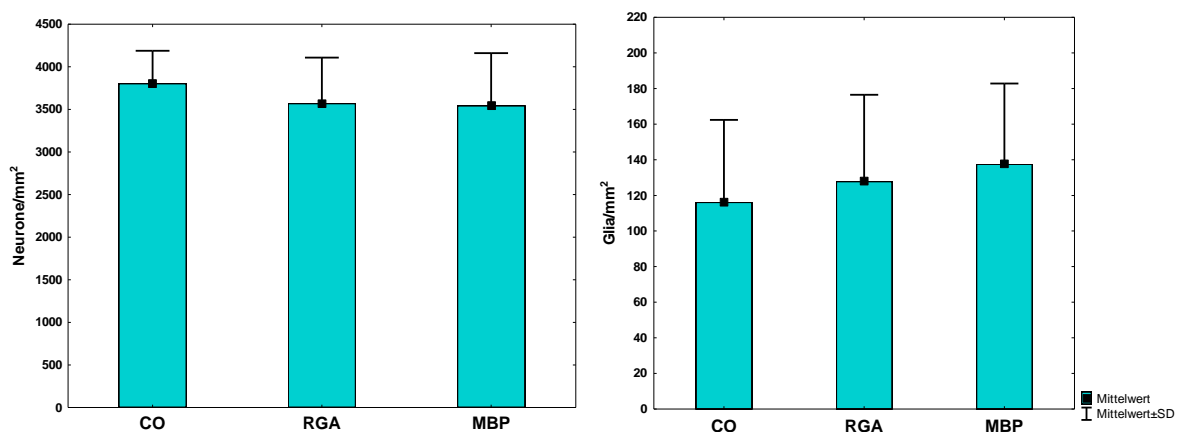
Abbildung 5 A: Analyse der Zelldichte 14 Tage nach Immunisierung mit den Antigenen ONA und MBP. Die oberen Säulendiagramme zeigen die gruppenspezifischen Gesamtdichten an Neuronen (links) und Glia (rechts) pro Quadratmillimeter. In der darunter stehenden Tabelle sind die Zahlenwerte des Säulendiagrammes, sowie die Berechnung der Signifikanzen mit Tukey's HSD Post Hoc aufgeführt. Die p-Werte stehen für die Beziehung einer immunisierten Gruppe gegen die Kontrollegruppe (p vs CO). Dabei resultiert die Anzahl an Stichproben (N) aus der Anzahl an Tieren pro Gruppe multipliziert mit der Anzahl an ausgezählten Arealen. Alle Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung(SD) angegeben. Bei der hier dargestellten Studie wurden beide Flatmounts pro Tier ausgezählt.



	Gruppe	N	Neurone/mm <sup>2</sup>	p vs CO	Glia/mm <sup>2</sup>	p vs CO
Zelldichte gesamt	CO	72	3525±418		92±54	
	KER	64	3457±408	0,75	89±47	0,99
	ONA	72	3286±387	0,001	110±50	0,12
	MBP	72	3285±389	0,001	103±42	0,49
Zelldichte zentral	CO	36	3593±461		80±47	
	KER	32	3614±390	0,99	89±34	0,99
	ONA	36	3447±316	0,37	101±42	0,16
	MBP	36	3482±355	0,61	95±44	0,43
Zelldichte peripher	CO	36	3457±364		104±58	
	KER	32	3301±368	0,27	97±57	0,94
	ONA	36	3124±387	0,0001	119±55	0,63
	MBP	36	3087±316	0,0001	112±38	0,92

Abbildung 5 B: Analyse der Zelldichte 28 Tage nach Immunisierung mit den Antigenen KER, ONA und MBP. Die oberen Säulendiagramme zeigen die gruppenspezifischen Gesamtdichten an Neuronen (links) und Glia (rechts) pro Quadratmillimeter. Die Beziehungen der Tabelle sind gleich der Abbildung 7 A. Zur Evaluierung der Zelldichten wurden ebenfalls beide Flatmounts pro Tier verwendet.





	Gruppe	N	Neurone/mm <sup>2</sup>	p vs CO	Glia/mm <sup>2</sup>	p vs CO
Zelldichte gesamt	CO	56	3805±383		116±46	
	RGA	70	3571±537	0,033	127±48	0,34
	MBP	55	3544±615	0,023	137±45	0,042
Zelldichte zentral	CO	28	3986±255		121±45	
	RGA	34	3869±347	0,34	133±47	0,56
	MBP	27	3965±369	0,96	130±45	0,71
Zelldichte peripher	CO	28	3623±408		111±46	
	RGA	36	3289±536	0,024	122±50	0,6
	MBP	28	3139±527	0,001	144±44	0,03

Abbildung 5 C: Analyse der Zelldichte 42 Tage nach Immunisierung mit den Antigenen RGA und MBP. Gleich den beiden oben gezeigten Studien zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Untergang von Neuronen in den beiden immunisierten Gruppen (RGA und MBP) gegenüber der der Kontrolle (CO). Gleichzeitig nimmt die Anzahl an glialen Zellen zu. Bei der hier dargestellten Studie wurde nur ein Flatmount pro Tier ausgezählt.

### 4.3 Histopathologie und Demyelinisierung des N. opticus

Nach H&E Färbung der Bulbenquerschnitte zeigten sich diese bei allen Studien intakt. Bei den Versuchstieren waren, unabhängig von der Laufzeit und dem Antigen, sowohl in der Retina als auch im Kammerwinkel keine inflammatorischen Zellen zu detektieren. Die Retinae schienen makroskopisch intakt zu sein und wiesen keinerlei Deformationen auf. Bei der immunhistochemischen Darstellung der Autoantikörper war die retinale Morphologie identisch zu den Observationen aus der H&E Färbungen (Abbildung 9 A-C). Ebenfalls waren die Gehirne aller Versuchstiere, soweit begutachtbar, weitestgehend unversehrt. Auch nach Untersuchungen der LFB, LFB/N und LFB/PAS Färbungen konnte keine nennenswerte Demyelinisierung im zentralen Nervensystem festgestellt werden. Lediglich bei einem Tier (aus der 14 tägigen Studie zum histopathologischen Studium der frühen Phase des retinalen Ganglienzelluntergangs) zeigten sich vereinzelt inflammatorische Zellen im Bereich des Stammhirnes. Dieses Tier war mit MBP immunisiert worden und hatte bei Tötung einen Enzephalitis-Score von 2.

Bei den Untersuchungen der transversalen Opticusschnitte mittels H&E und LFB (LFB/N) Färbungen konnten bei insgesamt drei Tieren, zwei mit ONA immunisiert und eines mit MBP, 28 Tage n. I. wenige inflammatorische Zellen beobachtet werden (Abbildung 6 A-C). Inflammationen waren weder 14 Tage n. I. noch bei 42 Tage n. I. detektieren. Anzeichen auf Demyelinisierungen und weitere pathologische Beschädigungen wie Ödeme oder abnorme Organisationen der Myelinscheiden traten erstmals 14 Tage n. I. bei den immunisierten Gruppen auf. Diese Observationen wiederholten sich beim Studium der Präparate von immunisierten Tieren bei der 28 Tage andauernden Studie. Jedoch waren keine Beschädigungen in der mit Keratin immunisierten Gruppe zu detektieren. Zum Zeitpunkt 42 Tage n. I. zeigten sich in den immunisierten Gruppen die deutlichsten Umorganisation der N. opticii mit einer fortgeschrittenen Demyelinisierung (Abbildung 6 D-F).

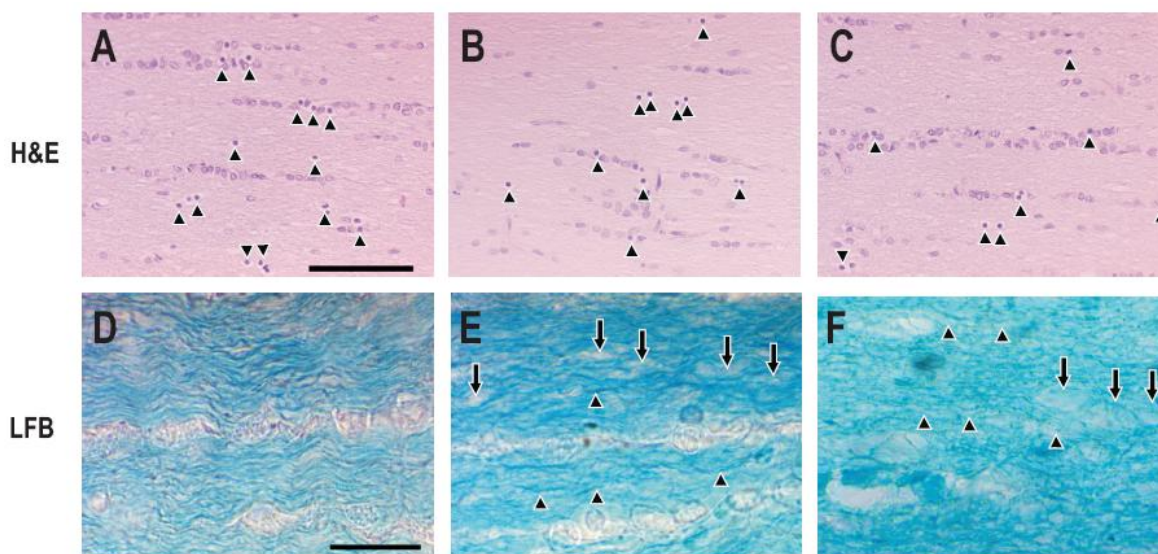
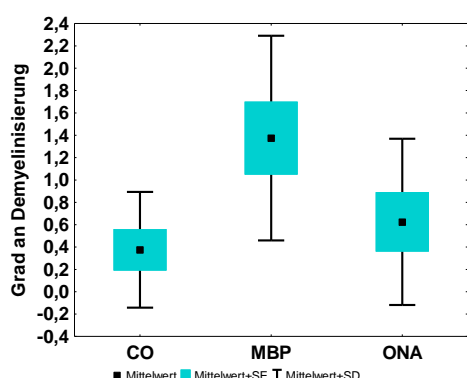


Abbildung 6: Histopathologische Untersuchung nach H&E und LFB Färbung der transversalen Opticusschnitte von Tieren 28 Tage n. I. A und B zeigen inflammatorische Zellen (Pfeilköpfe) in Opticusschnitten von ONA immunisierten Tieren. In C handelt es sich um ein Tier der MBP Gruppe, mit ebenfalls leichter Infiltration. Nach LFB Färbung (hier Beispiele 42 Tage n. I.) zeigten sich intakte Strukturen der Axone mit lamellenartigem Aufbau und ohne erkennbare Alteration oder Auftreten von axonalen Trümmern in der Kontrolle (D). Hingegen zeigten die MBP immunisierte Gruppe (E) sowie Tiere der RGA Gruppe (F) deutliche Alteration der Axone. Die Ausbildung von Ödemen (Pfeile) zu „vakuolartigen“ Blasen und die teilweise nackten Axone (Pfeilköpfe) neben geschwollenen Myelinscheiden stellen charakteristische Anzeichen für eine Demyelinisierung dar. Skala 20  $\mu\text{m}$ .

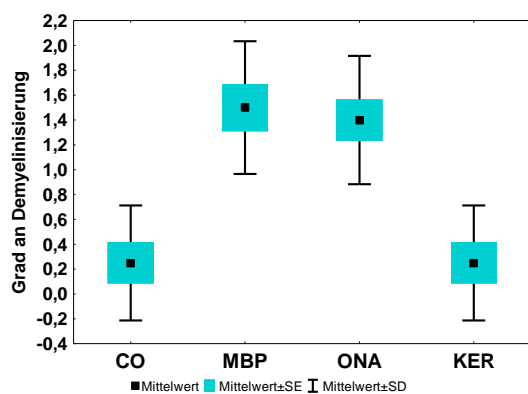
Nach Auswertung des Schweregrades war die Demyelinisierung bei der MBP immunisierten Gruppe gegenüber der Kontrollen zu allen Untersuchungszeitpunkten mit  $p < 0,03$  signifikant stärker. Die Mittelwerte der Einzelzeitpunkte zeigten einen zunehmenden Schweregrad mit 1,37 bei 14 Tagen n. I., 1,5 bei 28 Tagen n. I. und 1,7 bei 42 Tagen n. I.. Der zunehmende Trend ist jedoch zwischen den Zeitpunkten nicht signifikant ( $p < 0,55$ ). Hingegen war bei der Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten mit Schweregraden von 0,37 bei 14 Tagen n. I., 0,25 bei 28 Tagen n. I. und 0,62 bei 42 Tagen n. I. keine pathologische Demyelinisierung zu detektieren. Mit einem Mittelwert von 0,25 verhielt sich das Ergebnis der mit Keratin immunisierten Gruppe 28 Tage n. I. nahezu identisch zur Kontrolle. Eine beginnende Schädigung des N. opticus konnte bei der ONA immunisierten Gruppe zwar bei 14 Tagen n. I. mit einem Grad von 0,65 beobachtet werden, diese wurde aber erst 28 Tage n. I. mit einem Mittelwert von 1,4 als signifikant ( $p = 0,0003$ ) berechnet. Die RGA immunisierte Gruppe zeigte 42 Tage n. I. ebenfalls mit einem Mittelwert von 1,3 eine deutlich signifikante

Demyelinisierung ( $p=0,007$ ). Alle Werte sind nochmals in Abbildung 7 mit Standardabweichung und Diagrammen für jeden Zeitpunkt folgend zusammengefasst.



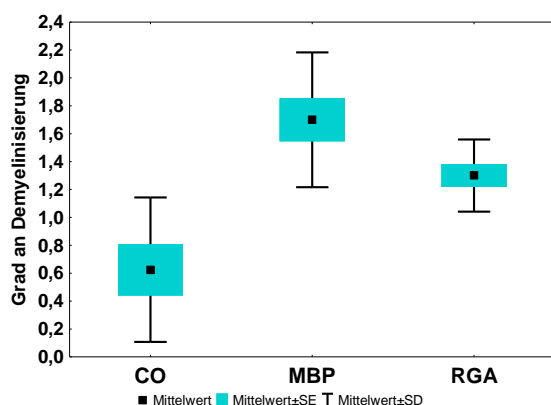
Gruppe	Grad an Demyelinisierung	p vs CO
CO	0,37±0,51	
MBP	1,37±0,91	0,03
ONA	0,62±0,74	0,13

Abbildung 7 A: Auswertung des Grades an Demyelinisierung mit dem 0-3 Schema 14 Tage n. I..



Gruppe	Grad an Demyelinisierung	p vs CO
CO	0,25±0,46	
MBP	1,50±0,53	0,0002
ONA	1,40±0,51	0,0003
KER	0,25±0,46	1

Abbildung 7 B: Auswertung des Grades an Demyelinisierung mit dem 0-3 Schema 28 Tage n. I..



Gruppe	Grad an Demyelinisierung	p vs CO
CO	0,62±0,51	
MBP	1,70±0,48	0,0001
RGA	1,30±0,25	0,007

Abbildung 7 C: Auswertung des Grades an Demyelinisierung mit dem 0-3 Schema 42 Tage n. I..

## 4.4 Immunhistologische Neuropathologie

Die immunhistologischen Färbungen konnten für alle beschriebenen Ansätze erfolgreich und reproduzierbar durchgeführt werden. Zur Reproduzierbarkeit wurden mindestens drei Färbungen an verschiedenen Tagen mit je frischen Antikörperansätzen durchgeführt. Ebenfalls wurden Negativkontrollen, durch Inkubationen mit PBS statt des Primär- oder Sekundärantikörpers, mitgeführt.

### 4.4.1 Detektion von IgM und IgG Autoantikörperablagerungen

Die Detektion und Charakterisierung von Autoantikörperablagerungen in der Retina und im N. opticus war einer der Hauptschwerpunkte dieser Arbeit. Dabei galt es zwischen der Detektion von Antikörpern innerhalb von Blutgefäßen, welche gleichzeitig als Positivkontrolle dienten, und der „echten“ Autoantikörperablagerung im neuronalen Gewebe zu unterscheiden. Schwierig war dies besonders bei der Untersuchung mit IF, da augenscheinlich nur die Zellkerne als weitere Orientierung dienten. Bei genauerer Betrachtung konnten jedoch die platten Zellkerne der Endothelzellen eruiert werden. Innerhalb der Ablagerungen zeigten sich Konturen, welche morphologisch anhand von Form und Größe nur Erythrozyten zugeordnet werden konnten. Meist waren die Ablagerungen in Gefäßen um ein Vielfaches größer als die im neuronalen Gewebe. Diese Observationen wurden mit den IHC Präparaten verglichen, um auch hier eine verlässliche Unterscheidung anhand der Morphologie zu gewährleisten.

Der Nachweis für IgM Ablagerungen gelang erstmals in der frühen Phase des retinalen Ganglienzelltodes zwischen dem 14 und 22 Tag n. I. für das Antigengemisch ONA (Abbildung 8 A-C). Die Ablagerungen waren nach DAB Färbung meist diffus in der retinalen Ganglienzellschicht zu finden und schwer zu interpretieren, geschweige denn quantitativ auszuwerten. Erst nach Untersuchung mittels IF konnten die IgM Autoantikörper genauer lokalisiert und charakterisiert werden. Es waren einzelne, größere IgM<sup>+</sup> Areale in der Ganglienzellschicht auszumachen, in denen schwach gefärbte oder fragmentierte Zellkerne zu sehen waren. Außerdem wies die gesamte Nervenfaserschicht bei fast allen immunisierten Tieren eine gewisse basale Fluoreszenz auf, diese war bei der Kontrolle nicht zu sehen.

Für das Antigen MBP ließen sich 14 Tage n. I. nur vereinzelte DAB gefärbte IgM Antikörperablagerungen in der retinalen Ganglienzellschicht, aber insbesondere in der Nervenfaserschicht beobachten. Zu späteren Zeitpunkten konnten keine IgM Antikörper

außerhalb retinaler Gefäße mehr nachgewiesen werden. In transversalen Opticusschnitten der immunisierten Tiere war die Detektion von IgM stets negativ.

IgG Autoantikörper waren ebenfalls in der frühen Phase des retinalen Ganglienzelltodes während der longitudinalen Studie zu detektieren (Abbildung 9 D-F). Nach 8 Tagen konnten vereinzelte IgG Ablagerungen in der ONA immunisierten Gruppe lokalisiert werden, welche nach 14 und 22 Tagen mengenmäßig tendenziell schwach zunahmen. Diese waren morphologisch gut beschreibbar und in zwei Klassen zu differenzieren. Einerseits erschienen sie relativ stark gefärbt und extrazellulär an der Zellmembranen lokalisiert zu sein, andererseits waren sie klein und punktförmig und an leicht dekondensierten Zellkernen intrazellulär zu finden. Die Auszählung von Stichproben ergab eine mengenmäßig gleiche Verteilung von IgG und IgM Ablagerungen. In der Kontrollgruppe waren vereinzelt diffuse und schwach gefärbte IgG Ablagerungen zu finden. Statistische Analysen wurden zu diesem Zeitpunkt aufgrund der geringen Häufigkeit von IgG Ablagerungen nicht erhoben.

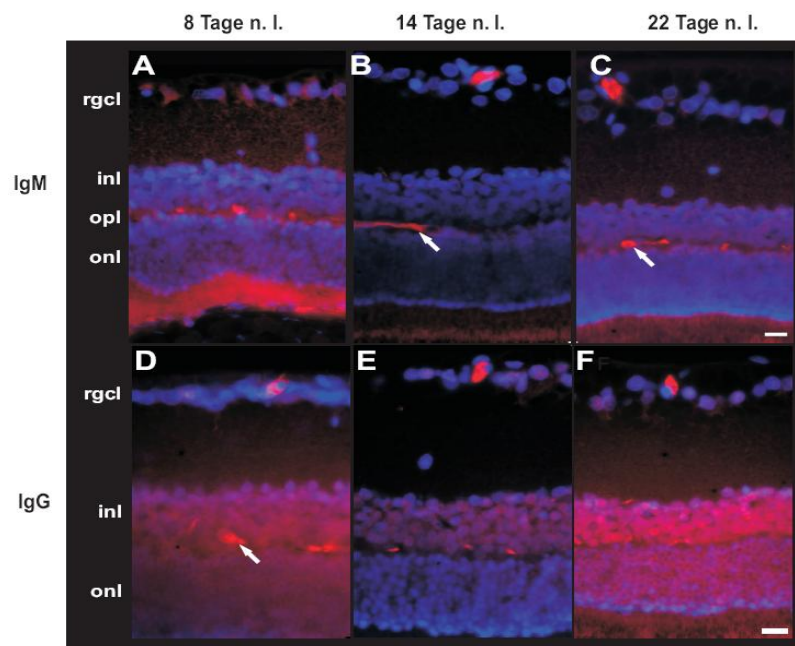


Abbildung 8: Ablagerungen von IgM und IgG Autoantikörper in der retinalen Ganglienzellschicht (rgcl) von ONA immunisierten Versuchstieren zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Antikörper Ablagerungen nach direkter Färbung durch FITC konjugierte goat anti-rat IgM (A-C) oder IgG (D-F) Antikörper sind in den Photos rot dargestellt. Die Zellkerne erscheinen nach Markierung mit DAPI blau. Es lässt sich neben den Ablagerungen auch eine deutlich positive Detektion von Antikörpern im Blutgefäßsystem der äußeren plexiformen Schicht (opl) erkennen (Pfeile). Skala: 10 µm.

Erst zur späteren Phase des retinalen Ganglienzelltodes 42 Tage n. I. wurden die IgG Ablagerungen nach DAB Färbung quantitativ für die Antigene MBP und RGA analysiert. Dabei zeigte sich, dass sich in den beiden immunisierten Gruppen deutlich mehr IgG Ablagerungen pro mm Retina ansammelte als in der Kontrollgruppe. Die Ablagerungen waren fast ausschließlich in der retinalen Ganglienzellschicht und vereinzelt in der Nervenfaserschicht zu finden. In den darunterliegenden Schichten, wie der inneren plexiformen Schicht oder bei den amakrinen und bipolaren Zellen konnten keine Ablagerungen, weder nach DAB noch nach IF Färbung, observiert werden (Abbildung 9). Bei den extrazellulären Ablagerungen waren oftmals fragmentierte Zellkerne in den betroffenen Zellen zu sehen. Bei den Schnitten, welche für die Quantifizierung verwendet wurde, variierte die retinale Länge innerhalb und zwischen den Gruppen kaum (CO:8,62±3,18 mm, MBP:8,53±2,13 mm, RGA:8,85±1,15,  $p>0,95$ ), sodass die Gruppen gut vergleichbar waren. In der Kontrollgruppe konnten 1,09±0,79 IgG Ablagerungen/mm detektiert werden. Die RGA immunisierte Gruppe wies mit 2,98±1,72 IgG Ablagerungen/mm die höchste Menge auf. Diese war verglichen mit der Kontrollgruppe mit  $p=0,01$  signifikant erhöht. Auch bei der mit MBP immunisierten Gruppe konnte mit 1,95±1,09 IgG Ablagerungen/mm ein vermehrtes, jedoch nicht signifikantes Auftreten detektiert werden ( $p=0,4$ ). Nach Untersuchung der transversalen Opticusschnitte mittels IF konnte nur bei der mit MBP immunisierten Gruppe massive IgG Ablagerungen observiert werden. Die Färbemuster zeigten Gemeinsamkeiten mit denen der LFB/N Färbung (Anhang 3). Bei der RGA Gruppe wurden nur vereinzelte Ablagerungen in der Nähe des Sehnervenkopfes gefunden.

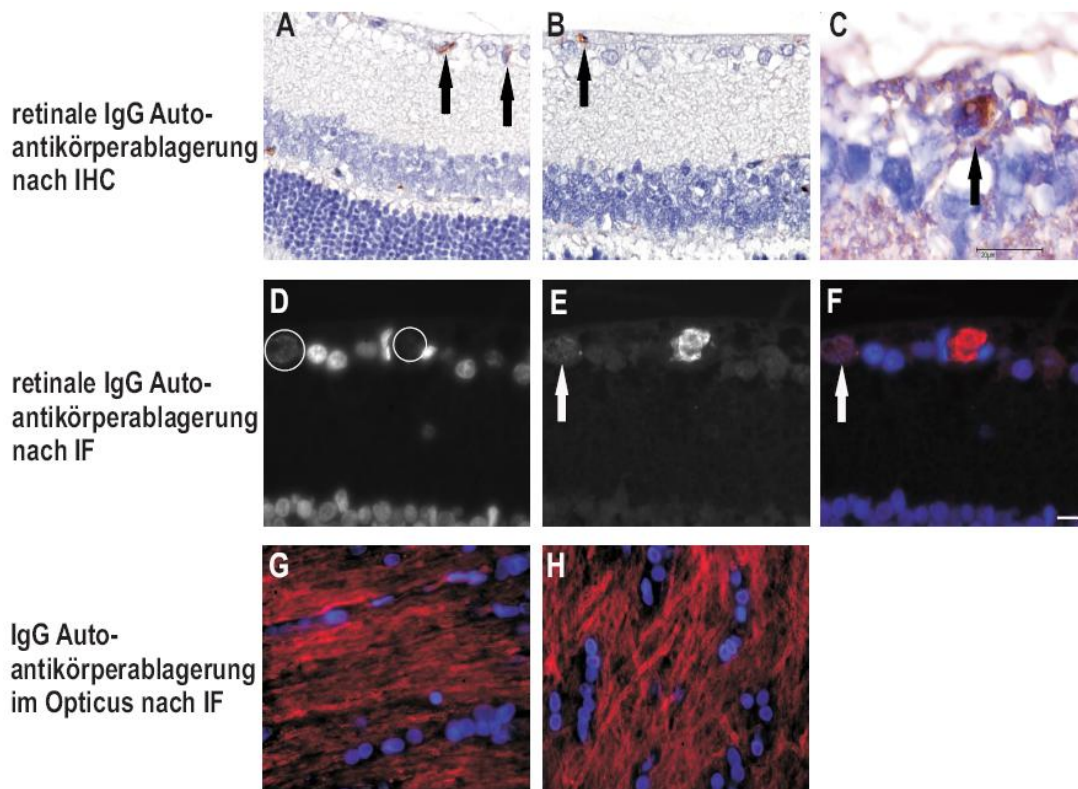


Abbildung 9: IgG Antikörperablagerungen von drei verschiedenen RGA immunisierten Tieren (A-C). Die Immunreaktion wurde mit DAB visualisiert und mit Hämalaun gegengefärbt. Bei den Bildern A und B handelt es sich um Aufnahmen, welche während der Begutachtung und Auszählung mit dem Vanox-T Mikroskop angefertigt wurden. Neben den IgG Ablagerungen in der retinalen Ganglienzellschicht (Pfeile) konnte keine Veränderungen der übrigen retinalen Schichten festgestellt werden. In Bild C ist eine extrazelluläre IgG Ablagerung im Detail gezeigt (Skala 20  $\mu\text{m}$ ). Nach IF (D-E) konnte ebenfalls extrazellulär erscheinende Anlagerungen von IgG Autoantikörpern bei MBP immunisierten Tieren dargestellt werden. Der unter den Ablagerungen liegende Zellkern scheint stark fragmentiert (schwaches DAPI Signal in den weißen Kreisen) zu sein. Bild D zeigt das DAPI Signal, Bild E das der Antikörper Ablagerungen und in F ist das montierte Bild zu sehen. Auch einige (meist schwache) intrazelluläre Ablagerungen konnten direkt an den Kernen detektiert werden (Pfeil). Skala 10  $\mu\text{m}$ . IgG Autoantikörperablagerungen im N. opticus (G-H) waren nur in der MBP immunisierten Gruppe zu detektieren.

Durch die spezifischen Antikörper, welche bei der IF eingesetzt wurden, konnte eine Unterscheidung der IgG Subtypen bei der retinalen Antikörperablagerung der RGA immunisierten Gruppe erfolgen. Dazu wurde jeder FITC gelabelte Antikörper, spezifisch für einen Subtypen zusammen mit dem TRITC konjugierten Antikörper für gesamte IgG in der Doppelfärbung untersucht. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die IgG Autoantikörper im



neuronalen Gewebe fast ausschließlich der Subklasse IgG<sub>1</sub> zugeordnet werden konnte. Die Detektion von IgG<sub>2a-b</sub> war nur basal mit schwacher Intensität möglich und die von IgG<sub>3</sub> stets negativ (Abbildung 10).

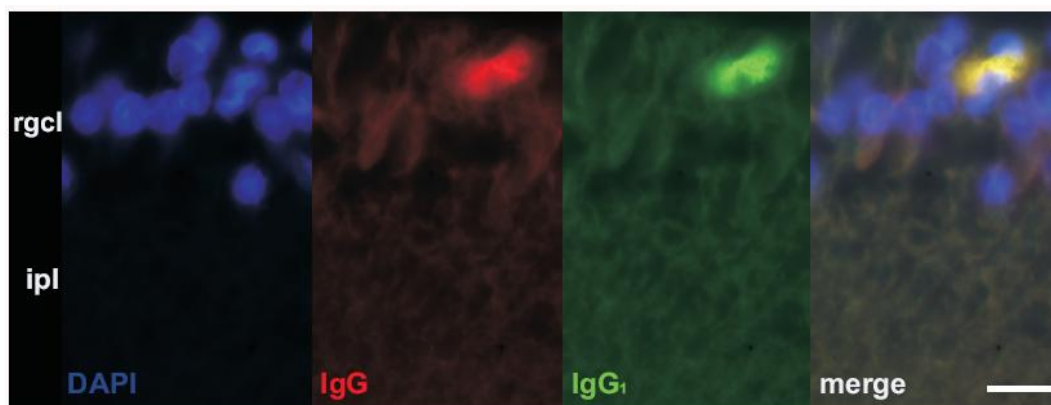


Abbildung 10: Unterscheidung der IgG Subtypen bei der retinalen Autoantikörperablagerung in einem RGA immunisierten Tier. Im linken Bild sind die Zellkerne der retinalen Ganglienzellschicht (rgcl) durch DAPI blau markiert. IgG wurde, ohne Unterscheidung des Subtyps, via goat anti-rat IgG (H+L) TRITC gelabeltem Antikörper detektiert (IgG). Dieser wurde mit dem IgG<sub>1</sub> Subtyp spezifischen goat anti-rat FITC Antikörper (IgG<sub>1</sub>), welcher nur die variable Kette von IgG<sub>1</sub> als Epitop erkennt, koinkubiert. Im Bild rechts sind alle drei Kanäle übereinander gelegt (merge), wobei eine eindeutige Kolokalisation der beiden IgG Antikörper zu erkennen ist. Skala 10 µm.

#### 4.4.2 Caspasen

Die Aktivierung von Caspasen konnte sowohl in der frühen Phase des Ganglienzelltodes in der longitudinalen Studie, als auch zu einem späten Zeitpunkt 42 Tage nach Immunisierung gezeigt werden und mit dem 0-3 Schema quantifiziert werden (Abbildung 11 und 12). Bereits im frühen Stadium 8 Tage nach Immunisierung waren leicht erhöhte Aktivitäten von Caspase 3 in der ONA Gruppe und in der Kontrollgruppe zu detektieren. Nach Analyse mit dem T-Test waren diese mit einem Mittelwert von  $1,0 \pm 0,81$  in der Kontrolle und  $1,6 \pm 0,54$  in der immunisierten Gruppe jedoch nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,22$ ). Zum Zeitpunkt 14 Tage n. I. kehrte die Caspase 3 Aktivität bei Kontrolle zu einem basalen Wert von  $0,4 \pm 0,54$  zurück. Hingegen zeigte sich eine signifikante Erhöhung auf  $2,0 \pm 0,70$  in der ONA Gruppe ( $p=0,004$ ). Der basale Wert für die Kontrollgruppe blieb auch 22 Tage n. I. mit  $0,4 \pm 0,54$  erhalten, wohingehend die Aktivität in der immunisierten Gruppe weiter mit  $2,0 \pm 0,0$  signifikant erhöht war ( $p=0,001$ ). Die Caspasen 8 und 9 waren in dieser Studie nur vereinzelt,

spezifisch in der Ganglienzellschicht zu detektieren und wiesen eine nur sehr schwache Intensität auf. Dabei unterschieden sich die Aktivitäten der beiden Gruppen kaum. Eine eindeutige Klassifizierung in das 0-3 Schema war nicht möglich.

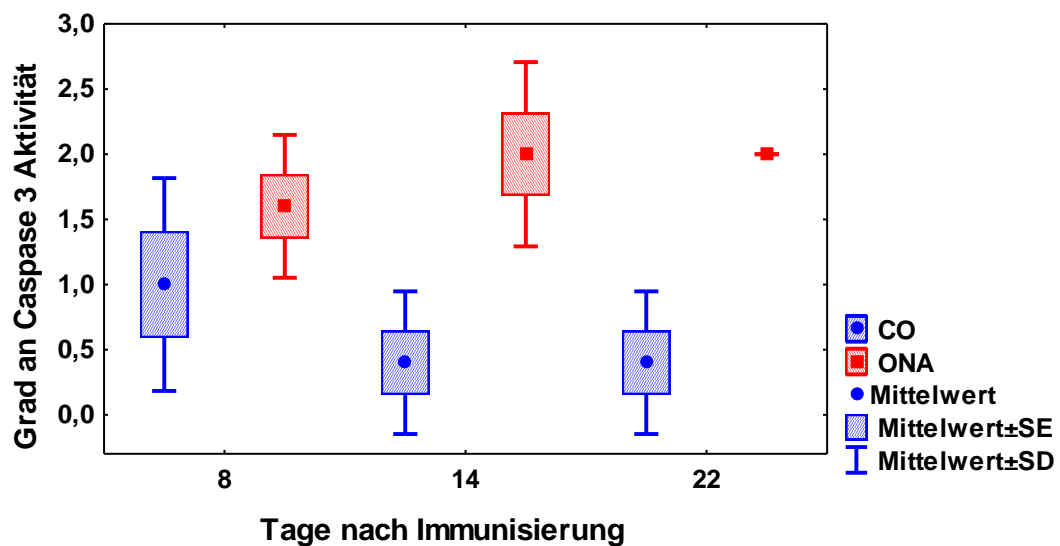
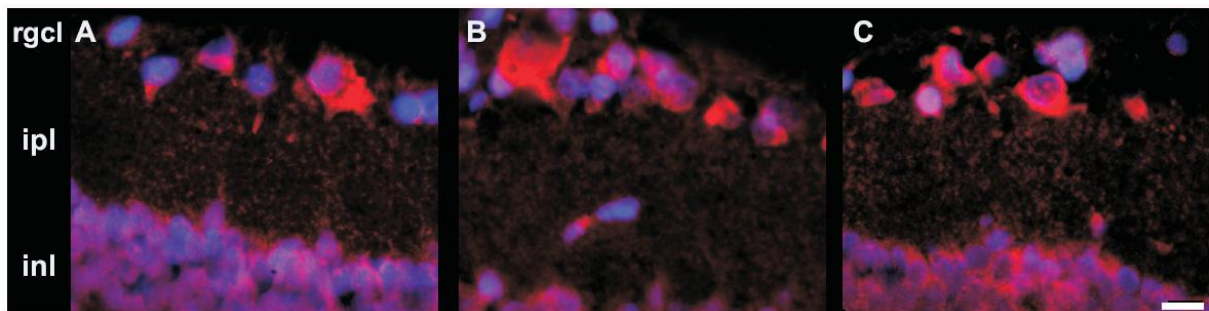


Abbildung 11: Caspase 3 Aktivität (rot) in der retinalen Ganglienzellschicht bei ONA immunisierten Tieren nach 8 Tagen (A), 16 Tagen (B) und 22 Tagen (C). Skala: 10  $\mu$ m. Die ansteigende Aktivität der Caspase 3 ist im Box Plot grafisch dargestellt. Auf der Y-Achse befindet sich der Grad an Caspaseaktivität und auf der X-Achse stehen die Zeitpunkte nach Immunisierung. 14 und 22 Tage n. I. war die Caspase 3 Aktivität in der ONA immunisierten Gruppe signifikant erhöht ( $p < 0,004$ ), während die der Kontrolle abnahmen. 22 Tage n. I. waren der Grad an Caspase 3 Aktivität in der ONA Gruppe bei allen untersuchten Präparaten kontinuierlich bei 2 (deshalb ist keine Standardabweichung zu sehen).

Doppelfärbungen von Caspase 3 und IgG Autoantikörperablagerungen waren in der longitudinalen Studie ebenfalls möglich. Dabei konnten mehrmals Kolokalisationen, wie in Abbildung 12 zu sehen ist, nachgewiesen werden.

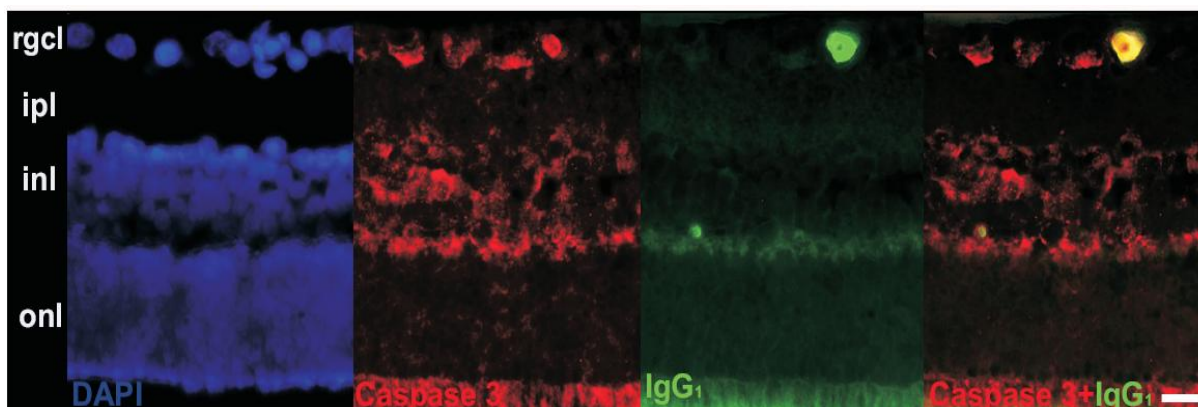


Abbildung 12: Aktive Caspase 3 (Caspase 3) und IgG Autoantikörperablagerung (IgG<sub>1</sub>) in der Retina eines mit ONA immunisierte Tieres 14 Tage n. I.. Links sind die Zellkerne (DAPI) und die retinalen Schichten zur Orientierung dargestellt. Rechts befindet sich das übereinander gelegte Bild der Caspase 3 und der IgG Ablagerung (Caspase 3 + IgG<sub>1</sub>). Skala 10 µm.

Für das Antigen RGA konnten in der fortgeschrittenen Phase des retinalen Ganglienzelluntergangs (Studie aus Kapitel 3.5.3) alle drei Caspasen eindeutig in höherer Grundintensität nachgewiesen und quantifiziert werden (Abbildung 13). Die Aktivierung der Caspase 3 war in dieser Studie ebenfalls mit einem Mittelwert von  $1,40 \pm 0,65$  gegenüber der Kontrolle mit  $0,34 \pm 0,27$  signifikant erhöht ( $p=0,008$ ). Weiter konnte für die Aktivität der Caspase 8 ein Wert von  $2,0 \pm 0,61$  ermittelt werden. Im Vergleich zur Kontrolle mit  $0,60 \pm 0,54$  war auch diese Caspaseaktivität mit  $p=0,005$  signifikant stärker. Die Caspase 9 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der immunisierten Gruppe und der Kontrolle ( $p=0,11$ ). Beide Aktivitäten waren vergleichsweise niedrig (RGA:  $0,70 \pm 0,44$ ; CO:  $0,20 \pm 0,44$ ). Beim Vergleich zwischen den Caspasen mit dem Tukey's HSD Post Hoc zeigte sich in der RGA immunisierten Gruppe eine signifikante Erhöhung der Caspase 8 gegenüber der Caspase 9 ( $p=0,006$ ). In der Kontrolle waren keine Veränderungen detektierbar.

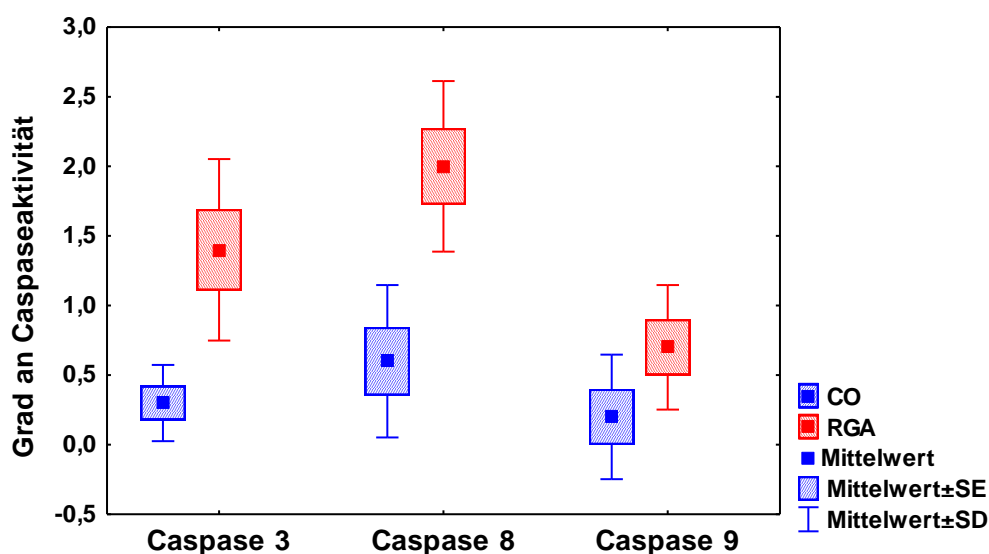


Abbildung 13: Verteilung der retinalen Caspaseaktivitäten in der fortgeschrittenen Phase des retinalen Ganglienzelluntergangs. Der Box Plot verdeutlicht die beschriebenen Ergebnisse, mit einer signifikant erhöhten Aktivität von Caspase 3 und 8 in der mit RGA immunisierten Gruppe gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,005$ ). Die Y-Achse gibt den Grad an Caspaseaktivität an während auf der X-Achse die einzelnen Caspasen aufgelistet sind.

#### 4.4.3 Untersuchung der mikroglialen Verteilung in Retina und N. opticus

Die Darstellung von Mikroglia im optischen Gewebe wurde durch den anti-Iba1 Antikörper mit anschließender IHC und IF bewerkstelligt. Der Vorteil dieses Markers liegt in der Möglichkeit zur morphologischen Unterscheidung in den aktivierten oder ramifizierten bzw. ruhenden Zustand der Zelle. In den retinalen Querschnitten und im N. opticus waren die aktivierten Mikroglia meist kreisrund, ohne die weitreichenden Verästelungen und von amöboider Gestalt mit zwei dicken Zellpolen. Die ruhende Form war stark verzweigt und besaß ein wesentlich kleineres Zellsoma. Beispiele für den Status sind in den nachfolgenden Abbildungen 14 und 15 für beide Farbmethoden angeführt.

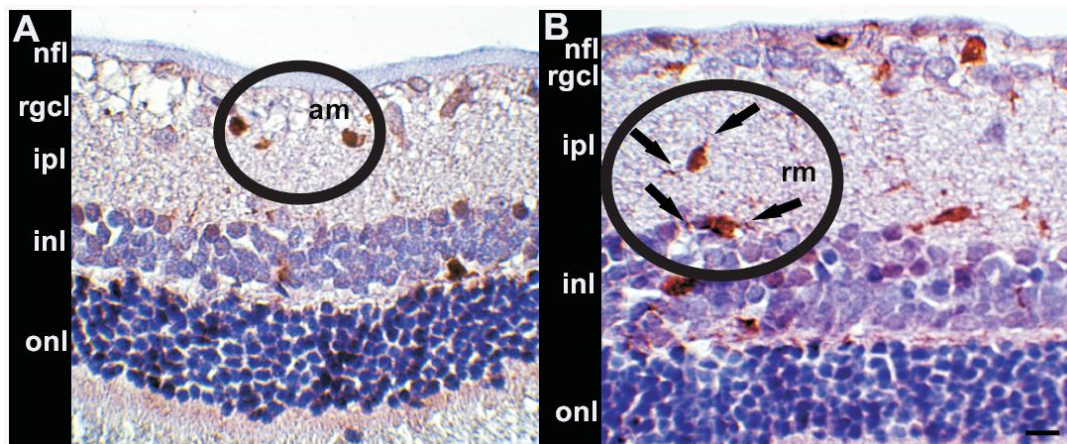


Abbildung 14: Iba1<sup>+</sup> Mikrogliia in der Retina eines RGA immunisierten nach DAB Visualisierung und Gegenfärbung mit Hämalaun. A zeigt aktive Mikrogliia (am) unterhalb der Nervenfaserschicht (nfl) und in der retinalen Ganglienzellschicht (rgcl). Ramifizierte Glia (rm) mit ihrer charakteristischen Verzweigung sind dagegen eher in der inneren Plexiformen Schicht (ipl) und der Amakrin-Bipolar Zellschicht (inl) zu finden (B). Die Pfeile zeigen die zwei Hauptäste, von denen eine Vielzahl an dünnen Seitenästen abzweigen. Skala 10  $\mu$ m.

Auch die Lokalisationen in den Retinae gab Aufschluss über deren Status, so waren die aktivierten Mikrogliia eher in der Gangleizellschicht und die ruhenden Mikrogliia den tieferen retinalen Schichten zu finden. Zur Evaluierung wurden Bulbenquerschnitte der mit MBP und RGA immunisierten Gruppen 42 Tage n. I. sowie der entsprechenden Kontrollgruppe verwendet. Wie auch bei der Auswertung zu den Ablagerungen von Autoantikörpern wurden möglichst homogene Querschnitte aus den zentralen Bereichen der Bulbi verwendet. Dabei konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an aktivierten Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht und in der darüber liegenden Nervenfaserschicht in beiden immunisierten Gruppen gefunden werden ( $p < 0,05$ ). Aufgrund der Datenmenge sind in der folgenden Tabelle 3 alle Werte jeder Schicht einzeln aufgeführt. Die statistische Analyse wurde gruppenspezifisch mittels Tukey's Post Hoc Test für jede retinale Schicht einzeln durchgeführt. Die angegebenen p-Werte beziehen sich jeweils auf den Vergleich zur Kontrolle (Gruppe [MBP/RGA] vs CO). Für die Evaluierung in den transversalen Opticusschnitten wurde die ROI nach IF ausgezählt und analysiert.

Tabelle 3: Evaluierung der mikroglialen Verteilung, sowie deren morphologischer Status in der Retina (A) und im N. opticus (B). Die p-Werte (Gruppe [MBP/RGA] vs CO) beziehen sich auf die gruppenspezifischen Analysen jeder retinalen Schicht nach Tukey's Post Hoc Test.

**A) Retina**

		CO (mm)	MBP (mm)	MBP vs CO	RGA (mm)	RGA vs CO
retinale Länge		7,21±2,05	6,71±1,41	0,89	7,05±1,08	0,97
	Status	CO (Mikroglia/mm)	MBP (Mikroglia/mm)	MBP vs CO	RGA (Mikroglia/mm)	RGA vs CO
gesamte Mikroglia		5,07±1,04	7,89±1,67	<b>0,042</b>	9,91±3,74	<b>0,001</b>
Nervenfaserschicht	aktiviert	0,24±0,25	1,60±0,62	<b>0,0001</b>	0,76±0,34	0,13
retinale Ganglienzellschicht	aktiviert	1,24±0,34	2,14±0,56	<b>0,005</b>	2,91±0,65	<b>0,0001</b>
	ramifiziert	0,22±0,14	0,15±0,15	0,88	0,47±0,61	0,37
innere plexiforme Schicht	aktiviert	0,52±0,37	2,07±0,36	<b>0,0001</b>	1,45±0,40	<b>0,0004</b>
	ramifiziert	1,60±0,99	0,56±0,49	<b>0,025</b>	1,89±0,99	0,8
innere Körnerschicht	aktiviert	0,12±0,09	0,26±0,24	0,91	1,25±0,1,38	0,01
	ramifiziert	1,10±0,53	0,92±0,41	0,68	1,13±0,9	0,99
äußere Körnerschicht	aktiviert	0	0,02±0,05	0,75	0,01±0,45	0,96
	ramifiziert	0	0,09±0,13	0,98	0,08±0,17	0,44

**B) Nervus opticus**

	Status	CO (microglia/ROI)	MBP (Mikroglia/ROI)	MBP vs CO	RGA (Mikroglia/ROI)	RGA vs CO
gesamte Mikroglia		16,00±5,52	14,20±4,29	0,82	13,60±3,49	0,73
	aktiviert	3.16±1.00	6.46±2.43	<b>0.03</b>	4,58±1,44	0,15
	ramifiziert	12.90±6.30	7.80±4.32	0.13	9,08±2,23	0,29

Um das Zusammenspiel zwischen Mikroglia und den Ablagerungen von Autoantikörpern beim retinalen Ganglienzelltod zu studieren, wurden diese in der IF Doppelfärbungen durch Kombination der direkten und indirekten Methode dargestellt. Die Schnittdicken der Bulbenquerschnitte RGA immunisierter Tiere variierten von 3-20 µm. Nach erfolgreicher IF wurden die Retinae zunächst durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Anschließend wurden die Mikroglia und kolokalisierte IgG Ablagerungen in einigen

ausgesuchten Präparaten 3 dimensional durch konfokale Mikroskopie dargestellt. Dabei zeigten sich erneut die typischen Verteilungen von IgG Autoantikörperablagerungen und aktivierten Mikroglia in den Retinae, wie sie aus den vorherig beschriebenen Ergebnissen der 42 Tage dauernden Studie bekannt waren. Dabei konnten jedoch festgestellt werden, dass eine Ansammlung von aktivierten Mikroglia (meist 2 bis 3) mit einer gehäuften Präsenz von IgG Ablagerungen einhergingen (Abbildung 15).

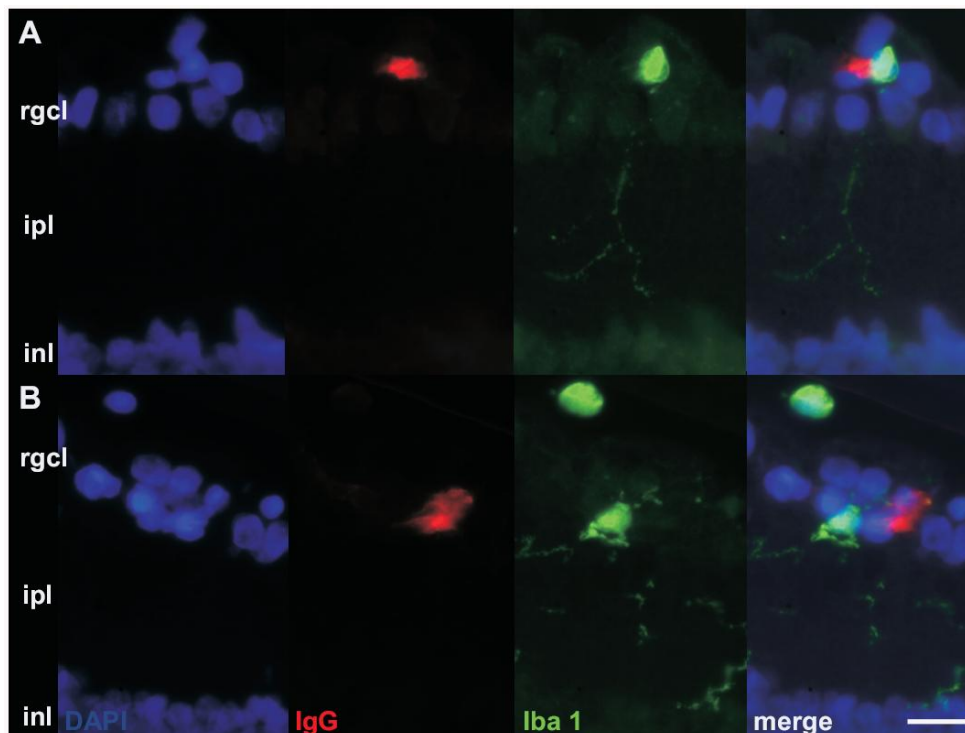


Abbildung 15: Darstellung von retinalen Mikroglia via rabbit anti-Iba1 und Cy 3 (grün) gelabelten goat anti-rabbit IgG Antikörpern. Die IgG Ablagerungen wurden direkt via FITC konjugiertem goat anti-rat IgG (rot) visualisiert. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Beide Bulben (A und B) stammen von je zwei RGA immunisierten Tieren. Die Bilder sind als Aufteilung in die Einzelkanäle (DAPI, IgG, Iba1) und anschließend als zusammengesetztes „merge“ Bild dargestellt. In der Bildreihe B sind zwei Mikroglia zu sehen, wobei die oberhalb der Ganglienzellschicht aktiviert ist. Die untere Mikroglia besitzt eine gut sichtbare und weite Verzweigung und ist als ramifiziert zu charakterisieren. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Bei der konfokalen Mikroskopie gelang es extrazelluläre IgG Antikörperablagerungen in direktem Kontakt mit einer Mikroglia zu detektieren (Abbildung 16). Ob dabei bereits Teile der Antikörperablagerung von der Mikroglia phagozytiert wurden konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden.

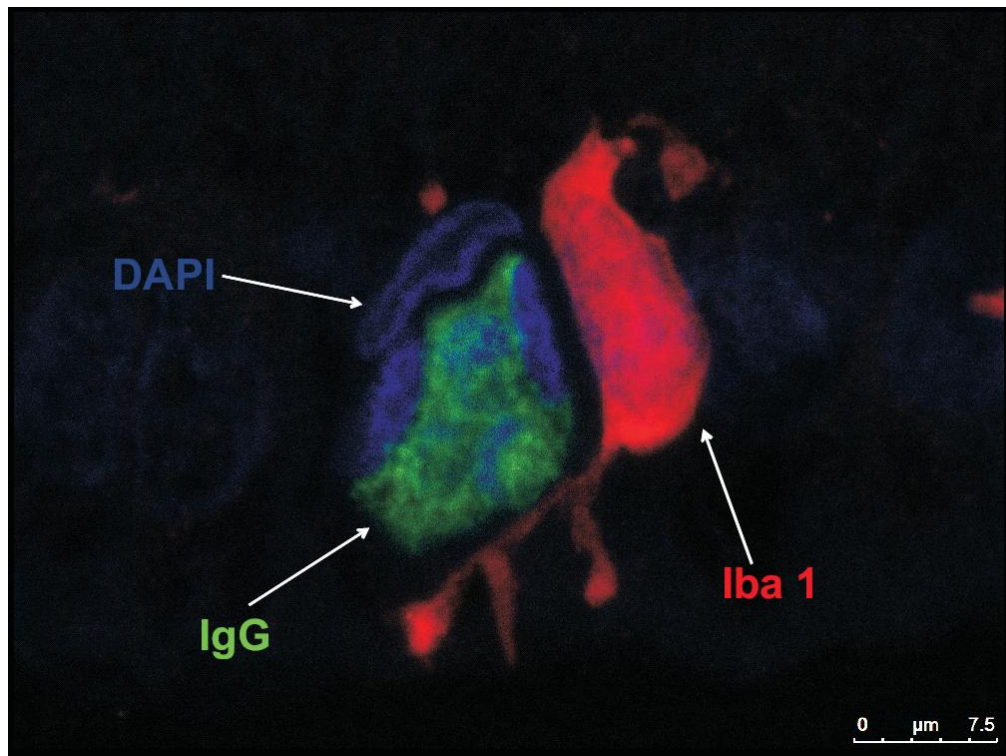


Abbildung 16: Konfokale Mikroskopie von Mikroglia (Iba1: rot) und IgG Antikörperablagerung (IgG: grün) in der retinalen Ganglienzellschicht eines RGA immunisierten Tieres. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Der Wert für die z Achse wurde zuvor manuell ermittelt und betrug 10 µm, die Schnittdicke war 15 µm.



## 4.5 Zunehmende IgG Antikörperreaktionen gegen okuläres Gewebe

Die Detektion von humoralen IgG Antikörperreaktionen gegen gesundes Gewebe der Retina anhand von Bulbenquerschnitten (**Retina Arrays**) und des N. Opticus ebenfalls in Querschnitten (**Opticus Arrays**) konnte erfolgreich für beide Studien durchgeführt werden.

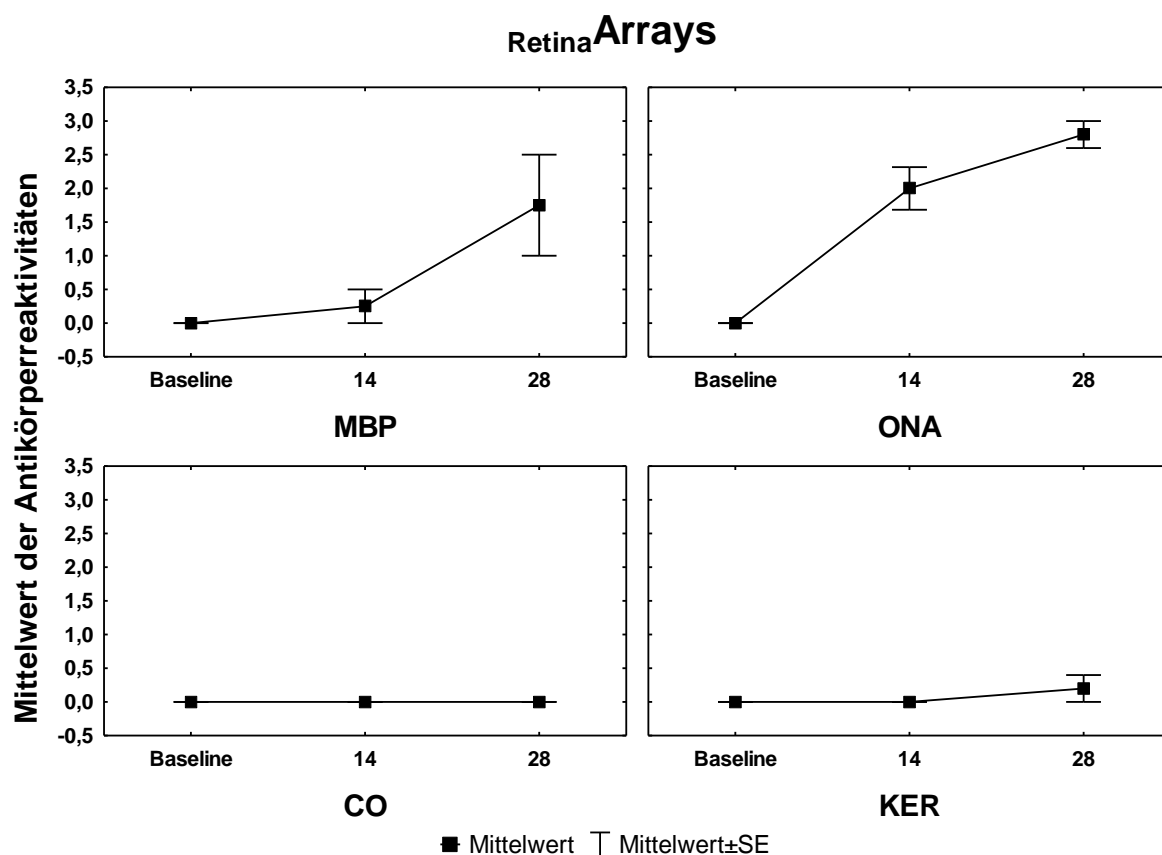
### 4.5.1 Verlauf von IgG Antikörperreaktionen der 28 Tage andauernden Studie

Serum, welches vor Immunisierung gewonnen wurde, zeigte bei keinem Versuchstier nennenswerte autoreaktive IgG Antikörper gegen okuläres Gewebe. Der Mittelwert aller Gruppen lag bei  $0,34 \pm 0,44$  für die **Retina Arrays** und bei  $0,15 \pm 0,17$  für die **Opticus Arrays**. Der statistische Vergleich nach Tukey's Post Hoc Test ergab keine signifikanten Veränderungen zu diesem Zeitpunkt ( $p > 0,76$ ). 14 Tage n. I. zeigten sich nach der Inkubation mit Serum der ONA Gruppe, sowie der MBP Gruppe deutliche Immunreaktionen. Gegen retinales Gewebe konnte bei der MBP Gruppe ein Mittelwert von  $0,75 \pm 0,31$  ermittelt werden. Dieser zeigte zwar eine erhöhte IgG Antikörperreaktion, welche aber zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant war ( $p = 0,24$ ). Bei der ONA immunisierte Gruppe wurde einen Mittelwert von  $1,33 \pm 0,88$  für die **Retina Arrays** errechnet und stellte damit eine signifikant erhöhte IgG Immunoreaktivität gegenüber der Kontrolle dar (CO:  $0,06 \pm 0,14$ ;  $p = 0,02$ ). Die Keratin Gruppe hatte zu diesem Zeitpunkt einem Mittelwert von  $0,4 \pm 0,2$  und damit keine erhöhten Antikörperreaktionen ( $p = 0,80$ ). Vergleichbare Beobachtungen konnten für die **Opticus Arrays** 14 Tage n. I. gemacht werden. Hier hatte die MBP immunisierte Gruppe einen Mittelwert von  $0,50 \pm 0,33$  und die ONA Gruppe einen von  $0,73 \pm 0,76$ . Damit waren in beiden Gruppen die Werte der autoreaktiven IgG Antikörper erhöht, aber nur für die ONA Gruppe statistisch signifikant (MBP:  $p = 0,63$ ; ONA:  $p = 0,0006$ ). Bei der Keratin Gruppe waren die Antikörperreaktionen wieder verhältnismäßig niedrig und vergleichbar mit denen der Kontrolle (CO:  $0,13 \pm 0,18$ ; KER:  $0,20 \pm 0,29$ ;  $p = 0,76$ ).

Mit zunehmender Studiendauer nahmen auch die humoralen Antikörperreaktionen der ONA und der MBP immunisierten Gruppe gegen beide okulären Gewebe zu. 28 Tage n. I. waren für die **Retina Arrays** stark erhöhte Mittelwerte von  $1,50 \pm 1,10$  bei der MBP Gruppe und von  $2,33 \pm 0,47$  bei der ONA Gruppe gegenüber der Kontrolle mit  $0,13 \pm 0,29$ , sowie der Keratin Gruppe mit  $0,60 \pm 0,68$  zu detektieren. Die Immunreaktionen der MBP und der ONA Gruppe waren hier beide signifikant erhöht (MBP:  $p = 0,03$ ; ONA:  $p = 0,0007$ ). Keine Unterschiede konnten zwischen der Kontrolle und der Keratin Gruppe detektiert werden ( $p = 0,69$ ). Die Untersuchung der **Opticus Arrays** zeigten wieder ähnliche Muster. Die ONA Gruppe hatte den höchsten Mittelwert mit  $2,60 \pm 0,43$  und bestätigte damit die signifikant erhöhte IgG

---

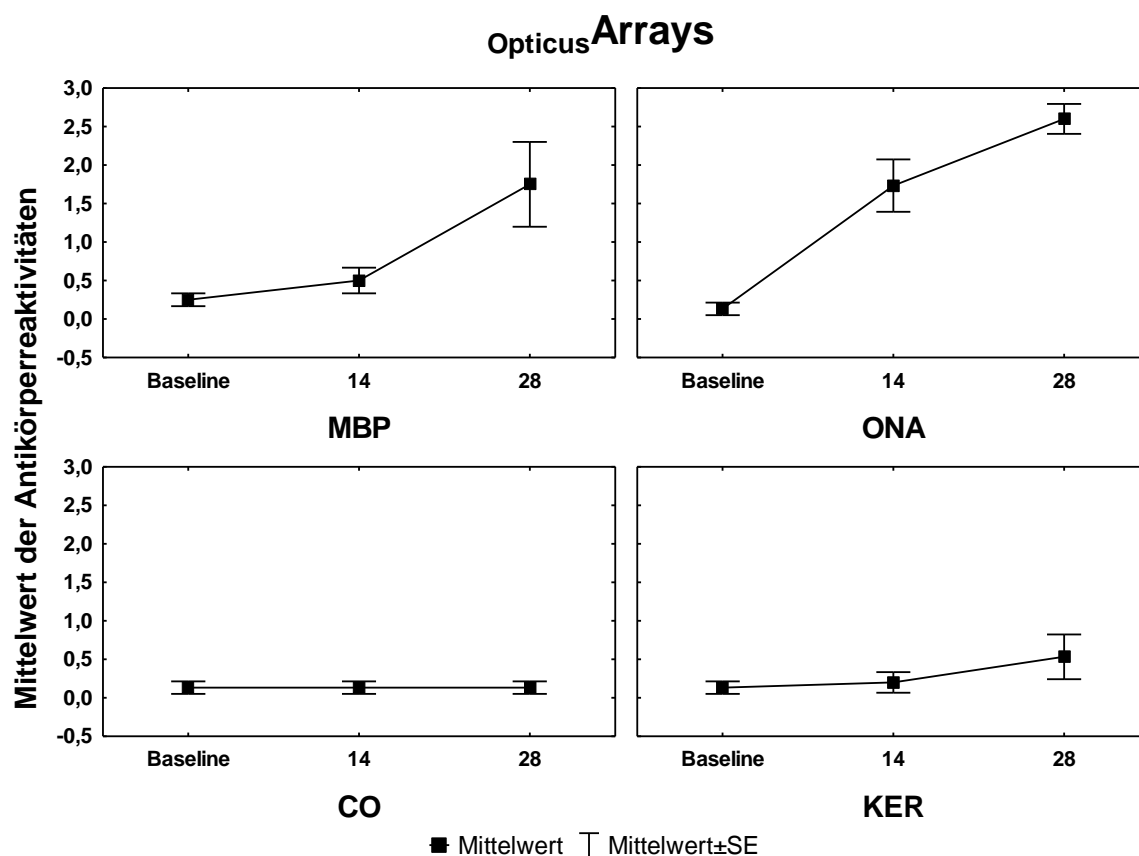
Antikörperreaktivität ( $p=0,0002$ ). Ebenfalls signifikant erhöht mit  $p=0,009$  und einem Mittelwert von  $1,75\pm 1,10$  waren die humoralen IgG Antikörperreaktionen der MBP immunisierten Gruppe 28 Tage n. I.. Die Keratin Gruppe zeigte erneut keine Veränderung gegenüber der Kontrolle (KER: $0,53\pm 0,64$ ; CO: $0,13\pm 0,18$ ;  $p=0,76$ ). Somit blieb für diese Studie festzuhalten, dass nur die ONA und die MBP immunisierten Gruppen im Verlauf der Studie signifikant erhöhte IgG Antikörperreaktionen gegen okuläre Gewebe entwickelten. Die Reaktionen der mit Keratin immunisierten Gruppe unterschieden sich nicht von denen der Kontrolle. Alle Werte sind grafisch als Mean Blots und als Tabelle in der nachfolgenden Abbildung 17 für die **Retina Arrays** und in Abbildung 18 für die **Opticus Arrays** zusammengefasst.



### Retina Arrays

Zeitpunkt	CO	MBP	MBP vs CO	ONA	ONA vs CO	KER	KER vs CO
Baseline	0,40±0,54	0,66±0,47	0,82	0,26±0,27	0,96	0,46±0,50	0,99
14 Tage n. I.	0,06±0,14	0,75±0,31	0,24	1,33±0,88	<b>0,007</b>	0,40±0,36	0,74
28 Tage n. I.	0,13±0,29	1,50±1,10	<b>0,03</b>	2,33±0,47	<b>0,0007</b>	0,60±0,68	0,69

Abbildung 17: Analyse der humoralen IgG Antikörperreaktionen gegen gesundes retinales Gewebe. Die Daten repräsentieren die 28 Tage dauernden Studie nach Immunisierung mit MBP, ONA und Keratin. In den Mean Blots sind die Werte der Antikörperreaktivitäten als Mittelwerte±Standardfehler auf der Y-Achse angegeben. Der gruppenspezifische Zeitverlauf ist auf der X-Achse angezeigt. Für die nachfolgende Tabelle wurde die Berechnung der Signifikanzen mit dem Tukey's HSD Post Hoc durchgeführt. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind mit Standardabweichung aufgeführt. Die p-Werte beziehen sich auf die Analyse der immunisierten Gruppen (ONA oder MBP) gegen die Kontrolle (CO) zu den jeweiligen Zeitpunkten.



### Opticus Arrays

Zeitpunkt	CO	MBP	MBP vs CO	ONA	ONA vs CO	KER	KER vs CO
Baseline	0,13±0,18	0,25±0,16	0,76	0,13±0,18	1,00	0,13±0,18	1,00
14 Tage n. I.	0,13±0,18	0,50±0,33	0,63	0,73±0,76	<b>0,001</b>	0,20±0,29	0,99
28 Tage n. I.	0,13±0,18	1,75±1,10	<b>0,009</b>	2,60±0,43	<b>0,0002</b>	0,53±0,64	0,76

Abbildung 18: Analyse der humoralen IgG Antikörperreaktionen gegen gesundes Sehnervgewebe. Die Daten repräsentieren ebenfalls die 28 Tage dauernden Studie. Die Darstellungen auf den Achsen der Mean Blots sind denen der **Retina Arrays** in Abbildung 17 identisch. Ebenso verhält es sich mit der Tabelle. Für Beide Analysen bleibt festzustellen, dass die IgG Antikörperreaktionen nach Immunisierung mit ONA gegenüber der Kontrolle bereits nach 14 Tagen signifikant erhöht waren.

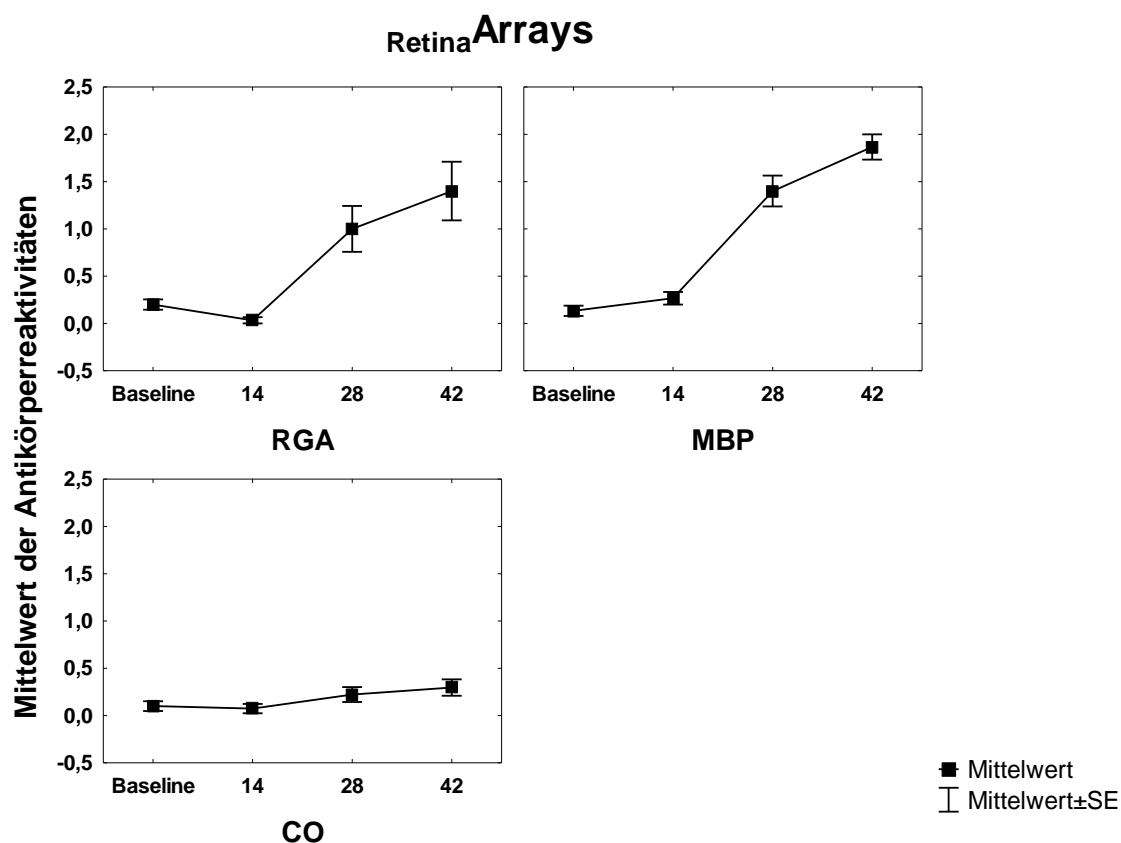
#### 4.5.2 Verlauf von IgG Antikörperreaktionen der 42 Tage andauernden Studie

Bei den Analysen der **Retina Arrays** und der **Opticus Arrays** konnten ebenfalls im Serum, welches zur Baseline abgenommen wurde, keine veränderten IgG Antikörperreaktionen detektiert werden. Für die **Retina Arrays** lag der Mittelwert aller Gruppen bei  $0,14 \pm 0,16$  und bei  $0,15 \pm 0,16$  für die **Opticus Arrays**. Der statistische Vergleich ergab keine signifikanten Abweichungen der humoralen IgG Antikörper der Versuchstiere vor Immunisierung gegen okuläres Gewebe ( $p > 0,39$ ). Erste, signifikante Unterschiede konnten bei den **Retina Arrays** der MBP immunisierten Gruppe 14 Tage n. I. festgestellt werden ( $p = 0,001$ ). Hier lag der Mittelwert bei  $0,48 \pm 0,33$  verglichen mit den deutlich niedrigeren Werten der Kontrolle mit  $0,07 \pm 0,14$  sowie der RGA immunisierten Tieren mit  $0,03 \pm 0,10$  bei kaum detektierbaren Immunreaktionen. Dieses Ergebnis konnte nicht bei den **Opticus Arrays** bestätigt werden und stand auch kontrovers zu den Daten aus der 28 Tage Studie. Festzuhalten blieb, dass die hohen Werte auf einzelne MBP immunisierte Tiere zurückzuführen waren, welche während der Studie verstarben. Die Seren der betreffenden Tiere wurden bei dem Untersuchungszeitpunkt 14 Tage n. I. auf den Arrays getestet, jedoch zu späteren Zeitpunkten nicht mehr. Wurden diese Daten bei erneuter Analyse exkludiert, lag der Mittelwert der MBP Gruppe bei  $0,26 \pm 0,14$ , welcher keine signifikante Erhöhung der IgG Antikörperreaktivität darstellte ( $p = 0,13$ ). Bei Analyse der **Opticus Arrays** fiel dies zunächst nicht auf, da die Werte (CO:  $0,07 \pm 0,14$ ; MBP:  $0,06 \pm 0,14$ ; RGA:  $0,18 \pm 0,24$ ) den Erwartungen entsprachen und sich auch nicht signifikant unterschieden ( $p > 0,34$ ). Nach Ausschluss der betreffenden Daten änderte sich dieses Ergebnis nur minimal (Tabellen in Abbildung 19 und 20). Wie auch in der vorangegangenen Studie waren die eindeutigen und signifikanten Veränderungen in den immunisierten Gruppen erst 28 Tage n. I. zu detektieren. Für die **Retina Arrays** waren in der MBP Gruppe signifikant erhöhte Mittelwerte von  $1,33 \pm 0,38$  und  $p = 0,0003$ , sowie bei der RGA Gruppe von  $1,00 \pm 0,76$  und  $p = 0,009$  gegenüber der Kontrolle mit  $0,22 \pm 0,23$  zu detektieren. Ähnliche Werte ergaben sich bei den **Opticus Arrays**. Auch hier waren die IgG Immunreaktionen der beiden immunisierten Gruppen (MBP:  $1,06 \pm 0,66$ ; RGA:  $1,26 \pm 0,99$ ) signifikant gegenüber der Kontrolle ( $0,11 \pm 0,16$ ; MBP:  $p = 0,018$ ; RGA:  $p = 0,004$ ) erhöht. Erstmals konnte in dieser Studie ein weiterer Zeitpunkt analysiert werden, der nicht nur 14 Tage nach dem letzten bekannten Zeitpunkt lag, sondern auch nach einer Booster-Immunisierung mit halber Ausgangsdosis. 42 Tage n. I. konnte eine weitere Zunahme der humoralen Antikörperreaktionen bei den immunisierten Gruppen detektiert werden. Die MBP Gruppe hatte einen Mittelwert bei den **Retina Arrays** von  $2,00 \pm 0,50$ , vergleichbar mit dem der RGA Gruppe von  $1,40 \pm 0,97$  und beide signifikant höher (MBP:  $p = 0,0001$ ; RGA:  $p = 0,004$ ) als der der Kontrolle mit  $0,29 \pm 0,26$ . Die

---

Untersuchung der **Opticus Arrays** zu diesem Zeitpunkt bestätigten die Ergebnisse der Seruminkubationen auf den Retinaquerschnitten mit ebenfalls signifikant erhöhten IgG Antikörperreaktionen ( $p < 0,0006$ ) in den beiden Immunisierten Gruppen von  $1,62 \pm 0,82$  (für MBP) und  $2,20 \pm 0,91$  (für RGA) verglichen mit den Normalwerten der Kontrolle ( $0,07 \pm 0,22$ ).

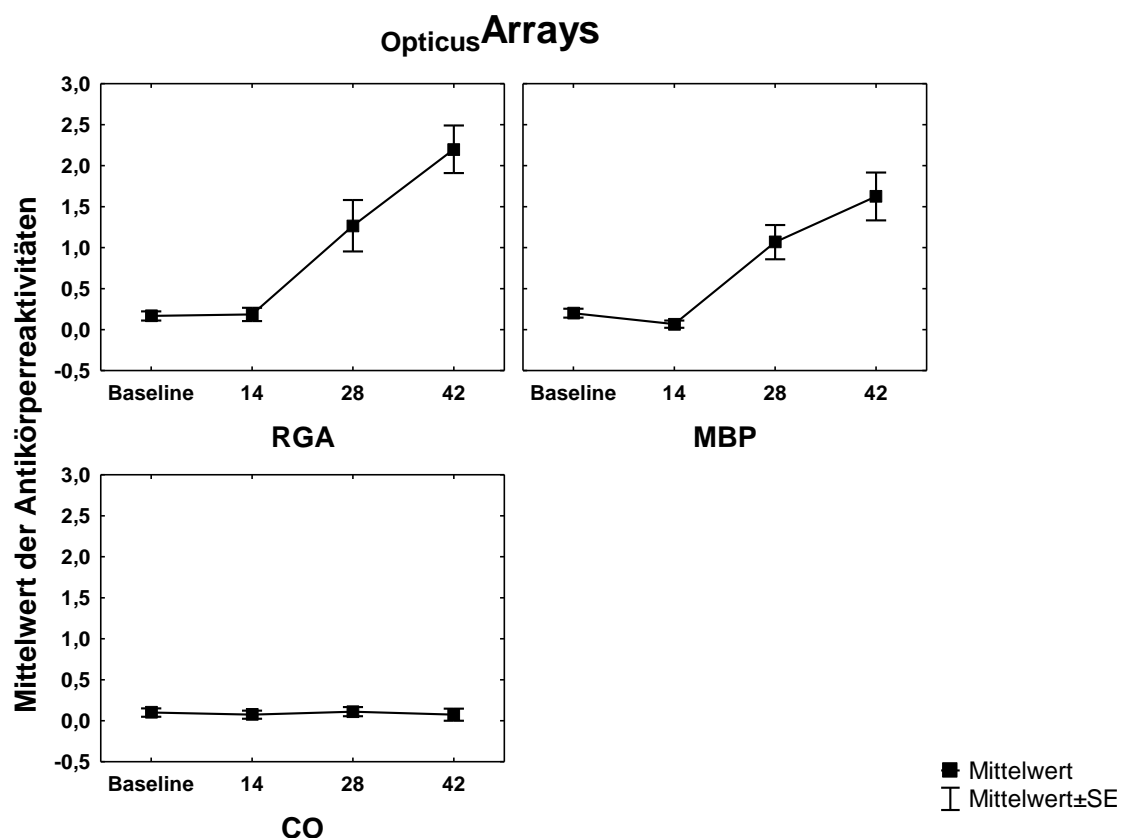
Die Werte dieser Auswertung wurden ebenfalls nachfolgend nochmal grafisch und tabellarisch für die **Retina Arrays** (Abbildung 19), sowie die **Opticus Arrays** (Abbildung 20) aufbereitet. Die inter- und intraspezifischen Auswertungen beider Studien nach Tukey's HSD Post Hoc Test befindet sich im Anhang 4.



### Retina Arrays

Zeitpunkt	CO	MBP	MBP vs CO	RGA	RGA vs CO
Baseline	0,10±0,16	0,13±0,17	0,89	0,20±0,17	0,39
14 Tage n. I.	0,07±0,14	(0,48±0,33) 0,26±0,14	(0,001) 0,13	0,03±0,10	0,91
28 Tage n. I.	0,22±0,23	1,33±0,38	0,0003	1,00±0,76	0,009
42 Tage n. I.	0,29±0,26	2,00±0,50	0,0001	1,40±0,97	0,004

Abbildung 19: Analyse der humoralen IgG Antikörperreaktionen gegen gesundes retinales Gewebe der 42 Tage dauernden Studie. In den Mean Blots sind die Werte der Antikörperreaktivitäten als Mittelwerte±Standardfehler auf der Y-Achse angegeben. Der gruppenspezifische Zeitverlauf ist auf der X-Achse angezeigt. Für die nachfolgende Tabelle wurde die Berechnung der Signifikanzen mit dem Tukey's HSD Post Hoc durchgeführt. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind mit Standardabweichung aufgeführt. Die p-Werte beschreiben die gruppenspezifischen Analysen gegen die Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die umklammerten Zahlen der MBP Gruppe bei 14 Tagen n. I. inkludieren die Werte der verstorbenen MBP Tiere bei der Analyse.

**Opticus Arrays**

Zeitpunkt	CO	MBP	MBP vs CO	RGA	RGA vs CO
Baseline	0,10±0,16	0,20±0,17	0,39	0,16±0,17	0,65
14 Tage n. I.	0,07±0,14	(0,06±0,14) 0,00±0,00	(0,34) 0,74	0,18±0,24	0,40
28 Tage n. I.	0,11±0,16	1,06±0,66	<b>0,018</b>	1,26±0,99	<b>0,004</b>
42 Tage n. I.	0,07±0,22	1,62±0,82	<b>0,0006</b>	2,20±0,91	<b>0,0001</b>

Abbildung 20: Analyse der humoralen IgG Antikörperreaktionen gegen gesundes Sehnervgewebe der 42 Tage dauernden Studie. Die dargestellten Werte auf den Achsen der Mean Blots sind denen der vorhergehenden Abbildungen identisch. Der Vollständigkeit halber wurden die Daten der Analyse mit den verstorbenen MBP-Tieren ebenfalls in Klammern aufgeführt. Richtig und für die Auswertung relevant sind die nicht umklammerten Werte. Vergleichend sind beide Studien bezogen auf die Antikörperreaktionen der MBP immunisierten Tiere bis zum 28. Tag deckungsgleich. Ebenfalls ab dem 28 Tag n. I. sind die humoralen Antikörperreaktionen der immunisierten Tiere signifikant erhöht.



---

## 5 Diskussion

Das primäre Ziel der Dissertation bestand darin, zu zeigen, ob eine systemische Immunisierung mit potentiellen neuronalen Antigenen, wie MBP im EAE Modell oder den Homogenaten (RGA und ONA) im EAG Modell den Untergang von retinalen Ganglienzellen auslösen kann. Der zweite Teil der Arbeit verfolgte das Ziel anhand von (immun-) histologischen Untersuchungen eine pathophysiologische Hypothese zum retinalen Ganglienzellverlust für beide Modelle, mit Schwerpunkt auf dem Experimentellen Autoimmun Glaukom aufzustellen.

### 5.1 Methodische Aspekte

Zuerst werden die Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden kurz erläutert und diskutiert. Anschließend erfolgt die Diskussion der Ergebnisse.

#### 5.1.1 Induktion der neurodegenerativen Prozesse im EAG und EAE Modell

Zur Induktion der EAE in Rodentia stehen mittlerweile diverse Protokolle mit unterschiedlichen Antigenen, Adjuvansen und Applikationsarten zur Verfügung (Swanborg 1995; Mannie, Swanborg et al. 2009). In den Anfängen der EAE wurde mit Homogenaten aus bestimmten Arealen des ZNS oder Rückenmarks immunisiert, was meist mehr oder minder starke Verlaufsformen zu Folge hatte (Levine and Wenk 1961). Je nach Applikationsart, ob subkutan, intradermal oder intraperitoneal, und in Kombination mit Freund's Adjuvans konnten unterschiedlich akute Formen der EAE Progression generiert werden (Levine and Wenk 1961; Levine and Wenk 1965). Auch waren die Dosierungen der Homogenate und später der enzephalogenen Proteine wie MBP, MOG und PLP maßgeblich für den Schweregrad verantwortlich. Die hyperakuten EAE Formen konnten mit MBP und komplettem Freund's Adjuvans durch intradermale Injektionen ausgelöst werden. Hingegen bewirkten intraperitoneale Applikation von Homogenaten anstelle von aufgereinigten Proteinen meist mäßige Verlaufsformen und dienten als Vorlage für das EAG Modell (Levine and Wenk 1961). Trotzdem standen nach einschlägiger Literaturrecherche keine bzw. nur sehr grobe Richtwerte bezüglich Dosierungen und Mischungsverhältnisse für die Induktion zur Verfügung, womit das Immunisierungsschema auf Basis theoretischer Grundlagen ausgearbeitet werden musste. Für das EAG Modell sollten die neurodegenerativen Prozesse langsam und moderat sein, um so möglichst die langsam fortschreitenden Gegebenheiten der Glaukomerkrankung zu simulieren. Aus diesem Grunde wurde auf den Einsatz von kompletten Freund's Adjuvans bewusst verzichtet und dieses durch inkomplettes Freund's

Adjuvans und Pertussis Toxin ersetzt. PTX besitzt zwar ähnliche Effekte wie die abgetöteten Tuberkulosebakterien, nämlich primär die Verstärkung der Immunantwort, birgt allerdings zwei Vorteile. Zum einen konnte mit 3 µg eine vergleichbar geringe Dosis gewählt werden, um damit ebenfalls eine moderate Immunantwort zu modellieren. Zum anderen beschädigt PTX in dieser Konzentration die Blut-Hirn- bzw. Blut-Retina-Schranke nur und zerstört sie nicht vollständig (Ben-Nun, Mendel et al. 1997; Bruckener, el Baya et al. 2003). Die Schwierigkeit im EAG Modell bestand darin, die Schwelle für die Induktion neurodegenerativer Prozesse zwar zu überschreiten, aber trotzdem einen moderaten Verlauf zu gewährleisten. Gerade beim Einsatz von Homogenaten schwanken bei der EAE die Angaben der Dosierungen. Gängig war in den Anfängen Ratten mit bis zu 120 mg Hirnhomogenat und Adjuvans zu immunisieren. Da bei dem Sehnervhomogenat MBP, MOG und PLP enthalten ist und keine akute EAE provoziert werden sollte, wurden nur 8 mg zur Immunisierung eingesetzt. Gleichzeitig sollte ein möglicher RGZ Verlust während der Opticusneuritis bei der MBP indizierten EAE untersucht werden. Die Verlaufsform musste ebenfalls relativ moderat sein, damit die pathologische Bedeutung der MPB-Autoantikörper in Bezug zur Glaukompathogenese gesetzt werden konnte. Trotzdem musste sie stark genug sein, dass sich klinische Symptome ausprägten. Die applizierte Menge an IFA und PTX war zugunsten der Vergleichbarkeit an die Homogenate orientiert und aus Sicht der EAE beifolgend eher niedrig. Demzufolge wurde für MBP das Verhältnis der Dosis angepasst und 1 mg als Antigenmenge gewählt. Wie sich durch einen positiven Enzephalitis-Score bei rund einem Drittel der MBP immunisierten Tieren bestätigte, ist die intraperitoneale Immunisierung von 1 mg MBP in Kombination mit 500 µl IFA und 3 µg PTX ausreichend eine moderate EAE zu induzieren. Um die Antigenhomogenate ONA und RGA anschließen vergleichen zu können und sich herausstellte, dass die Dosis von ONA in den 14 und 28 Tage andauernden Studien ausreichend waren einen signifikanten RGZ Verlust zu indizieren, wurde dieses Format für die Immunisierung mit RGA beibehalten. Da alle Kontrolltiere ebenfalls PTX und IFA in äquivalenter Menge erhalten haben und keine Lähmungserscheinungen zeigten, ist ein positiver Enzephalitis-Score nur auf das Antigen zurück zu führen. Trotzdem kann, allein durch die Beschädigung der BRS und BHS, eine neurodegenerative Wirkung der Adjuvansen in den beiden Modellen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Daher sollte in zukünftigen Studien eine native Kontrollgruppe, welche keinerlei Immunsierungen erhält, mitgeführt werden. Insbesondere wäre durch die Evaluierung der Zelldichte die Frage einer neurodegenerativen Wirkung nach Vergleich der nativen gegen die herkömmliche Kontrollgruppe (mit IFA und PTX) für diese Modelle

beantwortet. Weiter blieb zum Zeitpunkt der in Vivo Phase trotzdem noch unklar wie stark oder schwach die Progression beim Einsatz von 8 mg Homogenat im EAG Modell wirklich ist. Dies konnte erst durch die nachfolgenden Untersuchungen ermittelt werden.

### 5.1.2 Intraokulärer Druck und Funduskopie

Hinsichtlich der Erfassung des IOPs konnte bereits nachweisen werden, dass wiederholte Messungen mit dem Tonopen XL allein nicht zum Untergang retinaler Ganglienzellen bei Lewis Ratten führt. Vielmehr stellt diese Methode ein nicht- invasives, reproduzierbares und gut durchführbares Verfahren dar (Cuny, Joachim et al. 2010). Die in den vorliegenden Studien durchgeführten Wiederholungen der Messungen pro Auge je Zeitpunkt, sowie die verwendete Technik sind nahezu identisch zu den Beschreibungen in der Publikation. Auch sind die Messwerte, der Mittelwert sowie der SE und SD durchaus vergleichbar. Nach statistischer Analyse stellte sich heraus, dass die Immunisierung, sowie die nachfolgende Immunantwort, bei keinem Versuchstier zu einem Anstieg des IOP führten. Vielmehr repräsentierten die Messwerte einen physiologisch normalen IOP mit durchschnittlichen Werten von ca. 13 mmHg (Tabelle 3). Somit kann ein erhöhter IOP als Grundlage für eventuell nachfolgende Schäden der RGZ weitestgehend ausgeschlossen werden.

Ungeklärt bleibt jedoch, ob sich während der Funduskopie der IOP verändert. Die zur Funduskopie nötige Xylazin-Ketamin Narkose selbst senkt in gewissen Dosierungen den intraokulären Druck und könnte somit die Studienergebnisse beeinflussen (Jia, Cepurna et al. 2000). Durch die Tatsache, dass die regelmäßige Funduskopie keine Indizien für neurodegenerative Schädigungen aufwies, ist die Notwendigkeit dieser Untersuchung für nachfolgende Studien sicherlich zu überdenken. Nicht nur der hohe zeitliche Aufwand spielt dabei eine Rolle, vielmehr sollte dann die Möglichkeit der narkosebedingten Druckschwankungen näher untersucht werden. Alternativ könnte die Funduskopie zukünftig mit einer weniger invasiven Isofluroan Maskennarkose durchgeführt werden.

### 5.1.3 Kresylviolettffärbung und Evaluation der retinalen Zelldichte

Mit Hilfe der Kresylviolettffärbung konnte die primäre Fragestellung der Dissertation beantwortet werden. Bereits nach einer Studienlaufzeit von 14 Tagen war bei den beiden Immunisierungsgruppen ONA und MBP im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Verlust von Neuronen in der retinalen Ganglienzellschicht zu verzeichnen. Dieses Ergebnis bestätigte sich bei der 28 Tage andauernden Studie, bei der zusätzlich zu ONA und MBP einer weiteren Gruppe Keratin als nicht neuronales Antigen immunisiert wurde. Dabei zeigte

sich, dass der RGZ Verlust antigenspezifisch sein muss da, neben dem signifikanten Verlust bei der ONA und MBP Gruppe, bei Keratin und der Kontrolle identische Zelldichten zu detektieren waren ( $p=0,8$ ). Auch 42 Tage n.I. konnte ein signifikanter Verlust von Neuronen in der retinalen Ganglienzellschicht für die Antigene RGA und MBP gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 5 A-C).

Die Vermischung der beiden Termini Verlust von „RGZ“ und „Neurone“ in der retinalen Ganglienzellschicht ist an dieser Stelle durchaus beabsichtigt, da bisher nicht bewiesen ist, dass es sich bei den als Neurone gezählten Zellen tatsächlich nur um die RGZ Population handelt. Denn in histologischen Studien der Retina konnte nachweisen werden, dass in der retinalen Ganglienzellschicht neben den retinalen Ganglienzellen ebenfalls eine stabile Subpopulation an Amakrinzellen, die sogenannten „displaced“ Amakrinzellen, vorkommen (Perry 1981). Die displaced Amakrinzellen sind anhand ihrer Morphologie nach Kresylviolett färbung nicht von den RGZ zu unterscheiden und wurden in den vorliegenden Studien als Neurone im Sinne von retinalen Ganglienzellen mitgezählt. Aus diesem Grund sind in den Tabellen zur Zelldichte Neurone/mm<sup>2</sup> und nicht RGZ/mm<sup>2</sup> angegeben. Erst nachdem die retinalen Querschnittspräparat im zweiten Teil der Arbeit auf IgG Antikörperablagerungen und die Verteilung der Mikroglia immunhistologisch untersucht wurden, konnte anhand der Hämalaun oder Hämatoxylin Gegenfärbung die Anzahl an Amakrinzellen in der inneren Körnerschicht durch stichprobenartiges Auszählen kalkuliert werden. Dabei konnten keine gruppenspezifischen Variationen der Zellzahlen festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich bei keiner Studie Indizien für pathophysiologische Veränderungen in dieser, sowie in den darunterliegenden Schichten. In keiner Studiengruppe waren weder IgG Ablagerungen oder Caspase<sup>+</sup> Zellen noch aktivierte Mikroglia in der inneren Körnerschicht zu detektieren. Unter der Annahme, dass die Amakrinzellen nicht von den neurodegenerativen Vorgängen nach Immunisierung betroffen sind, lässt dies den Schluss zu, dass es sich bei dem nachgewiesenen Zelluntergang um retinale Ganglienzellen handelt. Viel mehr scheinen die Amakrinzellen sogar äußerst resistent gegenüber neurodegenerativen Prozessen zu sein. Im Tiermodell wurde zwar nach laser-induzierter IOP Erhöhung oder durch Sehnervtransektion ein massiver Ganglienzellverlust ausgelöst, aber es konnten nur minimale Veränderungen in der Amakrinzellschicht beobachtet werden (Kielczewski, Pease et al. 2005). Demnach führte das Mitzählen der Amakrinzellen in den EAG Studien nicht zu falsch-positiven Resultaten sondern eher zur Überlagerung des tatsächlichen RGZ Verlustes.

Beim Versuch die Ganglienzelldichten der drei Studien in einen longitudinalen Verlauf zu bringen, fiel auf, dass bei der 42 Tage andauernde Studie die Zelldichten aller Gruppen höher waren als bei den kürzeren Studien. Zuerst wurden das juvenile Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Immunisierung und die dadurch resultierende Heterogenität der Entwicklung diskutiert. Doch nach Studium der Arbeiten von Gellirch et al., sowie deren angeführte Literaturstellen, fanden sich Indizien für eine stärkere Schrumpfung der Flatmounts nach Kresylviolett-Färbung, die scheinbar nicht nur vom Alter des Versuchstieres abhängig ist, sondern möglicherweise auch mit der Stärke des RGZ Verlusts korreliert (Gellirch and Gellirch 1996). Interessanter Weise bestätigten sich die Vermutungen bei einer nachfolgenden EAG Studie. Hier wurde die Fläche der Flatmounts vor und nach Kresylviolett-Färbung gemessen und die prozentuale Schrumpfung nachfolgend mit den Zelldichten verglichen. Es stellte sich heraus, dass in Abhängigkeit vom Alter tatsächlich Flatmounts mit größerem RGZ Verlust stärker schrumpfen. Dies bedeutet, dass der RGZ Verlust in den immunisierten Gruppen der 42 Tage andauernden Studie theoretisch höher sein muss. Weiter muss in zukünftigen Studien die individuellen Schrumpfungen gemessen werden und daraus einen gruppenspezifischen Faktor für die Kalkulation der absoluten Zellzahlen, sowie der Zelldichten berechnet werden. Da keine Daten zur Größe der Flatmounts bei den hier vorliegenden Studien erhoben wurden, kann im Nachhinein keine Verlaufsanalyse der drei Studien erhoben werden. Zu berücksichtigen bleibt außerdem noch der Einsatz der Booster-Immunisierung (vier Wochen nach Grundimmunisierung) bei der 42 Tage andauernden Studie. Eine Erhöhung der retinalen Permeabilität aufgrund der erneuten Applikation von PTX ist denkbar, welcher gekoppelt mit dem RGZ Verlust das osmotische Potential der Retinae nachhaltig beeinflussen könnte und somit die Flatmounts stärker schrumpfen.

Für ophthalmologische Tiermodelle stehen weitere Färbemethoden zur Evaluierung der RGZ Dichte zur Verfügung, welche nicht von den methodischen Fehlern der Kresylviolett-Färbung geprägt sind. Zu nennen sind die immunhistologischen Verfahren durch die Brn-3 Färbung, bei der spezifisch Kernproteine der retinalen Ganglienzellen markieren werden, aber auch die Marker Thy1 und neuronales  $\beta$ -Tubulin (Kwong, Caprioli et al. 2010). Mit der Brn-3 Färbung wurde erstmals der Ganglienzellverlust nach HSP60 und 27 Immunisierung nachgewiesen (Wax, Tezel et al. 2006). Thy1 wird seit einiger Zeit erfolgreich als transgenes Markersystem für die Expression von fluoreszierenden Proteinen in intakten retinalen Ganglienzellen verwendet (Leung and Weinreb 2009). Hierdurch ist die Beobachtung der RGZ Populationen in longitudinalen Studien möglich geworden. Auch retrograde

Markierungstechniken werden häufig angewendet, dabei wird der Farbstoff direkt in den N. opticus appliziert und wandert anschließend ausschließlich in intakte RGZ ein (Shindler, Guan et al. 2006; Shindler, Ventura et al. 2008). Auf den ersten Blick scheinen die immunhistologischen Methoden diverse Vorteile bei der Quantifizierung zu bieten. In der Tat lassen sich über automatisierte Verfahren an den Fluoreszenzmikroskopen oder durch anderen Detektionssysteme genaue Kartierungen des RGZ Verlusts in der Retina anfertigen. Allerdings sind die technischen Verfahren, sowie die immunhistologische Methoden sehr anspruchsvoll und mit hohen Risiken, z.B. durch Verlust oder Zerstörung der Präparate, behaftet. Darüber hinaus besitzen die Marker durchaus Schwächen und werden kontrovers diskutiert. Bei Brn-3 finden sich drei Subtypen (Brn-3a, Brn-3b und Brn-3c), die jeweils nur für eine Subpopulation der RGZ spezifisch sind. Maximal können nur 80% der RGZ detektiert werden (Xiang, Zhou et al. 1995; Leahy, Ornberg et al. 2004). Thy1 kann unter gewissen Umständen vermindert vorliegen und somit die Quantifizierung verzerren (Huang, Fileta et al. 2006). Die Vorteile der Kresylviolett-färbung liegen in der einfachen Durchführung mit vergleichbar geringem Risiko und im anschließenden Studium der Zellmorphologie. Damit besteht die Möglichkeit der Diskriminierung verschiedener Zelltypen, wobei inflammatorische Zellen ohne zusätzliche Färbung detektiert werden können. Die Evaluation und Diskriminierung kann jedoch nicht ohne weiteres automatisiert werden und ist auf manuellem Wege sehr zeitaufwendig. Mittlerweile sind in unserer Arbeitsgruppe die morphologischen Kriterien zur Zelldifferenzierung nach Kresylviolett-färbung erweitert worden. Anhand der Färbeintensität und des Musters, sowie der Größe können nicht nur Neurone und Glia unterschieden werden, sondern ebenfalls die magnozellulären Ganglienzellen reproduzierbar identifiziert werden. Erste Analysen neu ausgezählter Stichproben aus der 42 Tage dauernden Studie deuten an, dass die Population der magnozellulären Ganglienzellen gruppenspezifisch stabil zu sein scheint. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass bevorzugt die parvozellulären Ganglienzellen im EAG Modell zu Grunde gehen.

Denkbar wäre in Zukunft die Kresylviolett-färbung von Flatmounts, in ähnlicher Weise wie mit den Markern GFAP oder Iba1, mit beispielsweise der Detektion von Brn-3a zu kombinieren. Damit könnte zweifelsfrei der spezifische Ganglienzellverlust anhand der immunhistochemischen Brn-Färbung quantifiziert werden und ermöglicht gleichzeitig das morphologische Studium durch Kresylviolett.

---

#### 5.1.4 Histologie

Zum Nachweis einer Demyelinisierung in den Sehnerven wurde die Luxol Fast Blue Färbung eingesetzt. In allen transversalen Sehnervenschnitten konnte der Grad der Demyelinisierung ermittelt werden. Die Färbemuster waren vergleichbar mit den histopathologischen Untersuchungen zur EAE, welche von Shindler et al. durchgeführt wurden und bieten ein sicheres und reproduzierbares Verfahren.

Ebenfalls methodisch zufriedenstellend war die Qualität der immunhistochemischen Färbungen und der Immunfluoreszenzmikroskopie. Dies war zunächst mit der Problematik verbunden, dass alle immunhistologischen Färbungen in formaldehydfixierten und paraffinierten Geweben reproduzierbar durchgeführt werden mussten. Einige der verwendeten Primärantikörper waren von seitens der Hersteller bis dato nicht für den Einsatz in paraffinfixierten Schnitten getestet worden und entsprechende Referenzen, gerade im Bezug auf okuläre Gewebe, nicht oder nur sporadisch existent. Zunächst galt es also, allgemeine Vorschriften für formaldehydfixierte und paraffinierte Gewebe mit verschiedene Antigendemaskierungen und Blocklösung anhand von positiven Kontrollgewebe zu adaptieren und zu testen. Erst nachdem zweifelsfrei fest stand, dass die Methoden keine falsch-positiven Resultate lieferten und qualitativ einen gewissen Standard aufwiesen, wurden Schnitte aus Gewebeproben von Studientieren angefertigt und gefärbt. Die Detektion der IgM und IgG Autoantikörper gelang mehrfach unabhängig voneinander in jeweils abfolgenden Schnitten durch den Sehnervenkopf, mittels verschiedene Antikörper und unterschiedliche Färbemethoden. Für die morphologische Begutachtung und der Quantifizierung waren die Färbemethode und die zur Verfügung stehende Mikroskopie ausreichend. Jedoch konnte nicht einwandfrei geklärt werden, welche Strukturen im Einzelnen zu den Epitopen der Autoantikörperablagerungen gehören. Denn einige der Ablagerungen suggerieren eine membranständige Lokalisation an der RGZ und andere, liegen unmittelbar um den Zellkern intrazellulär vor. Um der Frage auf den Grund zu gehen müsste die hochauflösende konfokale Mikroskopie unter Verwendung von Membranmarkern wie Phalloidin oder anderen Strukturproteinen retinaler Ganglienzellen wie z.B. neuronales  $\beta$ -Tubulin erweitert werden. Die ultrastrukturellen Gegebenheiten können jedoch nur die Elektronenmikroskopie aufklären.

Für die Detektion von Mikroglia durch Iba1 konnte auf etablierte Methoden zurück gegriffen werden, wobei die methodische Vorgehensweise weitgehend der Beschreibung des Herstellers folgte. Lediglich die optimale Konzentration der Antikörper bedurfte, wie bei allen anderen verwendeten Antikörpern auch, zunächst der Testung durch Verdünnungsreihen.

Ebenfalls problemlos verlief die Klassifizierung in aktive und ramifizierte Mikroglia, wobei in dem dicht gepackten Sehnervgewebe die IF Methode besser geeignet war als die IHC mit DAB Färbung. Angedacht ist es zusätzlich den Marker ED 1 (CD 68) in der Doppelfärbung mit Iba1 einzusetzen, da dieser nur in phagozytotischen Makrophagen exprimiert wird (Kunisch, Fuhrmann et al. 2004; Gottfried, Kunz-Schughart et al. 2008). Somit könnten die Verteilungen von cytotoxischen und regulatorischen Mikroglia und phagozytierenden Mikroglia zukünftig untersucht werden.

Die Darstellung und Quantifizierung der Caspasen 3, 8 und 9 sind ebenfalls gelungen, wobei die Methodik trotz reproduzierbaren Ergebnissen Potential zur Verbesserung hat. So war die Fluoreszenz nach Zweitantikörperinkubation aus bisher ungeklärter Ursache relativ kurzlebig und von schwacher Intensität. Der Sekundärantikörper konnte als Fehlerquelle ausgeschlossen werden, da dieser in gleicher Verdünnung erfolgreich bei den anderen Markern eingesetzt wurde und dort immer verlässliche Ergebnisse mit starken Intensitäten brachte. Gleichfalls waren die Methodik der Antigendemaskierung und die Permeabelisierung des Gewebes standardisiert und ausreichend um selbst die intrazellulären Proteine wie z.B. GFAP immunhistochemisch zu detektieren. Die Ursache könnte auf eine scheinbar niedrige Menge an Caspase Proteinen hindeuten oder ist auf die Problematik der Antikörpergängigkeit bei vollfixierten Proben zurückzuführen. Nach diversen Modifikationen und Testverfahren der hier beschriebenen Methode war die Detektion der drei Caspasen letztendlich in gleichbleibender Qualität reproduzierbar durchzuführen. Als entscheidende Nachteile müssen jedoch die Notwendigkeit einer großen Vergrößerung, die digitale Verstärkung des Signales, sowie die Quantifizierung während der Mikroskopie mittels dem 0-3 Schema angeführt werden. Alternativ hätte die Quantifizierung der Caspase meditierten Apoptose mit Hilfe des Apoptose Index erfolgen können. Dabei werden die Anzahl der Caspase<sup>+</sup> Zellen mit dem Faktor 100 multipliziert und das Ergebnis folgend durch die Anzahl aller Zellkerne im untersuchten Areal dividiert (Duan, Garner et al. 2003). Dieses Verfahren setzt voraus, dass die Detektion der Caspase eindeutig ist und das zu untersuchende Areal entsprechend groß ist. Bezogen auf die Retina als Untersuchungsobjekt ist dieses Verfahren nur nach Etablierung einer IHC Methode mit DAB Färbung und gutem Kontrast bei niedriger Vergrößerung (10-20x) durchführbar.

#### 5.1.5 Detektion der IgG Antikörperreaktionen gegen okuläres Gewebe

Streng genommen ist die Bezeichnung **Retina Arrays** und **Opticus Arrays** nicht zulässig, das es sich nicht, wie bei den klassischen Tissue Arrays, um unterschiedliche Gewebeproben



handelt. Untersucht wurden zwar vornehmlich einzelne Bereich, speziell die Retina und der Sehnerv, aber aufgrund der Verwendung des gesamten Bulbus bestand die Möglichkeit gleichfalls unspezifische IgG Antikörperreaktionen zu erfassen. Vor allem war interessant, dass keine autoreaktiven IgG Antikörper gegen Gewebe des Kammerwinkels im Serum der immunisierten Tiere existieren und somit die Funktion des Trabekelmaschenwerkes, zumindest auf die Antikörper bezogen, nicht beeinträchtigt gewesen war. Auch zeigten sich in den Vorderabschnitten und den okulären Bindegewebe keinerlei Reaktionen. Dies korreliert mit den Daten der IgG Antikörperablagerung, welche in den Retinae und Sehnerven der immunisierten Tiere vorgefunden wurden. Hier konnten ebenfalls nur Antikörperreaktionen gegen Bestandteile der retinalen Ganglienzellschicht und der Axone im N. opticus detektiert werden, aber nicht gegen weitere okuläre Strukturen. Somit eignet sich der Ansatz generell um die Serumantikörperreaktionen gegen histologische Ganzpräparate, die als potentielle Zielorgane in Frage kommen, zu untersuchen und selektiv zu begutachten. Hintergrund zur Wahl dieses Verfahrens war es die Reaktivität der IgG Autoantikörper im Verlauf zu analysieren. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die autoreaktiven IgG Antikörper erst nach der Immunisierung entstehen und zum andern, dass sie potentiell, funktionell und selektiv die neuronalen Strukturen im Zielorgan binden können. Unabhängig welches neuronale Antigen verwendet wurde, konnte in zwei Studien die Zunahme der IgG Autoantikörper gegen okuläre Strukturen in Abhängigkeit der Zeit nachgewiesen werden. In beiden Studien war die humorale IgG Autoreaktivität 28 Tagen n.I. in den RGA, ONA und MBP immunisierten Tieren signifikant erhöht. Damit ist eindeutig der Beweis erbracht, dass das EAG Modell ebenso funktionell ist wie das der EAE, obwohl beim EAG Modell die klinischen EAE Anzeichen ausbleiben.

An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass die Antikörperreaktionen der MBP immunisierten Tiere äußerst interessant sind. Wie eingangs erwähnt sind die Axone der RGZ erst nach Passage der Lamina cribosa vollständig myelinisiert. Folglich sollte sich die Serumreaktivität besonders gegen die **Opticus Arrays** richten, was sich auch herausstellte. Nach Begutachtung der **Retina Arrays** waren jedoch, beginnend am 14. Tag n. I., ebenfalls deutliche Reaktionen in Seren der MBP Gruppe nachzuweisen, welche die Signifikanzschwelle nach 28 Tagen überschritten und sogar im Verlauf weiter anstiegen. Dies bedeutet, dass wie in der autoimmunen Glaukompathogenese vermutet, einige der Antikörperreaktionen im EAG Modell epiphänomenalen Ursprungs sein könnten. Weiter deckt sich dieses Ergebnis mit Beobachtungen aus dem EAE Modell, bei dem diverse IgG Antikörper nicht nur alleinig gegen Bestandteile Myelinscheide gebildet werden, obwohl mit

nur einem Antigen induziert wurde (Bischof, Bins et al. 2004; Zephir, Almeras et al. 2006). Auch ist auffällig, dass es gut 4 Wochen dauert, bis die IgG Antikörperreaktionen ihre Signifikanzgrenze erreichen. Hingegen tritt der signifikante Verlust von RGZ aber schon um den 14. Tag nach der Immunisierung ein. Bei der MBP immunisierten Gruppe können die IgG Antikörperreaktionen gegen retinale Strukturen als sekundäres Ereignis der Immunantwort interpretiert werden, die möglicherweise aus dem retinalen Ganglienzellverlust resultieren. Umgekehrt führt die Immunisierung des Antigens ONA bereits nach 14 Tagen zu signifikant erhöhten IgG Antikörperreaktionen sowohl gegen retinales, als auch Sehnervgewebe. Zurückzuführen ist dies auf die Zusammensetzung des Antigenhomogenates. Im Sehnerven sind alle Strukturproteine der Myelinscheide enthalten, wobei jedes einzeln potenziell einen Ganglienzellverlust auslösen kann und so gut wie alle weiteren glaukomassoziierten Antigene vertreten. Einige davon müssen erhebliches immunogenes (aber eher pathogenes) Potential besitzen und vor allem dem Immunsystem als Antigene bekannt sein. Denn nach Immunisierung oder Infektion mit einem unbekanntem Antigen ist die Produktion von spezifischen IgG Antikörper nicht innerhalb von 14 Tagen möglich (Janeway, Travers et al. 2001). Hinzu kommt der Einsatz von Freund's Adjuvans in beiden Modellen, welches eine verzögerte Freisetzung des Antigens bedingt. Daher muss es, neben der normalen IgG Bildung durch das adaptive Immunsystem, eine schnelle IgG Antwort über Gedächtniszellen und bekannten Antigenen geben. Weiteres Indiz für eine selektive und zeitlich versetzte Immunantwort ist das Auftreten relativ geringer Mengen an IgM Autoantikörperablagerungen in den Retinae der ONA immunisierten Tieren nach 14 Tagen. Gleichzeitig konnten erstmals 8 Tage n.l. sowie 14 und 22 n.l. vereinzelt, aber deutliche IgG Autoantikörperablagerungen beobachtet werden.

Nichtsdestotrotz bergen diese Verfahren diverse Nachteile und Möglichkeiten zur Verbesserung. Es ist aufgrund der mikroskopischen Auflösung und der teilweise diffusen DAB Färbung nicht möglich die Epitope der IgG Antikörper zu untersuchen, um daraus einen Pathomechanismus und neue Antigene ableiten zu können. Problematisch ist gleichfalls die manuelle Quantifizierung der DAB Färbungen. Zur besseren Quantifizierung und zum Studium der Epitope kann die Umstellung auf fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper Abhilfe schaffen. Zum einen könnte zur Quantifizierung der Vergleich von Intensitäten verwendet werden und zum anderen müsste sich durch die IF der Kontrast bei gleichzeitiger Reduktion der unspezifischen Färbung verbessern. Die Problematik der kausalen und epiphänomenalen autoreaktiven IgG Antikörper besteht aber nach wie vor und ist mit diesem Verfahren auch nicht zu lösen.

---

## 5.2 Pathophysiologische Hypothese zum Antikörper-vermittelten Ganglienzelltod

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die systemische Induktion autoimmuner Prozesse mit entweder komplexen Homogenaten bestehend aus opticus-assoziierten Antigenen (ONA) oder retinaler Ganglienzellschicht assoziierten Antigenen (RGA) und dem Myelin basisches Protein (MBP) in Kombination mit Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin zum Untergang retinaler Ganglienzellen führt. In den Modellen bleibt der intraokuläre Druck im physiologischem Bereich unbeeinflusst, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der RGZ Verlust druckunabhängig ist.

Der RGZ Verlust ist hingegen abhängig vom Antigen, da eine Immunisierung mit Keratin entsprechend keinen Effekt zeigte. Dabei bleibt allerdings nicht auszuschließen, dass die Immunisierung mit Keratin möglicherweise keine Immunantwort, einhergehend mit der Bildung von IgG Antikörpern, auslöst. Jedoch zeigen Studien zur rheumatoiden Arthritis (RA) das pathologische Potential von Anti-Keratin-Antikörpern, bei denen maßgeblich das zytokeratinische Protein Filaggrin als Epitop fungiert (Simon, Girbal et al. 1993; van Venrooij and Pruijn 2000). Darüber hinaus konnten bereits in den 80iger Jahren natürlich vorkommende Anti-Keratin-Antikörper auch gegen epidermales Keratin nachgewiesen werden und später mit der RA in Verbindung gebracht werden (Vincent, Serre et al. 1991; Borg, Dawes et al. 1993; Borg, Nixon et al. 1994). Damit scheint Keratin zu mindestens immunogen wirksam zu sein, doch konnte das Vorhandensein von humoralen Antikörpern gegen das verwendete Keratin im EAG Modell bisher noch nicht bestätigt werden. Um eine pathogene Wirkung im Sinne der RA nach Immunisierung mit Keratin zu beweisen, müssten im nächsten Schritt Autoantikörper gegen Filaggrin detektiert werden. Das verwendete Keratin stammte von bovinen Hufen, wobei Filaggrin bei den Verhornungsprozessen einen strukturellen Bestandteil darstellt und müsste somit theoretisch eine Immunreaktion provozieren.

### 5.2.1 Experimentelles Autoimmune Glaukom

Neben dem Verlust von retinalen Ganglienzellen im EAG Modell konnte die Akkumulation retinaler Antikörperablagerungen der Klassen IgM und IgG nachgewiesen werden (Kapitel 4.4.2). IgG Antikörperablagerungen traten erstmals 8 Tage nach Immunisierung mit ONA auf. 14 Tage nach Immunisierung waren beide Immunglobulinklassen in ungefähr gleicher Menge zu detektieren. Zu späteren Zeitpunkten konnte IgM nicht mehr nachgewiesen werden, während die Akkumulation von IgG zunahm. Bei Unterscheidung der IgG Subklassen lag,

neben basalem IgG<sub>2a</sub> und IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>1</sub> als hauptsächlicher Bestandteil der Autoantikörperablagerung in der retinalen Ganglienzellschicht vor. Funktionell betrachtet ist das Auftreten von IgG<sub>1</sub> stimmig, da IgG<sub>1</sub> vorwiegend mit der Immunantwort auf antigene Proteine verknüpft wird und maßgeblich opsonierende Eigenschaften besitzt (Medgyesi, Fust et al. 1978; Schroeder and Cavacini 2010). Auffällig an dieser Verlaufsstudie und Indiz für eine primäre Schädigung durch die IgG Autoantikörper, war das frühe Auftreten von intrazellulärem IgG in der Ganglienzellschicht. Bereits 8 Tage n.I. ließen sich IgG Ablagerungen mikroskopisch nachweisen, wohingegen IgM erst am 14. Tag verlässlich detektierbar war. Zusammen mit den Erkenntnissen der erhöhten IgG Serumreaktivität ONA immunisierter Tiere gegen gesundes retinale Gewebe (Kapitel 4.5.2 und 5.1.5) festigt dies die Tatsache, dass einige der Antigene in den Homogenaten hoch immunogen sind und dem Immunsystem bereits bekannt sein müssen. Potentiell wirkt ONA dabei stärker als RGA, was allein anhand der IgG Serumreaktivitäten abzulesen ist. Zur Klärung, um welche Antigene es sich handelt und ob nur eines oder mehrere existieren, kann nur ein de novo Screening Ansatz beitragen. Unter Umständen provozieren mehrere Antigene Gedächtniszellen mit dem Ergebnis einer primären autoreaktiven IgG Antikörpersezerneierung. Das Autoantikörperrepertoire wird dann allmählich durch die allgemeine Immunantwort auf die nicht bekannten Antigene der Homogenate ergänzt. Zwangsläufig stellt sich nun die Frage wie die Autoantikörper einen Schaden induzieren? Einigen der glaukomassoziierten Antikörper wie z.B. der neuronensepezifische  $\gamma$ -Enolase oder HSP27 wurden bereits kausale neurodegenerative Fähigkeiten zugesprochen. Tezel et al. konnte für anti-HSP27 Antikörper in vitro zeigen, dass sie von retinalen Zellen internalisiert werden und die Apoptose dieser Zellen via Caspase 3 und Caspase 8 auslösen (Tezel and Wax 2000). Die intravitreale Injektion von Antikörpern gegen die neuronspezifische  $\gamma$ -Enolase in vivo bedingte ebenfalls eine stark erhöhte Apoptoserate der RGZ (Maruyama, Maeda et al. 2002). Auch im EAG Modell stehen die IgG Autoantikörperablagerungen im direkten Zusammenhang mit der Caspasekaskade. Bereits 8 Tage nach Immunisierung waren, in der ONA immunisierten Gruppe sowie in der Kontrolle, Zellen der retinalen Ganglienzellschicht Caspase 3 positiv (Kapitel 4.4.2). Während sich die Caspaseaktivität der Kontrollgruppe im Verlauf auf einem minimalen Level einpendelte, stieg das der ONA Gruppe kontinuierlich und signifikant an. Des Weiteren konnten bei apoptotischen Zellen Kollokalisierungen von Caspase 3 und IgG Autoantikörperablagerungen nachgewiesen werden (Abbildung 12). Damit ist klar, dass die Gabe von PTX zumindest initial die BRS schädigt und zum Verlust von RGZ führt. In den Kontrollgruppen wird angenommen, dass der BRS Schaden durch kurzzeitige Schwellung

der Astroglia und Müller-Zellen kompensiert und anschließend repariert wird (Stahl 2010). Anders als bei den immunisierten Gruppen wird in den Kontrollen keine anhaltende reaktive Gliose initiiert (Gramlich, Joachim et al. 2009). Noch nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe lassen ebenfalls, nach immunoproteochemische Untersuchungen von Liquor, Kammerwasser und Serumproben, eine dauerhafte Leckage der BRS in den immunisierten Gruppen vermuten. Weiter gibt es deutliche Hinweise darauf, dass die verwendete Dosis an PTX nicht ausreicht, um einen irreversiblen Schaden der BHS trotz Antigengabe auszulösen (Stahl 2010). Die Annahme dieser Hypothesen steht dabei nicht mit den histologischen Untersuchungen der Gehirnschnitte im Widerspruch.

Neben der signifikant erhöhten Caspase 3 Aktivität konnte in der RGA Gruppe zusätzlich ein signifikant erhöhtes Level der Initialcaspase 8 nachgewiesen werden. Die Initiatorcaspase 9 war hingegen nicht erhöht und nur schwach zu detektieren (Kapitel 4.4.2). Damit ist die Apoptose der RGZ weitestgehend über den extrinsischen Weg vermittelt, wobei oxidativer Stress nur eine untergeordnete Rolle in diesem Modell zu spielen scheint. Die extrinsische Caspasekaskade kann durch die Aktivierung der TNF oder Fas Todesrezeptoren via Liganden-Bindung induziert werden. Nach Interaktion der zytoplasmatischen Todesrezeptordomänen mit Adaptorproteinen und Todeseffektordomänen wird die Initialcaspase 8 aktiviert. Diese wiederum spalten die nachgeschalteten inaktiven Pro-Caspasen zu Effektorcaspasen wie beispielsweise Caspase 3. Die Effektorcaspasen zerstören das zytoskelettale Aktin und rekrutieren Nukleasen, welche die Degradation der DNA bewirken (Salvesen 2002). Letztendlich münden die Vorgänge als Kollektiv im geordneten Zelltod. Interessanter Weise können die Untersuchungen von anti-HSP-Antikörper bedingten proapoptotischen Wirkungen auf RGZ mit der Caspasekaskade in Zusammenhang gebracht werden. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass HSPs in Astrozyten und in Neuronen nach neuronaler Exzitotoxizität verstärkt exprimiert werden und dadurch zum Überleben der Zellen beitragen (Sanz, Acarin et al. 2001; Acarin, Paris et al. 2002; Jeon, Park et al. 2004). HSP27 wurde in Kolokalisation mit der gespaltenen Caspase 3 gefunden, wobei HSP27 die proapoptotische Funktion der Caspase 3, aber auch die der Initiatorcaspasen blockieren kann (Pandey, Farber et al. 2000; Villapol, Acarin et al. 2008; Paul, Simon et al. 2010). Da nach Tezel et al. die anti-HSP-Antikörper internalisiert vorliegen, wäre es denkbar, dass sie die HSPs binden und die blockierende Wirkung auf die Caspase demzufolge aufgehoben wäre. Gleichfalls sind die Antikörper extrazellulär wirksam. Neben der Komplementaktivierung konnte für IgG<sub>1</sub> aber auch für IgG<sub>2a-b</sub> gezeigt werden, dass diese nach Antigen-Antikörper Bindung von Makrophagen und Mikroglia über deren Fc-Rezeptoren

erkannt werden (Boltz-Nitulescu, Bazin et al. 1981; Marta, Bansal et al. 2008). Dieser Mechanismus wird antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC: *antibody dependent cellular cytotoxicity*) genannt und wird im ZNS von Mikrogliazellen bewerkstelligt (Sutter, Hekmat et al. 1991; Ulvestad, Williams et al. 1994). Die zytotoxische Eigenschaft ist durch mehrere Chemokine in einer lokalen Immunmodulation vermittelt, deren Stärke von der Anzahl an Effektorzellen (Mikroglia) abhängt. Neben zahlreichen Interleukinen werden hauptsächlich TNF- $\alpha$  und FasLigand sezerniert (Badie, Schartner et al. 2001; Kim and de Vellis 2005). Die letzten beiden initiieren, wie oben beschrieben, die Apoptose über die extrinsische Caspasekaskade.

In der Tat waren aktivierte Mikroglia ebenfalls in der Ganglienzellschicht anzutreffen. Nach Doppelfärbung von Antikörperablagerungen und Mikroglia mittels IF zeigten sich sowohl Koloalisationen als auch tendenziell mehrere Mikrogliazellen um die IgG Ablagerungen herum (Abbildung 15). Pathomechanisch kann den Mikroglia entweder zytotoxische über die ACDD oder makrophagische Eigenschaften zugesprochen werden, da in Zentrum einer solchen Akkumulation überwiegend fragmentierte Zellkerne zu finden waren. Wie in Abbildung 16 war diese Konstellation mittels konfokaler Mikroskopie zu beobachten, wobei die Mikroglia förmlich die IgG Ablagerung mit ihren plasmatischen Ausläufern umschließt. Der Zellkern innerhalb der Ablagerung ist bereits in mehrere Bruchstücke zerfallen. Beides deutet darauf hin, dass die Mikroglia eher zytotoxisch aktiv war. Weiter sind bei der Beseitigung von apoptotischen Zellen meistens mehrere Mikrogliazellen phagozytotisch aktiv. Hier war jedoch nur eine einzelne Mikorglia zu observieren. In den RGA immunisierten Tieren müsste anhand des Verteilungsmusters und dem Verhältnis von Mikroglia (2,91 aktivierte Mikroglia/mm) und Ablagerungen (2,98 IgG Ablagerungen/mm) die IgG Ablagerung theoretisch zeitlich früher auftreten. Ein Anhaltspunkt dafür ist die um beinahe 50% gesteigerte Mikrogliapopulation der RGA immunisierten Gruppe (Tabelle 3). Die Zunahme ist entweder durch Proliferation residierender Mikroglia oder durch eine Invasion nach anhaltendem Stimulus zu erklären. Joly et al. konnten den Übertritt von hämatopoetischen Mikroglia in die Retina aus dem Sehnervenkopf und durch den Ziliarkörper im Tiermodell der Photorezeptordegeneration verfolgen. Zusammen mit aktivierten Mikroglia der residierenden Fraktion wandern sie in die Photorezeptorschicht ein, um dort die geschädigten Zellen kooperativ zu phagozytieren (Joly, Francke et al. 2009). Die Abfolge zwischen neurodegenerativem Ereignis und Invasion oder Aktivierung ist zeitlich um rund 3 bis 6 Tage versetzt. Im EAG Modell sind ebenfalls epiretinal aktivierte Mikroglia zu finden und lassen zumindest eine moderate Invasion vermuten. Die Antikörperablagerung bedingt dabei die

primäre Schädigung der RGZ und ist zugleich opsonierend wirksam. Denn die Mikrogliaaktivierung ist ebenso antigenspezifisch wie der RGZ Verlust, da beides nur unter der Voraussetzung einer zerstörten BRS (wie bei der Kontrollgruppe) nicht auftritt. Bislang existieren noch keine Daten zur Verteilung der Mikroglia in der longitudinalen Studie und ebenfalls wurde die Wirkung von RGA noch nicht in einer kürzeren Studie untersucht, sodass der endgültige Beweis noch nicht erbracht werden kann.

Der Verlust von retinalen Ganglienzellen im EAG Modell ist von einer Demyelinisierung des Sehnervens, unabhängig welches der beiden Homogenate verwendet wurde, begleitet. Bei Verwendung von Keratin hingegen tritt keine Demyelinisierung auf (Abbildung 7). Bereits 14 Tage nach Immunisierung mit ONA konnten erste Anzeichen einer Demyelinisierung einhergehend mit Alterationen der Myelinorganisation und Ödembildungen beobachtet werden. Ebenfalls waren einige wenige Infiltrate zu sehen, die jedoch anhand der H&E Färbung weder T-Zellen noch den Mikroglia zugeordnet werden können. Es handelte sich jedoch nicht um eine massive Infiltration, wie sie bei der PLP induzierten Opticusneuritis von Shindler et al. vorgelegen hat (Shindler, Guan et al. 2006; Shindler, Ventura et al. 2008). Die Infiltrate waren 28 Tage n.I. bei jetzt signifikanter Demyelinisierung, nicht mehr zu detektieren. Bei der RGA Gruppe 42 Tage n.I. war die Demyelinisierung ebenfalls signifikant, allerdings war der Grad verglichen mit der ONA Gruppe bei 28 Tagen nicht derartig akut. Dies deutet darauf hin, dass ONA aufgrund seiner Antigenzusammensetzung mehr Potential zur Sehnervschädigung aufweist als RGA und im Bezug auf die Demyelinisierung, wie später erläutert wird, pathomechanische Aspekte der MBP induzierten Opticusneuritis aufweist. Unterstützt wird diese Annahme erneut durch die in Kapitel 5.1.5 beschriebenen Observationen der erhöhten Serumreaktivität ONA immunisierter Tiere gegen gesundes Sehnervgewebe. Nach Immunisierung mit RGA ist die Demyelinisierung vielmehr als Folge des RGZ Verlustes anzusehen, bei dem die Myelinscheiden apoptotischer oder toter Ganglienzellen als sekundärer Prozess allmählich von Mikroglia abgebaut werden. Auf den ersten Blick scheint die Demyelinisierung verglichen mit der Anzahl an aktiven Mikroglia im Widerspruch zu stehen. Bei dem Grad wäre zunächst eine deutlich höhere Aktivierung der Mikroglia zu erwarten gewesen. Dies relativiert sich allerdings vor der Tatsache, dass hier kein massiver Verlust von RGZ unmittelbar vor dem Untersuchungszeitpunkt vorliegt, sondern vielmehr ein langsam progredienter Untergang. Demnach sollte der Abbau der Myelinscheide ebenfalls langsam erfolgen und die Gewebslücken durch astrogliale Narbenbildung erhalten bleiben. Subjektiv entsteht allerdings der Eindruck eines akuten Ereignisses.

Zusammengefasst lassen sich die Fakten schematisch in Abbildung 21 darstellen und zu einer Hypothese formulieren.

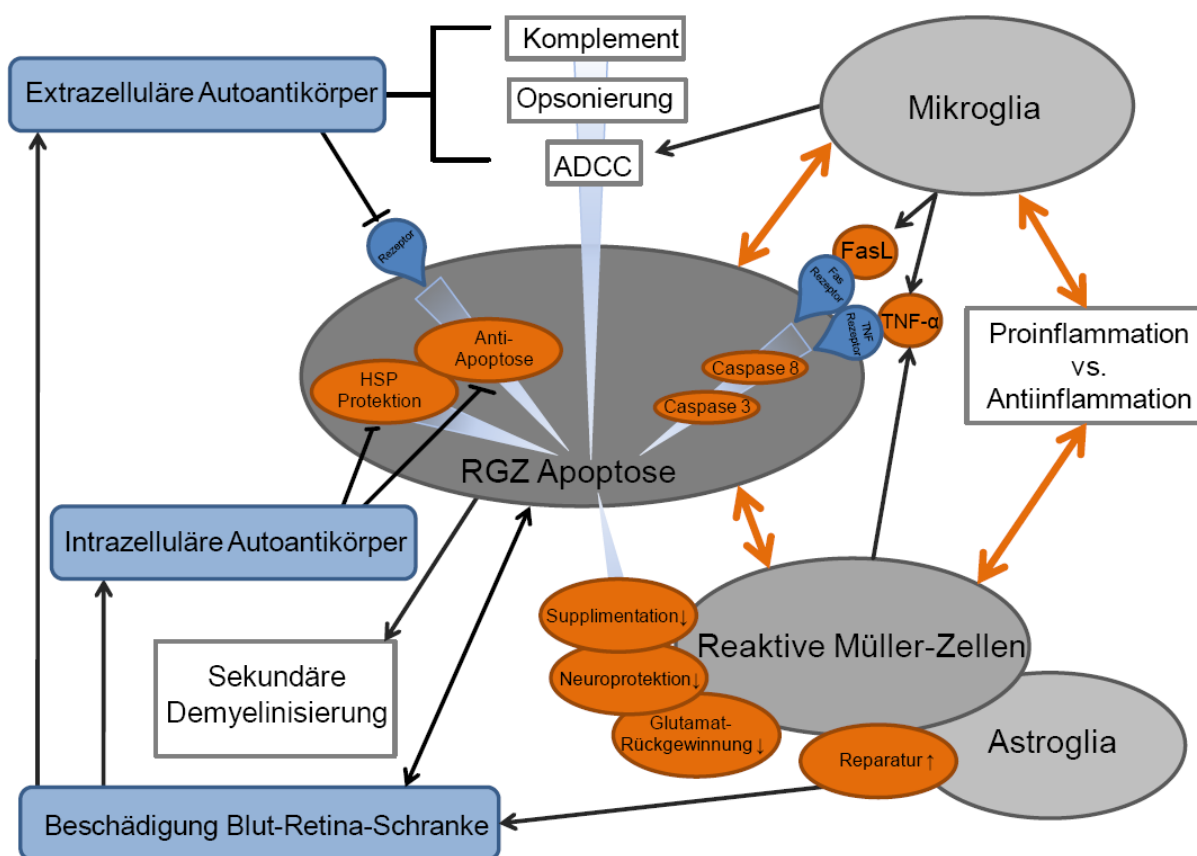


Abbildung 21: Schematische Übersicht zum retinalen Ganglienzellverlust im EAG Modell.

Nach Immunisierung wird die BRS durch PTX zunächst beschädigt. Eine basale Caspase medierte Apoptose führt zum RGZ Verlust, während Mikroglia aktiv werden und die Astroglia die BRS abdichten. Ohne die Antigen-Antikörper Reaktion scheint der immunologische Stimulus in der Kontrollgruppe ohne weitere Schäden abzuflachen. Kommt es hingegen zur Autoantikörperproduktion, sind viele davon intrazellulär, wie am Beispiel der HSP27 Autoantikörper erläutert, wirksam und lösen so die Apoptose aus. Andere binden extrazellulär und induzieren die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität über die Mikroglia. TNF- $\alpha$  und FasLigand vermitteln den extrinsischen Weg bei fehlender HSP Protektion, wodurch die Apoptoserate verstärkt wird. Dadurch hält der immunologische Stimulus an, worauf die Müller-Zellen in die reaktive Gliose übertreten. Als Ergebnis bleibt die Beschädigung der BRS, unter gleichzeitiger Verminderung von neuroprotektiven Fähigkeiten der Müller-Zellen, weiterhin erhalten. Die Rückkopplung neurodegenerativer



Prozesse tritt ein. Aus dem so entstandenen Missverhältnis zwischen Neurodegeneration und Neuroprotektion resultiert ein langsam progredienter RGZ Verlust.

### 5.2.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalitis

Während die Demyelinisierung des N. opticus im EAG Modell als Folge des RGZ Verlusts auftritt, scheint sie im EAE Modell kausal zu sein. Zum einen ist der Grad an Demyelinisierung bereits im frühen Stadium nach Immunisierung mit MBP signifikant erhöht und bleibt im Verlauf auch immer höher als der, der beiden mit Homogenat immunisierten Gruppen (Abbildung 7). Zum anderen sind verhältnismäßig wenige IgG Antikörperablagerungen in den Retinae zu finden, aber dafür massive in den transversalen Sehnervenschnitten (Kapitel 4.4.1). Nach Immunisierung mit MBP entstehen nicht nur anti-MBP-Autoantikörper mit myelinproteolytischen Eigenschaften, sondern ebenfalls Autoantikörper gegen weitere Bestandteile des Myelins, aber auch gegen Tubulin und GST (Farinazzo, Gini et al. 2010). PLP, MOG und MBP anti-Myelin-Autoantikörper besitzen erhebliches Potenzial die Phagozytose von Myelin durch Makrophagen via Opsonierung zu beeinflussen (Van der Goes, Kortekaas et al. 1999). Weiter konnten anti-MBP-Autoantikörpern eine MBP bezogene ACDD nachgewiesen werden (Varitek and Day 1981; Frick 1982), welche im Zusammenhang mit der Stärke einer MS-bedingen Opticusneuritis steht (Frick 1988). Ahmed et al. beobachteten die Phagozytose von Myelin durch Makrophagen und Mikroglia in einer MBP induzierten EAE (Ahmed, Gveric et al. 2001; Ahmed, Baker et al. 2003). Anti-MOG-Autoantikörper scheinen zusätzlich Eigenschaften zur Signaltransduktion via MAP Kinase Kaskade bei Oligodendroglia zu besitzen, die ebenfalls eine Demyelinisierung begünstigen (Marta, Montano et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit war die Gesamtzahl Iba1<sup>+</sup> Mikroglia in den Transversalschnitten der MBP immunisierten Tiere nicht verändert, jedoch befanden sich signifikant mehr Zellen im aktivierten Status als in der RGA Gruppe und der Kontrolle (Tabelle 3). Zusammen mit der IgG Autoantikörperablagerung im Sehnerv zeigt sich hier im Vergleich zum EAG Modell ein umgekehrtes Bild. Beim EAG Modell treten Mikroglia und Autoantikörperablagerungen dominant in der Retina auf, wohingehend sich im EAE Modell zwar eine erhöhte mikrogliale Aktivität im epiretinalen Abschnitt nachweisen lässt, jedoch keine signifikant erhöhte Antikörperablagerung. Wie im EAG Modell modelliert nicht zuletzt allein die Antikörperproduktion nach Immunisierung das systemischen Antikörperrepertoire, sondern wird viel mehr ein bestimmtes Repertoire neuer Antigene sekundär gebildet. Deutlich wurde das bei der Analyse des humoralen IgG Antikörperrepertoires, bei dem die IgG

---

Serumreaktivitäten gegen retinales Gewebe in der MBP immunisierten Gruppe zeitabhängig zunahmen (Kapitel 4.5). Möglich wird dieser Prozess wahrscheinlich über die mikrogliale Prozessierung neuer Antigene nach Phagozytose apoptotischer RGZs. Während traumatischen Ereignissen im ZNS werden häufig Mikroglia in Interaktion mit Lymphozyten an Blutgefäßen beobachtet. Es wird postuliert, dass neben der immunregulatorischen Funktion, spezifische Antigene zur systemischen Immunantwort präsentiert werden (Raivich, Bohatschek et al. 1999).

Eine Sonderstellung im Bezug auf den Pathomechanismus muss dem Homogenat aus opticus-assoziierten Antigenen zugesprochen werden, da sich beim Einsatz von ONA beide Modelle kombinieren. Deutlich wird dies an mehreren Punkten. Auf der EAE Seite stehen Argumente wie ein positiver Enzephalitis-Score bei zwei Versuchstiere nach ONA Immunisierung und ein verhältnismäßig hoher Grad an Demyelinisierung. Für das EAG Modell sprächen die signifikant erhöhte Caspase 3 Werte und IgG Antikörperablagerungen in der Retina. Nicht zuletzt sind die IgG Serumreaktivitäten sowohl gegen Retina als auch Sehnerv deutlich stärker als bei MBP und ebenfalls unterschiedlich zu RGA. Bereits 14 Tage nach Immunisierung sind gegen beide Gewebe die Autoantikörperreaktionen signifikant erhöht. Die beiden anderen Antigene MBP und RGA benötigen noch weitere 14 Tage bis zum Überschreiten der Signifikanzgrenze - Indizien für einen kombinierenden Effekt aus glaukomassoziierten Antigenen und den enzephalogenen Proteinen im verwendeten Homogenat. Um diese Tatsache eindeutig zu belegen, fehlt auch hier die Identifizierung der Antigene gegen welche die IgG Autoantikörper nach Immunisierung gebildet werden. Es existieren bereits Ansätze um diese Frage nach den neu gebildeten Autoantikörpern, zumindestens für die Verwendung von Rückenmarkshomogenate bei der EAE, teilweise zu klären. Dort konnten bisher Antikörper gegen MOG, MBP, Tubulin und GST identifiziert werden (Yang, Bergsteinsdottir et al. 2001; Rostrom, Grubb et al. 2004; Farinazzo, Gini et al. 2010). Allerdings sollte dieses Ergebnis nicht ohne weiteres auf das ONA Homogenat übertragen werden, wobei mutmaßlich ebenfalls anti-MBP und anti-MOG-Antikörper nach Immunisierung gebildet werden.

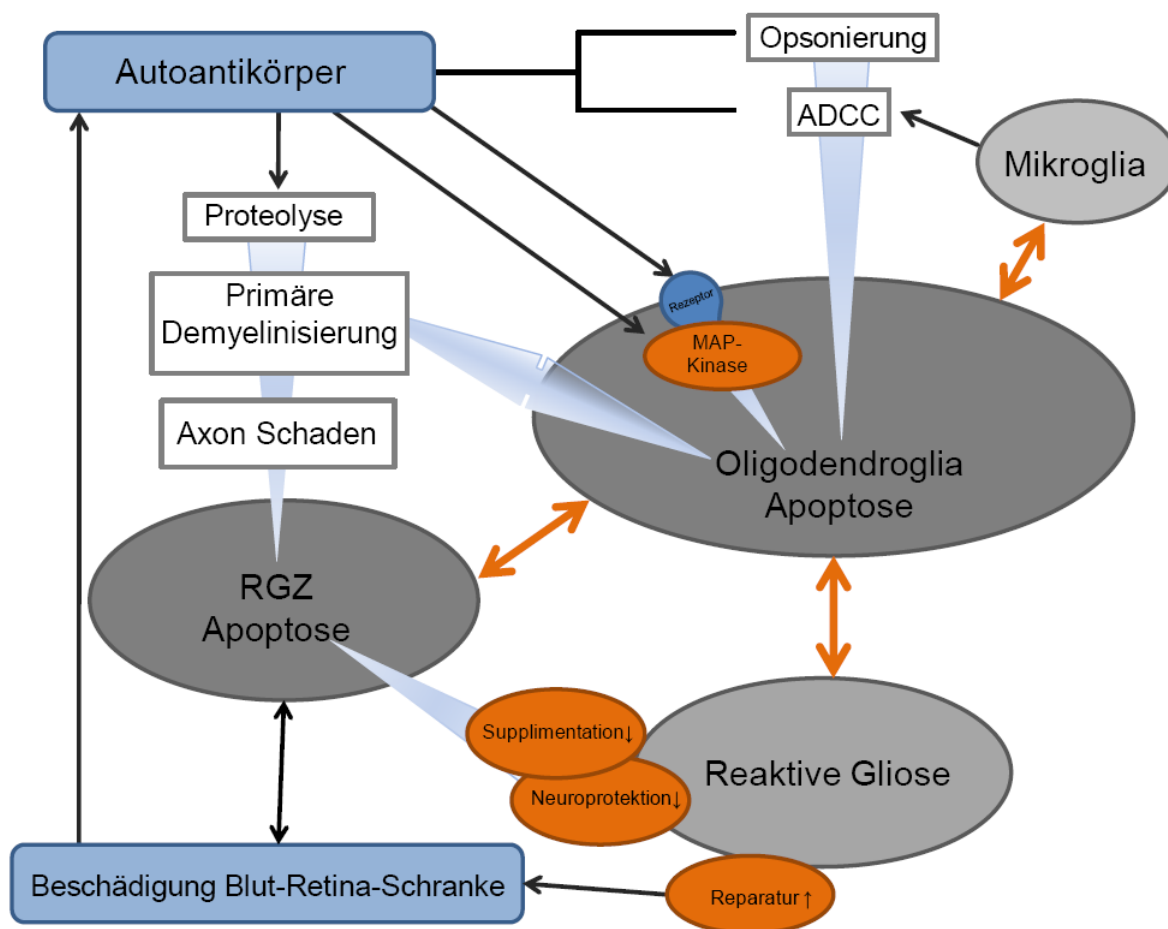


Abbildung 22: Schematische Übersicht zum retinalen Ganglienzellverlust beim MBP induzierten EAE Modell.

Daher wird für die MBP induzierte EAE angenommen, dass die Immunisierung mit MBP in Kombination mit IFA und PTX, neben der Beschädigung der BRS, die Bildung von anti-Myelin-Antikörpern vorwiegend gegen MBP selbst bewirkt. Diese induzieren die Zerstörung der Myelinscheide durch Proteolyse. Gleichzeitig fördern sie den Untergang von Oligodendrozyten durch MBP bezogene ACDD unter Beteiligung der Mikroglia. Wie in Abbildung 22 illustriert, resultiert beides in der Demyelinisierung des Sehnervens, wodurch nachfolgend die RGZ stirbt.

### 5.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Glaukopathogenese

Wie Eingangs beschrieben, konnte eine Alterationen der natürlichen Autoimmunität bei Glaukompatienten nachgewiesen werden, wobei verschiedene HSPs oder auch die

Strukturproteine MBP, GFAP, Vimentin oder  $\alpha$ -Fodrin, sowie Glykosaminoglykane, verschiedene  $\gamma$ -Enolase und GST als Antigene identifiziert werden konnten (Wax, Barrett et al. 1994; Wax, Tezel et al. 1998; Tezel, Edward et al. 1999; Maruyama, Ohguro et al. 2000; Yang, Tezel et al. 2001; Ikeda, Maruyama et al. 2002; Grus, Joachim et al. 2004; Joachim, Bruns et al. 2007; Grus and Sun 2008; Joachim, Reichelt et al. 2008). In den ersten Studien zum EAG Modell wurde zunächst die Frage beantwortet, ob die Induktion autoimmuner Prozesse mittels Immunsierung von HSPs zum Verlust von RGZ führt. In der Tat konnten Wax et al. nicht nur einen signifikanten Untergang von RGZ zeigen, sondern gleichfalls die vermehrte Expression von Fas Rezeptoren in der Ganglienzellschicht und höhere Fas Ligand Titer im Serum, sowie die Beteiligung von Makrophagen nachweisen (Wax, Tezel et al. 2006). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Autoantikörperprofile nach HSP27-induzierter EAG mit dem Ergebnis signifikanter Veränderungen mit sowohl erhöhten, als auch erniedrigten Autoantikörperreaktionen (Joachim, Grus et al. 2009). Somit wurde die Vermutung verstärkt, dass die autoimmune Komponente in der Glaukopathogenese neurodegenerative Aspekte besitzt. Unklar ist dabei, ob sich Autoantikörper in der Retina oder im Sehnerven ablagern und womöglich aktiv an der Apoptose der RGZ beteiligt sind. Zwar existiert eine Publikation über histopathologische Befunde mit Auftreten von IgG Ablagerungen in der Ganglienzellschicht eines Patienten mit Normaldruckglaukom, allerdings ist der histologische Nachweis qualitativ fraglich (Wax, Tezel et al. 1998). Im Rahmen dieser Dissertation ist es gelungen, neben dem signifikanten Ganglienzellverlust, Ablagerungen von IgG Antikörpern in den Retinae von Versuchstieren nachzuweisen, welche mit komplexen Antigengemischen aus der retinalen Ganglienzellschicht (RGA) oder dem Sehnerven (ONA) immunisiert wurden. Der Einsatz von Homogenaten beruhte darauf so das gesamte bekannte Autoantigenrepertoire abzudecken und unter der Annahme, dass die Autoantikörper als kollektiv wirksam sind. Komplettiert wurde der Ansatz durch MBP als weiteres Antigen. Anti-MBP- Antikörper sind in erster Linie zwar mit der MS in Verbindung zu bringen, sind aber ebenfalls beim Glaukom bekannt. Weiter können mittlerweile jeweils Teilaspekte verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen mit der Pathogenese anderer Neurodegeneration in Zusammenhang gebracht. Als Beispiele sind das Glaukom und die MS bedingte Opticusneuritis, sowie die Verknüpfung zum Morbus Alzheimer zu nennen (McKinnon 2003; Parisi 2003; Jankowska-Lech, Terelak-Borys et al. 2007). Zum einen konnte für MBP gezeigt werden, dass nach Immunsierung ebenfalls RGZ zu Grunde gehen und die Antikörperablagerungen weniger in der Retina, sondern eher im Sehnerv zu finden waren. Beide Erkenntnisse waren bis dato im Rahmen der EAE unbekannt. Zum anderen

war der RGZ Verlust bei den Homogenaten, selbst beim Einsatz retina-assoziierten Antigene, und bei MBP von einer Demyelinisierung des Sehnervens begleitet. Auch bei Glaukompatienten ist aus zahlreichen Studien bekannt, dass die Axone der RGZ von Abbauprozessen betroffen sind. Je nach Glaukomform und pathologischer Hypothese kann die primäre Schädigung des Sehnervens für den Untergang der RGZ verantwortlich sein. Andersherum gibt es auch genügend Argumente für den umgekehrten Weg. So ist die Schädigung der Sehnervaxone sekundären Charakters, weil das Soma der RGZ primär zerstört wird.

In beiden Fällen wäre der MBP Autoantikörper in der Glaukompathogenese epiphänomenalen Ursprungs, bedingt durch die makrophagischen Abbauprozesse der Myelinscheide toter Axone. Wäre dieser primär kausal und unabhängig von weiteren Faktoren, zeigten die Glaukompatienten pathophysiologisch kein Glaukom sondern eher Aspekte der MS. Denn während der Opticusneuritis und im EAE Modell, ist der Ganglienzellverlust sekundärer Natur und auf die aktive Demyelinisierung des Sehnervens durch die anti-Myelin-Autoantikörper zurück zuführen. Unabhängig davon, welche Antikörper im kausalen oder sekundären Zusammenhang stehen, besitzen diese neurodestruktive Eigenschaften. Denn die Autoantikörper können im EAG Modell entweder selbst oder via ADCC und Mikroglia die Caspasekaskade aktivieren. Es gibt ebenfalls deutliche Hinweise auf die Aktivierung der Caspasekaskade bei Glaukompatienten (McKinnon 2003; Qu, Wang et al. 2010). Nur konnte die Kaskade nur ansatzweise mit dem immun-vermittelten extrinsischen Apoptoseweg und gänzlich ohne Antikörperablagerungen in Zusammenhang gebracht werden (Zalewska, Zalewski et al. 2008). Vielmehr standen die Untersuchungen eher im Fokus des intrinsischen Weges nach oxidativer Schädigung, was auch die zahlreichen Untersuchungen an druckinduzierten Glaukومتiermodellen belegt (Hanninen, Pantcheva et al. 2002; Kim and Park 2005; Levkovitch-Verbin, Harizman et al. 2007). Für das EAG Modell konnte aus den drei Komponenten Antikörperablagerung, Beteiligung der Mikroglia und Caspaseaktivierung eine Hypothese zum Pathomechanismus erarbeitet werden. Diesen gilt es in Spenderaugen von Glaukompatienten zunächst histologisch zu überprüfen. Dort muss zuerst reproduzierbar die Ablagerungen von Autoantikörpern nachgewiesen und quantifiziert werden, bevor Doppelfärbungen mit Caspasen oder Mikroglia anstehen.

Darüber hinaus zeigt das EAG Tiermodell weitere Aspekte der Glaukompathogenese wie z. B. eine reaktive Gliose (Gramlich, Joachim et al. 2009; Joachim, Gramlich et al. 2009; Stahl 2010). Nicht nur bei Glaukompatienten mit erhöhtem IOP, sondern auch bei Patienten mit

Normaldruckglaukom bildet sich im Laufe der Erkrankung eine reaktive Gliose, welche vor allem die Müller-Zellen betrifft, aus (Tezel, Chauhan et al. 2003). Das EAG Modell ist mit einem physiologisch normalen IOP assoziiert, wobei die Versuchstiere im Zeitverlauf eine deutlich gesteigerte Expression von GFAP mit gleichzeitiger Raumforderung aufweisen.

Somit bietet das EAG Modell weitreichende Möglichkeiten die immunologische Komponente innerhalb der Glaukompathogenese weiter zu erforschen. Das Modell ist durch einen progredienten Verlust retinaler Ganglienzellen ohne Anstieg des intraokulären Druckes bei einsetzender Gliose gekennzeichnet. Darüber hinaus können Antikörperablagerungen und eine Aktivierung von Mikroglia nachgewiesen werden. Beides lässt eine antikörpervermittelte Apoptose vermuten und trotzdem sind weitere Untersuchungen nötig, um den Pathomechanismus im Detail aufzuklären. Welche Faktoren welchen neurodegenerativen Mechanismus wie beeinflussen oder was woraus resultiert ist weiterhin unklar. Klar ist hingegen, dass es eine Art positive Rückkopplung innerhalb des neurodegenerativen Kreislaufes geben muss. Dies soll bedeuten, dass wenn der Kreislauf einmal angestoßen ist, dieser so schnell nicht wieder zu stoppen ist. Hier besteht gleichfalls die Möglichkeit einen Ansatz zur immunmodulierenden Therapie zu entwickeln, um den Kreislauf zu unterbrechen. Möglicherweise ist die Modifikation der glialen Zelltypen der Schlüssel.

#### **5.4 Ausblick**

Um die Frage nach den epiphänomenalen und den kausalen Autoantikörpern wieder aufzugreifen, lässt sich sagen, dass einige der Antikörper im EAG sicher als Epiphänomene nach Prozessierung durch Mikroglia oder andere immunokompetenten Zellen auftreten. Da beim Glaukompatienten normalerweise keine Immunisierung mit diesen Antigenen von extern vorliegt, entstehen sie möglicherweise entweder nach molekularer Mimikry oder im Rahmen eines bisher unbekanntem, superantigenen Ereignisses. Aus anderer Sicht ist es aber eher wahrscheinlich, dass es zu einer Art Selbstimmunisierung durch das Absterben retinaler Ganglienzellen aufgrund eines heterogenen Initialereignisses bei autoimmuner Prädisposition kommen könnte. Indizien dafür finden sich bei den Studien von Niederkorn zum Immunprivileg des Auges (Niederkorn 2006). Die Untersuchung der humoralen IgG Antikörperantwort gegen okuläres Gewebe liefert Hinweise zur Unterstützung dieser Annahme, da bereits 14 Tagen nach Immunisierung autoaggressive IgG Antikörper zu detektieren waren. Zusammen mit dem Einsatz von Freund's Adjuvans steht dieses Ergebnis im Widerspruch zur gängigen Lehrmeinung der Antikörperproduktion nach Immunisierung

---

mit unbekanntem Antigenen (Janeway, Travers et al. 2001). Da für die Immunisierungen neben MBP Homogenate verwendet wurden, sind Aussagen darüber um welche Antigene es sich handelt eigentlich unmöglich. Dass die bekannten glaukomassoziierten Antigene enthalten sind ist zwar naheliegend, aber ohne ein de novo Screening lässt sich das nicht nachweisen. Geeignete Methoden wären die bereits beschriebenen Protein-Mikroarrays und die 2D Gelelektrophorese samt Western Blot mit anschließender Immundetektion nach Vorlage von Farinazzo et al (Farinazzo, Gini et al. 2010). Nach Detektion womöglich weiterer Antigene können aus den Ergebnissen zwei neue Ansätze zum Ausbau der Autoimmunhypothese entwickelt werden. Zur Untersuchung der kausalen und epiphänomenalen Autoantikörper kann ein Protein-Mikroarray mit den glaukomassoziierten Antigenen bestückt werden und die IgG Immunreaktivität im EAG Modell getestet werden. Das Studiendesign müsste nur eine engmaschige Blutentnahme, womöglich täglich, beinhalten. Theoretisch sollten dann die kausalen IgG Autoantikörper unmittelbar nach Ereignis detektierbar und quantitativ zu bestimmen sein. Gleichsam müsste der Titer der protektiven Antikörper im Verlauf absinken und der, der sekundär gebildeten Antikörper zunehmen.

Umgekehrt können mit Hilfe der Antikörper-Mikroarrays die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung von Antikörperablagerungen, Mikroglia und Caspasekaskade, sowie die reaktive Gliose in den Augen der EAG Versuchstiere quantifiziert werden. Um den Bogen zur humanen Glaukompathogenese letztendlich wieder zu spannen, sollte dieser Ansatz, sowie die immunhistologischen Detektionen anschließend mit den glaukomatösen Spenderaugen durchgeführt werden. Die Wahl der kommerziell erhältlichen Antikörper für den Mikroarray bietet darüber hinaus die Gelegenheit weitere Proteininteraktionen unterschiedlicher Apoptosekaskaden zu testen.

## 6 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren konnten zahlreiche Studien die Veränderung des natürlichen Autoantikörperrepertoires bei Glaukmapatienten aufzeigen. Zu den Antigenen zählen verschiedenen Hitzeschockproteinen, aber ebenso neuronal assoziierte Strukturproteine wie das Myelin basische Protein (MBP) oder das sauren Gliafaserprotein und einige neuropsychologische Proteine aus der Retina und dem Sehnerven. Da bei den Glaukmapatienten nicht einzelne Antikörperreaktionen verändert sind, sondern vielmehr komplexe Autoantikörpermuster vorliegen, bestand das primäre Ziel der Dissertation zu zeigen, ob eine systemische Immunisierung mit Homogenaten opticus-assoziiierter Antigene (ONA) und Antigenen der retinalen Ganglienzellschicht (RGA) den Verlust von retinalen Ganglienzellen (RGZ) in einem Experimentellen Autoimmunen Glaukom (EAG) Tiermodell auslösen können. Unterdessen ist MBP ebenfalls ein bekanntes Antigen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) und der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis (EAE). Daher konnte die MBP induzierte EAE als Referenzmodell vergleichend untersucht werden. Hierzu wurden Lewis-Ratten mit MBP, ONA oder RGA in Kombination mit Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin intraperitoneal immunisiert. Um festzustellen, ob der Schaden antigenabhängig ist, wurde zusätzlich zu den Kontrollgruppen eine weitere Gruppe mit dem bislang nicht glaukom-assoziierten Antigen Keratin immunisiert. Kontrolltiere erhielten lediglich Freund's Adjuvans und Pertussis Toxin. Nach Studienlaufzeiten von 14, 28 und 42 Tagen wurde die retinale Ganglienzelldichte nach Kresylviolettffärbung evaluiert und statistisch analysiert. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass durch die studienbegleitenden ophthalmologischen Untersuchungen zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen oder Erhöhung des intraokulären Druckes, sowie keinerlei pathologische Auffälligkeiten nach Funduskopie festgestellt werden konnten. Gegenüber den Kontrollgruppen wurde nach Immunisierung mit ONA, RGA oder MBP hingegen zu jeder Laufzeit ein signifikanter Verlust retinaler Ganglienzellen nachgewiesen. Die Immunisierung mit Keratin zeigte keinen Einfluss auf die Ganglienzelldichte und suggeriert einen antigenunabhängigen RGZ Verlust.

Die nachfolgenden EAG Studien verfolgten das Ziel anhand histologischer und immunhistologischer, sowie immunproteochemischen Methoden eine pathophysiologische Hypothese zum retinalen Ganglienzellverlust für die beiden Modelle zu erarbeiten. Die Ergebnisse zeigten, dass der RGZ Verlust im Rahmen des EAG Modells in erster Linie durch die autoreaktive Antikörperproduktion gegen okuläre Strukturen bedingt sein muss, da in der retinalen Ganglienzellschicht immunisierter Tiere signifikant erhöhte Mengen an intra- und



extrazellulären IgG Autoantikörpern nachgewiesen werden konnten. Einher gingen die IgG Ablagerungen mit der Observation aktivierter Mikroglia, die meist in Kolokalisation oder im unmittelbaren Umfeld auftraten. Die Untersuchung der Caspasekaskade ergab zudem, dass die Apoptose der RGZ im EAG Modell maßgeblich über den extrinsischen Weg vermittelt ist. Die humorale Antikörperantwort wurde anhand eines immunhistochemischen Verfahrens analysiert, wobei signifikant erhöhte Reaktivitäten von Serumantikörpern gegen okuläres Gewebe in den immunisierten Gruppen zu detektieren waren.

Zusammengefasst wird angenommen, dass die intrazellulären Autoantikörper direkt die Apoptose auslösen oder begünstigen können und die extrazellulären IgG Ablagerungen die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität über Mikroglia induzieren. Als sekundäres Ereignis war die moderate aber signifikante Demyelinisierung der Sehnerven im EAG Modell zu bewerten, wohingehend bei der MBP induzierten EAE eine primäre Demyelinisierung dagegen als Grund für den RGZ Verlust im Verdacht steht. Die Immunisierung mit MBP initialisiert die Bildung von anti-Myelin-Antikörpern, welche vermutlich die Zerstörung der Myelinscheide durch Proteolyse und MBP bezogene zelluläre Zytotoxizität induzieren. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass die IgG Antikörperablagerungen vermehrt in den Sehnerven MBP immunisierter Tiere zu finden waren und dort die mikrogliale Aktivität im Vergleich zu den EAG Tieren signifikant erhöht war. Der Nachweis des retinalen Ganglienzellverlustes, sowie die Demyelinisierung des Sehnervens bei der MBP Prof. Dr. Dr. F. H. Grus induzierten EAE konnte bisher noch nicht erbracht werden und stellt damit einen neuen Aspekt in der MS Forschung und der Glaukompathogenese dar.

Bezogen auf die heterogene Pathologie des Glaukoms konnten, zumindest für die autoimmune Komponente anhand des EAG Modells, einige Punkte beleuchtet werden. Zunächst gilt es die Hypothese des Modells, welche von einem antikörperbedingtem Ganglienzelluntergang geprägt ist, im Glaukmpatienten zu überprüfen. Weitere Untersuchungen im EAG Modell sind nötig um alternative Apoptosewege zu erforschen und um die Frage zu beantworten, ob die Veränderungen im Antikörpermuster kausativer Natur sind oder als Epiphänomen auftreten.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- Acarin, L., J. Paris, et al. (2002). "Glial expression of small heat shock proteins following an excitotoxic lesion in the immature rat brain." *Glia* **38**(1): 1-14.
- Adachi, M., K. Takahashi, et al. (1996). "High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **234**(7): 445-451.
- Ahmed, Z., D. Baker, et al. (2003). "Interleukin-12 induces mild experimental allergic encephalomyelitis following local central nervous system injury in the Lewis rat." *J Neuroimmunol* **140**(1-2): 109-117.
- Ahmed, Z., D. Gveric, et al. (2001). "Myelin/axonal pathology in interleukin-12 induced serial relapses of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat." *Am J Pathol* **158**(6): 2127-2138.
- Allcutt, D., M. Berry, et al. (1984). "A quantitative comparison of the reactions of retinal ganglion cells to optic nerve crush in neonatal and adult mice." *Brain Res* **318**(2): 219-230.
- Araque, A. and M. Navarrete (2010). "Glial cells in neuronal network function." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1551): 2375-2381.
- Arnold, A. C. (2005). "Evolving management of optic neuritis and multiple sclerosis." *Am J Ophthalmol* **139**(6): 1101-1108.
- Augustin, A. J. and J. F. Collins (2001). *Augenheilkunde*. Berlin, Springer.
- Backhaus, K., B. Erischson, et al. (2000). "Multivariate Analysemethoden 9. Auflage ISBN 3540671463 Springer Verlag ": Kapitel 4.
- Badie, B., J. Schartner, et al. (2001). "Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion." *J Neuroimmunol* **120**(1-2): 19-24.
- Battifora, H. (1986). "The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing." *Lab Invest* **55**(2): 244-248.
- Battifora, H. and P. Mehta (1990). "The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block." *Lab Invest* **63**(5): 722-724.

- Beck, R. W., P. A. Cleary, et al. (1992). "A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. The Optic Neuritis Study Group." N Engl J Med **326**(9): 581-588.
- Ben-Nun, A., I. Mendel, et al. (1997). "Immunomodulation of murine experimental autoimmune encephalomyelitis by pertussis toxin: the protective activity, but not the disease-enhancing activity, can be attributed to the nontoxic B-oligomer." Proc Assoc Am Physicians **109**(2): 120-125.
- Bischof, F., A. Bins, et al. (2004). "A structurally available encephalitogenic epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein specifically induces a diversified pathogenic autoimmune response." J Immunol **173**(1): 600-606.
- Blackman, M., J. Kappler, et al. (1990). "The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells." Science **248**(4961): 1335-1341.
- Bley Müller, J., Gehlert, G., Gülicher, H. (2000). "Statistik für Wirtschaftswissenschaftler 12. Auflage ISBN 3800626306 Verlag Vahlen." Kapitel 1-19.
- Boltz-Nitulescu, G., H. Bazin, et al. (1981). "Specificity of fc receptors for IgG2a, IgG1/IgG2b, and IgE on rat macrophages." J Exp Med **154**(2): 374-384.
- Borg, A. A., P. T. Dawes, et al. (1993). "Increased levels of IgA antibodies to cytokeratin-18 and epidermal keratin in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **36**(2): 229-233.
- Borg, A. A., N. B. Nixon, et al. (1994). "Increased IgA antibodies to cytokeratins in the spondyloarthropathies." Ann Rheum Dis **53**(6): 391-395.
- Brack, C., M. Hiram, et al. (1978). "A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination." Cell **15**(1): 1-14.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brädl, M. and H. Lassmann (2010). "Oligodendrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 37-53.
- Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2009). "Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism." Neurochem Int **54**(3-4): 143-160.
- Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2006). "Müller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.

- Brown, A. M., S. Baltan Tekkok, et al. (2004). "Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen." Neurochem Int **45**(4): 529-536.
- Bruckener, K. E., A. el Baya, et al. (2003). "Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP." J Cell Sci **116**(Pt 9): 1837-1846.
- Bunce, C. and R. Wormald (2006). "Leading causes of certification for blindness and partial sight in England & Wales." BMC Public Health **6**: 58.
- Campbell, N., A. (1997). "Biologie, 1. Auflage, Hrsg Prof. Jürgen Markl, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford." Kapitel 39 und 45.
- Carelli, V., F. N. Ross-Cisneros, et al. (2004). "Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies." Prog Retin Eye Res **23**(1): 53-89.
- Carson, M. J., J. M. Doose, et al. (2006). "CNS immune privilege: hiding in plain sight." Immunol Rev **213**: 48-65.
- Chan, C. C., A. G. Palestine, et al. (1985). "Anti-retinal auto-antibodies in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, Behcet's disease, and sympathetic ophthalmia." Ophthalmology **92**(8): 1025-1028.
- Clark, D., W. Kebede, et al. (2010). "Optic neuritis." Neurol Clin **28**(3): 573-580.
- Cohen, I., T. Sivron, et al. (1994). "Vimentin immunoreactive glial cells in the fish optic nerve: implications for regeneration." Glia **10**(1): 16-29.
- Coleman, A. L. (1999). "Glaucoma." Lancet **354**(9192): 1803-1810.
- Conti-Fine, B. M., M. Milani, et al. (2006). "Myasthenia gravis: past, present, and future." J Clin Invest **116**(11): 2843-2854.
- Crotzer, V. L. and J. S. Blum (2010). "Autophagy and adaptive immunity." Immunology **131**(1): 9-17.
- Croxford, J. L., J. K. Olson, et al. (2005). "Initiation and exacerbation of autoimmune demyelination of the central nervous system via virus-induced molecular mimicry: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis." J Virol **79**(13): 8581-8590.
- Cuny, C. S., S. C. Joachim, et al. (2010). "Repeated intraocular pressure measurement in awake lewis rats does not bias retinal ganglion cell survival." Curr Eye Res **35**(11): 1034-1039.

- Davis, J. A. (1999). "Assessment of discomfort in an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis." Animal Welfare Information Center Bulletin, Volume 10, Numbers 3-4, Winter 1999/2000.
- De Berardinis, E., O. Tieri, et al. (1964). "[The chemical composition of human aqueous humor. I. Concentration of bicarbonates]." Boll Soc Ital Biol Sper **40**(20): 1232-1235.
- De Monasterio, F. M. and P. Gouras (1975). "Functional properties of ganglion cells of the rhesus monkey retina." J Physiol **251**(1): 167-195.
- Deitmer, J., W. , Kreutzberg, G. (2000). "Die Glia des Nervensystems - Funktion und Leistungen." biologen heute Vol: 3/2000.
- Devaux, B., F. Enderlin, et al. (1997). "Induction of EAE in mice with recombinant human MOG, and treatment of EAE with a MOG peptide." J Neuroimmunol **75**(1-2): 169-173.
- Diamond, B., P. T. Huerta, et al. (2009). "Losing your nerves? Maybe it's the antibodies." Nat Rev Immunol **9**(6): 449-456.
- Dreyer, E. B., D. Zurakowski, et al. (1996). "Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma." Arch Ophthalmol **114**(3): 299-305.
- Duan, W. R., D. S. Garner, et al. (2003). "Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts." J Pathol **199**(2): 221-228.
- Ebnetter, A., R. J. Casson, et al. (2010). "Microglial Activation in the Visual Pathway in Experimental Glaucoma: Spatio-Temporal Characterisation and Correlation with Axonal Injury." Invest Ophthalmol Vis Sci.
- EUGS (2003). "Terminology and Guidelines for Glaucoma, European Galucoma Society." Introduction chapter.
- Farinazzo, A., B. Gini, et al. (2010). "2D immunomic approach for the study of IgG autoantibodies in the experimental model of multiple sclerosis." J Neuroimmunol.
- Ferguson, T. A., D. R. Green, et al. (2002). "Cell death and immune privilege." Int Rev Immunol **21**(2-3): 153-172.
- Flammer, J. and S. Orgul (1998). "Optic nerve blood-flow abnormalities in glaucoma." Prog Retin Eye Res **17**(2): 267-289.
- Flammer, J., S. Orgul, et al. (2002). "The impact of ocular blood flow in glaucoma." Prog Retin Eye Res **21**(4): 359-393.

- Fletcher, E. L., L. E. Downie, et al. (2008). "A review of the role of glial cells in understanding retinal disease." Clin Exp Optom **91**(1): 67-77.
- Fletcher, J. M., S. J. Lalor, et al. (2010). "T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Clin Exp Immunol **162**(1): 1-11.
- Fredericks, C. A., R. A. Giolli, et al. (1988). "The human accessory optic system." Brain Res **454**(1-2): 116-122.
- Frick, E. (1982). "Cell-mediated cytotoxicity by peripheral blood lymphocytes against basic protein of myelin, encephalitogenic peptide, cerebroside and ganglioside in multiple sclerosis." J Neurol Sci **57**(1): 55-66.
- Frick, E. (1988). "Optic neuritis and multiple sclerosis. Cell-mediated cytotoxicity by peripheral blood lymphocytes against basic protein of myelin, encephalitogenic peptide, cerebroside and ganglioside." Eur Neurol **28**(3): 120-125.
- Galang, N., H. Sasaki, et al. (2000). "Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy." Toxicology **148**(2-3): 111-118.
- Gatzka, M. and C. M. Walsh (2007). "Apoptotic signal transduction and T cell tolerance." Autoimmunity **40**(6): 442-452.
- Gellrich, M. M. and N. C. Gellrich (1996). "Quantitative relations in the retinal ganglion cell layer of the rat: neurons, glia and capillaries before and after optic nerve section." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **234**(5): 315-323.
- Ghaffar, O. and A. Feinstein (2007). "The neuropsychiatry of multiple sclerosis: a review of recent developments." Curr Opin Psychiatry **20**(3): 278-285.
- Gottfried, E., L. A. Kunz-Schughart, et al. (2008). "Expression of CD68 in non-myeloid cell types." Scand J Immunol **67**(5): 453-463.
- Graca, D. L. (1988). "Myelination, demyelination and re-myelination in the central nervous system." Arg Neuropsiquiatr **46**(3): 292-297.
- Graeber, M. B. and W. J. Streit (2010). "Microglia: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 89-105.
- Gramlich, O. W. (2007). Immunoproteochemische Untersuchungen am Tiermodell des Experimentellen Autoimmunen Glaukoms. Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- Gramlich, O. W., S. C. Joachim, et al. (2009). Antibody Deposits in Retina Correlate With Loss of Retinal Ganglion Cells in an Experimental Autoimmune Glaucoma Model. **50**: 151-.
- Gramlich, O. W., S. C. Joachim, et al. (2009). Antibody Deposits in Retina Correlate With Loss of Retinal Ganglion Cells in an Experimental Autoimmune Glaucoma Model. **50**: 151-.
- Gran, B., G. X. Zhang, et al. (2002). "IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination." J Immunol **169**(12): 7104-7110.
- Grehn, F. (2006). Augenheilkunde. Berlin, Springer.
- Griffith, T. S., T. Brunner, et al. (1995). "Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege." Science **270**(5239): 1189-1192.
- Grus, F. and D. Sun (2008). "Immunological mechanisms in glaucoma." Semin Immunopathol **30**(2): 121-126.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, et al. (2004). "Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma." Mol Vis **10**: 132-137.
- Grus, F. H., S. C. Joachim, et al. (2008). "Autoimmunity and glaucoma." J Glaucoma **17**(1): 79-84.
- Guo, L. and M. F. Cordeiro (2008). "Assessment of neuroprotection in the retina with DARC." Prog Brain Res **173**: 437-450.
- Hanninen, V. A., M. B. Pantcheva, et al. (2002). "Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma." Curr Eye Res **25**(6): 389-395.
- Hedegaard, C. J., N. Chen, et al. (2009). "Autoantibodies to myelin basic protein (MBP) in healthy individuals and in patients with multiple sclerosis: a role in regulating cytokine responses to MBP." Immunology **128**(1 Suppl): e451-461.
- Holcombe, D. J., N. Lengefeld, et al. (2008). "Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model." Br J Ophthalmol **92**(5): 683-688.
- Hood, D. C., J. G. Odel, et al. (2003). "The multifocal visual evoked potential." J Neuroophthalmol **23**(4): 279-289.
- Huang, W., J. Fileta, et al. (2006). "Downregulation of Thy1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma." Curr Eye Res **31**(3): 265-271.

- Ikeda, Y., I. Maruyama, et al. (2002). "Clinical significance of serum antibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients." Jpn J Ophthalmol **46**(1): 13-17.
- Inman, D. M. and P. J. Horner (2007). "Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma." Glia **55**(9): 942-953.
- Ito, D., Y. Imai, et al. (1998). "Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1." Brain Res Mol Brain Res **57**(1): 1-9.
- Janeway, C. A., P. Travers, et al. (2001). "Immunobiology, 5th edition."
- Jankowska-Lech, I., B. Terelak-Borys, et al. (2007). "Glaucoma neuropathy and neuropathy in multiple sclerosis--common elements of pathogenesis?" Klin Oczna **109**(7-9): 317-320.
- Jeon, G. S., S. W. Park, et al. (2004). "Glial expression of the 90-kDa heat shock protein (HSP90) and the 94-kDa glucose-regulated protein (GRP94) following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus." Glia **48**(3): 250-258.
- Jia, L., W. O. Cepurna, et al. (2000). "Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(11): 3415-3419.
- Joachim, S. C., K. Bruns, et al. (2007). "Antibodies to alpha B-Crystallin, Vimentin, and Heat Shock Protein 70 in Aqueous Humor of Patients with Normal Tension Glaucoma and IgG Antibody Patterns Against Retinal Antigen in Aqueous Humor." Curr Eye Res **32**(6): 501-509.
- Joachim, S. C., O. W. Gramlich, et al. (2009). Auto-Retinal Antibodies in Animals With Experimental Autoimmune Glaucoma. **50**: 4280-.
- Joachim, S. C., F. H. Grus, et al. (2009). "Complex Antibody Profile Changes in an Experimental Autoimmune Glaucoma Animal Model." Invest Ophthalmol Vis Sci.
- Joachim, S. C., F. H. Grus, et al. (2003). "Analysis of autoantibody repertoires in sera of patients with glaucoma." Eur J Ophthalmol **13**(9-10): 752-758.
- Joachim, S. C., N. Pfeiffer, et al. (2005). "Autoantibodies in patients with glaucoma: a comparison of IgG serum antibodies against retinal, optic nerve, and optic nerve head antigens." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **243**(8): 817-823.
- Joachim, S. C., J. Reichelt, et al. (2008). "Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **246**(4): 573-580.



- Joachim, S. C., D. Wuenschig, et al. (2007). "IgG antibody patterns in aqueous humor of patients with primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma." Mol Vis **13**: 1573-1579.
- Joly, S., M. Francke, et al. (2009). "Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions." Am J Pathol **174**(6): 2310-2323.
- Joo, C. K., J. S. Choi, et al. (1999). "Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(3): 713-720.
- Joos, K. M., C. Li, et al. (2010). "Short-term Intermittent Elevations in Intraocular Pressure Induce Morphometric Changes in the Rat Optic Nerve." Invest Ophthalmol Vis Sci.
- Kayama, H. and K. Takeda (2010). "The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection." Microbes Infect **12**(7): 511-517.
- Keirstead, H. S. and W. F. Blakemore (1999). "The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination." Adv Exp Med Biol **468**: 183-197.
- Kettenmann, H. and A. Verkhratsky (2008). "Neuroglia: the 150 years after." Trends Neurosci **31**(12): 653-659.
- Kielczewski, J. L., M. E. Pease, et al. (2005). "The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection on amacrine cells in the rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(9): 3188-3196.
- Kim, H. S. and C. K. Park (2005). "Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program." Brain Res **1057**(1-2): 17-28.
- Kim, S. U. and J. de Vellis (2005). "Microglia in health and disease." J Neurosci Res **81**(3): 302-313.
- Kluver, H. and E. Barrera (1953). "A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **12**(4): 400-403.
- Kohler, H., J. Bayry, et al. (2003). "Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response?" Scand J Immunol **58**(3): 285-289.
- Korn, T. (2008). "Pathophysiology of multiple sclerosis." J Neurol **255** Suppl 6: 2-6.
- Krause, D., J. Kunz, et al. (1993). "Cerebral pericytes--a second line of defense in controlling blood-brain barrier peptide metabolism." Adv Exp Med Biol **331**: 149-152.

- Krishnamoorthy, G. and H. Wekerle (2009). "EAE: an immunologist's magic eye." Eur J Immunol **39**(8): 2031-2035.
- Kunisch, E., R. Fuhrmann, et al. (2004). "Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry." Ann Rheum Dis **63**(7): 774-784.
- Kwong, J. M., J. Caprioli, et al. (2010). "RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(2): 1052-1058.
- Lagreze, W. (2009). "Treatment of optic neuropathies--state of the art." Klin Monbl Augenheilkd **226**(11): 875-880.
- Lang, G. K. (2004). Augenheilkunde. Stuttgart, Thieme.
- Leahy, K. M., R. L. Ornberg, et al. (2004). "Quantitative ex vivo detection of rodent retinal ganglion cells by immunolabeling Brn-3b." Exp Eye Res **79**(1): 131-140.
- Leung, C. K. and R. N. Weinreb (2009). "Experimental detection of retinal ganglion cell damage in vivo." Exp Eye Res **88**(4): 831-836.
- Levine, S. and E. J. Wenk (1961). "Studies on the mechanism of altered susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis." Am J Pathol **39**: 419-441.
- Levine, S. and E. J. Wenk (1965). "A Hyperacute Form of Allergic Encephalomyelitis." Am J Pathol **47**: 61-88.
- Levkovitch-Verbin, H., N. Harizman, et al. (2007). "Regulation of cell death and survival pathways in experimental glaucoma." Exp Eye Res **85**(2): 250-258.
- Levkovitch-Verbin, H., H. A. Quigley, et al. (2002). "Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(2): 402-410.
- Li, B., G. E. Barnes, et al. (2005). "The decline of the photopic negative response (PhNR) in the rat after optic nerve transection." Doc Ophthalmol **111**(1): 23-31.
- Libbey, J. E., L. L. McCoy, et al. (2007). "Molecular mimicry in multiple sclerosis." Int Rev Neurobiol **79**: 127-147.
- Lipton, S. A. and P. A. Rosenberg (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." N Engl J Med **330**(9): 613-622.
- Lundmark, F., K. Duvefelt, et al. (2007). "Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis." Nat Genet **39**(9): 1108-1113.

- Lunemann, J. D., I. Jelcic, et al. (2008). "EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2." J Exp Med **205**(8): 1763-1773.
- Mannie, M., R. H. Swanborg, et al. (2009). "Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat." Curr Protoc Immunol **Chapter 15**: Unit 15 12.
- Marchesani, O. (2005). "Die Morphologie der Glia im Nervus opticus und in der Retina, dargestellt nach den neuesten Untersuchungsmethoden und Untersuchungsergebnissen." Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology: Seite 575-605.
- Marta, C. B., R. Bansal, et al. (2008). "Microglial Fc receptors mediate physiological changes resulting from antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein." J Neuroimmunol **196**(1-2): 35-40.
- Marta, C. B., M. B. Montano, et al. (2005). "Signaling cascades activated upon antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein: potential implications for multiple sclerosis." J Biol Chem **280**(10): 8985-8993.
- Maruyama, I., T. Maeda, et al. (2002). "Autoantibody against neuron-specific enolase found in glaucoma patients causes retinal dysfunction in vivo." Jpn J Ophthalmol **46**(1): 1-12.
- Maruyama, I., H. Ohguro, et al. (2000). "Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(7): 1657-1665.
- McKinnon, S. J. (2003). "Glaucoma: ocular Alzheimer's disease?" Front Biosci **8**: s1140-1156.
- Medgyesi, G. A., G. Fust, et al. (1978). "Classes and subclasses of rat immunoglobulins: interaction with the complement system and with staphylococcal protein A." Immunochemistry **15**(2): 125-129.
- Merigan, W. H. (1989). "Chromatic and achromatic vision of macaques: role of the P pathway." J Neurosci **9**(3): 776-783.
- Miller, D., F. Barkhof, et al. (2005). "Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part 2: non-conventional MRI, recovery processes, and management." Lancet Neurol **4**(6): 341-348.

- Miller, D., F. Barkhof, et al. (2005). "Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis." Lancet Neurol **4**(5): 281-288.
- Miller, N. R. (1996). "The optic nerve." Curr Opin Neurol **9**(1): 5-15.
- Morrison, J. C., C. G. Moore, et al. (1997). "A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage." Exp Eye Res **64**(1): 85-96.
- Moser, M. and O. Leo (2010). "Key concepts in immunology." Vaccine **28 Suppl 3**: C2-13.
- Neumann, H., M. R. Kotter, et al. (2009). "Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration." Brain **132**(Pt 2): 288-295.
- Niederhorn, J. Y. (2006). "See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege." Nat Immunol **7**(4): 354-359.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, et al. (2000). "Multiple sclerosis." N Engl J Med **343**(13): 938-952.
- O'Brien, K., B. Gran, et al. (2010). "T-cell based immunotherapy in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis." Immunotherapy **2**(1): 99-115.
- O'Connor, K. C., T. Chitnis, et al. (2003). "Myelin basic protein-reactive autoantibodies in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients are characterized by low-affinity interactions." J Neuroimmunol **136**(1-2): 140-148.
- Olson, J. K., T. N. Eagar, et al. (2002). "Functional activation of myelin-specific T cells by virus-induced molecular mimicry." J Immunol **169**(5): 2719-2726.
- Oppezzo, P. and G. Dighiero (2003). "[Autoantibodies, tolerance and autoimmunity]." Pathol Biol (Paris) **51**(5): 297-304.
- Pandey, P., R. Farber, et al. (2000). "Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3." Oncogene **19**(16): 1975-1981.
- Parisi, V. (2003). "Correlation between morphological and functional retinal impairment in patients affected by ocular hypertension, glaucoma, demyelinating optic neuritis and Alzheimer's disease." Semin Ophthalmol **18**(2): 50-57.
- Patel, N., M. Ohbayashi, et al. (2005). "Circulating anti-retinal antibodies as immune markers in age-related macular degeneration." Immunology **115**(3): 422-430.
- Paterson, P. Y., E. D. Day, et al. (1981). "Endogenous myelin basic protein-serum factors (MBP-SFs) and anti-MBP antibodies in humans. Occurrence in sera of clinically well subjects and patients with multiple sclerosis." J Neurol Sci **52**(1): 37-51.

- Paul, C., S. Simon, et al. (2010). "Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27)." Exp Cell Res **316**(9): 1535-1552.
- Pekny, M. and M. Nilsson (2005). "Astrocyte activation and reactive gliosis." Glia **50**(4): 427-434.
- Perry, V. H. (1979). "The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study." Proc R Soc Lond B Biol Sci **204**(1156): 363-375.
- Perry, V. H. (1981). "Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina." Neuroscience **6**(5): 931-944.
- Petrescu, S., R. Pascu, et al. (2008). "Optic neuropathy in multiple sclerosis." Oftalmologia **52**(4): 3-14.
- Pfeiffer, N. (2005). Glaukom und okuläre Hypertension : Grundlagen - Diagnostik - Therapie ; 23 Tabellen. Stuttgart, Thieme.
- Pfeiffer, N., G. K. Krieglstein, et al. (2002). "Knowledge about glaucoma in the unselected population: a German survey." J Glaucoma **11**(5): 458-463.
- Poletaev, A. and L. Osipenko (2003). "General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus)." Autoimmun Rev **2**(5): 264-271.
- Ponomarenko, N. A., O. M. Durova, et al. (2006). "Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(2): 281-286.
- Ponomarenko, N. A., O. M. Durova, et al. (2006). "Catalytic activity of autoantibodies toward myelin basic protein correlates with the scores on the multiple sclerosis expanded disability status scale." Immunol Lett **103**(1): 45-50.
- Pourmand, R. (1997). "Myasthenia gravis." Dis Mon **43**(2): 65-109.
- Pugliatti, M., G. Rosati, et al. (2006). "The epidemiology of multiple sclerosis in Europe." Eur J Neurol **13**(7): 700-722.
- Qu, J., D. Wang, et al. (2010). "Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma." Exp Eye Res **91**(1): 48-53.
- Quigley, H. A. (1993). "Open-angle glaucoma." N Engl J Med **328**(15): 1097-1106.
- Quigley, H. A. and A. T. Broman (2006). "The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020." Br J Ophthalmol **90**(3): 262-267.

- Raivich, G., M. Bohatschek, et al. (1999). "Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function." Brain Res Brain Res Rev **30**(1): 77-105.
- Rao, S. M. (1996). "White matter disease and dementia." Brain Cogn **31**(2): 250-268.
- Richardson, W. D., N. Kessaris, et al. (2006). "Oligodendrocyte wars." Nat Rev Neurosci **7**(1): 11-18.
- Risau, W., S. Esser, et al. (1998). "Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells." Pathol Biol (Paris) **46**(3): 171-175.
- Rodieck, R. W. and R. K. Brening (1983). "Retinal ganglion cells: properties, types, genera, pathways and trans-species comparisons." Brain Behav Evol **23**(3-4): 121-164.
- Romano, C., Z. Li, et al. (1999). "Epitope mapping of anti-rhodopsin antibodies from patients with normal pressure glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(6): 1275-1280.
- Romeis, B. and P. Böck (1989). Mikroskopische Technik. München, Urban u. Schwarzenberg.
- Ross, R. J., M. Zhou, et al. (2008). "Immunological protein expression profile in Ccl2/Cx3cr1 deficient mice with lesions similar to age-related macular degeneration." Exp Eye Res **86**(4): 675-683.
- Rostrom, B., A. Grubb, et al. (2004). "Oligoclonal IgG bands synthesized in the central nervous system are present in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis." Acta Neurol Scand **109**(2): 106-112.
- Saggu, S. K., H. P. Chotaliya, et al. (2008). "The spatiotemporal pattern of somal and axonal pathology after perikaryal excitotoxic injury to retinal ganglion cells: a histological and morphometric study." Exp Neurol **211**(1): 52-58.
- Sakaguchi, S. (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." Cell **101**(5): 455-458.
- Salvesen, G. S. (2002). "Caspases and apoptosis." Essays Biochem **38**: 9-19.
- Salvetti, M., G. Giovannoni, et al. (2009). "Epstein-Barr virus and multiple sclerosis." Curr Opin Neurol **22**(3): 201-206.
- Sanes, J. R. and S. L. Zipursky (2010). "Design principles of insect and vertebrate visual systems." Neuron **66**(1): 15-36.
- Sanz, O., L. Acarin, et al. (2001). "Expression of 27 kDa heat shock protein (Hsp27) in immature rat brain after a cortical aspiration lesion." Glia **36**(3): 259-270.

- Sappington, R. M., B. J. Carlson, et al. (2010). "The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(1): 207-216.
- Schmidt, H., J. Gerber, et al. (2010). "S100B in the cerebrospinal fluid--a marker for glial damage in the rabbit model of pneumococcal meningitis." Neurosci Lett **475**(2): 104-107.
- Schroeder, H. W., Jr. and L. Cavacini (2010). "Structure and function of immunoglobulins." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S41-52.
- Shams, P. N. and G. T. Plant (2009). "Optic neuritis: a review." Int MS J **16**(3): 82-89.
- Shao, H., Z. Huang, et al. (2004). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-specific T-cells induce severe optic neuritis in the C57BL/6 mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(11): 4060-4065.
- Shareef, S. R., E. Garcia-Valenzuela, et al. (1995). "Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats." Exp Eye Res **61**(3): 379-382.
- Shindler, K. S., Y. Guan, et al. (2006). "Retinal ganglion cell loss induced by acute optic neuritis in a relapsing model of multiple sclerosis." Mult Scler **12**(5): 526-532.
- Shindler, K. S., E. Ventura, et al. (2008). "Inflammatory demyelination induces axonal injury and retinal ganglion cell apoptosis in experimental optic neuritis." Exp Eye Res **87**(3): 208-213.
- Sievers, J., B. Hausmann, et al. (1987). "Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve." Neurosci Lett **76**(2): 157-162.
- Siliprandi, R., R. Canella, et al. (1992). "N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina." Vis Neurosci **8**(6): 567-573.
- Simon, M., E. Girbal, et al. (1993). "The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis." J Clin Invest **92**(3): 1387-1393.
- Smith, G. G. and C. D. Baird (1952). "Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure." Am J Ophthalmol **35**(5:2): 133-136.
- Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 7-35.

- Sommer, A., J. M. Tielsch, et al. (1991). "Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey." Arch Ophthalmol **109**(8): 1090-1095.
- Soulet, D. and S. Rivest (2008). "Microglia." Curr Biol **18**(12): R506-508.
- Sowka, J. (2005). "New thoughts on normal tension glaucoma." Optometry **76**(10): 600-608.
- Srinivasan, M. and K. A. Frauwirth (2009). "Peripheral tolerance in CD8+ T cells." Cytokine **46**(2): 147-159.
- Stahl, V. (2010). "Analyse der retina auf gliotische Veränderungen der Müller-Zellen im Experimentellen Autoimmunen Glaukom Modell, Doktorarbeit."
- Sternberg, E. M., R. L. Wilder, et al. (1990). "A defect in the central component of the immune system--hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback loop is associated with susceptibility to experimental arthritis and other inflammatory diseases." Ann N Y Acad Sci **594**: 289-292.
- Stevens, B. and R. D. Fields (2000). "Response of Schwann cells to action potentials in development." Science **287**(5461): 2267-2271.
- Stinissen, P., J. Raus, et al. (1997). "Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies." Crit Rev Immunol **17**(1): 33-75.
- Stojkovic, T. and A. Behin (2010). "Ocular myasthenia: Diagnosis and treatment." Rev Neurol (Paris).
- Stone, J. (1965). "A quantitative analysis of the distribution of ganglion cells in the cat's retina." J Comp Neurol **124**(3): 337-352.
- Streilein, J. W. (1999). "Immunoregulatory mechanisms of the eye." Prog Retin Eye Res **18**(3): 357-370.
- Streilein, J. W. (2003). "Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature." Nat Rev Immunol **3**(11): 879-889.
- Sutter, A., A. Hekmat, et al. (1991). "Antibody-mediated tumor cytotoxicity of microglia." Pathobiology **59**(4): 254-258.
- Swanborg, R. H. (1995). "Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease." Clin Immunol Immunopathol **77**(1): 4-13.



- Tanihara, H., M. Hangai, et al. (1997). "Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma." Arch Ophthalmol **115**(6): 752-756.
- Tezel, G., B. C. Chauhan, et al. (2003). "Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(7): 3025-3033.
- Tezel, G., D. P. Edward, et al. (1999). "Serum autoantibodies to optic nerve head glycosaminoglycans in patients with glaucoma." Arch Ophthalmol **117**(7): 917-924.
- Tezel, G. and M. B. Wax (2000). "The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells." J Neurosci **20**(10): 3552-3562.
- Thorburne, S. K. and B. H. Juurlink (1996). "Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress." J Neurochem **67**(3): 1014-1022.
- Trapp, B. D. and K. A. Nave (2008). "Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?" Annu Rev Neurosci **31**: 247-269.
- Ulvestad, E., K. Williams, et al. (1994). "Fc receptors for IgG on cultured human microglia mediate cytotoxicity and phagocytosis of antibody-coated targets." J Neuropathol Exp Neurol **53**(1): 27-36.
- Van der Goes, A., M. Kortekaas, et al. (1999). "The role of anti-myelin (auto)-antibodies in the phagocytosis of myelin by macrophages." J Neuroimmunol **101**(1): 61-67.
- van Venrooij, W. J. and G. J. Pruijn (2000). "Citruination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis." Arthritis Res **2**(4): 249-251.
- Varitek, V. A., Jr. and E. D. Day (1981). "Studies of rat antibodies specific for myelin basic protein (MBP). Antibody-dependent cell-mediated lysis of MBP-sensitized targets in vitro." J Neuroimmunol **1**(1): 27-39.
- Villapol, S., L. Acarin, et al. (2008). "Survivin and heat shock protein 25/27 colocalize with cleaved caspase-3 in surviving reactive astrocytes following excitotoxicity to the immature brain." Neuroscience **153**(1): 108-119.
- Vincent, C., G. Serre, et al. (1991). "Natural IgG to epidermal cytokeratins vs IgG to the stratum corneum of the rat oesophagus epithelium, so-called 'antikeratin antibodies', in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases." J Autoimmun **4**(3): 493-505.

- Vojdani, A., E. Vojdani, et al. (2003). "Antibodies to myelin basic protein, myelin oligodendrocytes peptides, alpha-beta-crystallin, lymphocyte activation and cytokine production in patients with multiple sclerosis." J Intern Med **254**(4): 363-374.
- Voumvourakis, K. I., D. K. Kitsos, et al. (2010). "Human herpesvirus 6 infection as a trigger of multiple sclerosis." Mayo Clin Proc **85**(11): 1023-1030.
- Vrabec, J. P. and L. A. Levin (2007). "The neurobiology of cell death in glaucoma." Eye (Lond) **21 Suppl 1**: S11-14.
- Warren, K. G. and I. Catz (1994). "Relative frequency of autoantibodies to myelin basic protein and proteolipid protein in optic neuritis and multiple sclerosis cerebrospinal fluid." J Neurol Sci **121**(1): 66-73.
- Warren, K. G., I. Catz, et al. (1994). "Anti-myelin basic protein and anti-proteolipid protein specific forms of multiple sclerosis." Ann Neurol **35**(3): 280-289.
- Watanabe, M. and R. W. Rodieck (1989). "Parasol and midget ganglion cells of the primate retina." J Comp Neurol **289**(3): 434-454.
- Wax, M. B. (2010). "The case for autoimmunity in glaucoma." Exp Eye Res.
- Wax, M. B., D. A. Barrett, et al. (1994). "Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal-pressure glaucoma." Am J Ophthalmol **117**(5): 561-568.
- Wax, M. B., G. Tezel, et al. (1998). "Clinical and ocular histopathological findings in a patient with normal-pressure glaucoma." Arch Ophthalmol **116**(8): 993-1001.
- Wax, M. B., G. Tezel, et al. (1998). "Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma." Am J Ophthalmol **125**(2): 145-157.
- Wax, M. B., G. Tezel, et al. (2006). "Induced Autoimmunity to Heat Shock Proteins Elicits Glaucomatous Loss of Retinal Ganglion Cells via a FAS/FAS-Ligand Pathway." Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **47**(5): 1828-.
- Wax, M. B., J. Yang, et al. (2002). "A Model of Experimental Autoimmune Glaucoma in Rats Elicited by Immunization With Heat Shock Protein27." Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **43**(12): 2884-.
- Waxman, S. G. (1978). "Prerequisites for conduction in demyelinated fibers." Neurology **28**(9 Pt 2): 27-33.
- Wehner, R. and W. Gehring (1995). "Zoologie, 23. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York." Kapitel 4, 6 und 7.

- Wehner, R. and W. Gehring (2007). "Zoologie, 24. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York." Kapitel 4, 6 und 7.
- Weinshenker, B. G., B. Bass, et al. (1989). "The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability." Brain **112 ( Pt 1)**: 133-146.
- Wekerle, H. (2008). "Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations." Ann Rheum Dis **67 Suppl 3**: iii56-60.
- Wiesner, H. and G. von Hegel (1985). "Practical advice concerning the immobilization of wild and zoo animals." Tierarztl Prax **13(1)**: 113-127.
- Wingerchuk, D. M., V. A. Lennon, et al. (2006). "Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica." Neurology **66(10)**: 1485-1489.
- WoldeMussie, E., G. Ruiz, et al. (2001). "Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension." Invest Ophthalmol Vis Sci **42(12)**: 2849-2855.
- World Health Organization (2004). Blindness and Visual Disability Fact Sheet N°282. Genf, World Health Organization.
- Xiang, M., L. Zhou, et al. (1995). "The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons." J Neurosci **15(7 Pt 1)**: 4762-4785.
- Yang, H. T., K. Bergsteinsdottir, et al. (2001). "Genetic linkage analysis of the antibody responses to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats immunized with rat spinal cord homogenate." J Neuroimmunol **117(1-2)**: 21-29.
- Yang, J., G. Tezel, et al. (2001). "Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **42(6)**: 1273-1276.
- Zalewska, R., B. Zalewski, et al. (2008). "The expressions of Fas and caspase-3 in human glaucomatous optic nerve axons." Med Sci Monit **14(12)**: BR274-278.
- Zephir, H., L. Almeras, et al. (2006). "Diversified serum IgG response involving non-myelin CNS proteins during experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **179(1-2)**: 53-64.
- Zhou, R. and R. R. Caspi (2010). "Ocular immune privilege." F1000 Biol Rep **2**.
- Zuvich, R. L., J. L. McCauley, et al. (2010). "Genetic variation in the IL7RA/IL7 pathway increases multiple sclerosis susceptibility." Hum Genet **127(5)**: 525-535.

---

## 8 Anhang

### 8.1 Anhang 1: Färbungen

#### Entparaffinierung:

Xylol	10'
Xylol	10'
Xylol	10'
100% EtOH	5'
100% EtOH	5'
96% EtOH	5'
96% EtOH	5'
70% EtOH	5'
Aqua dest.	5'

#### HE-Färbung:

Hämatoxin <sup>1)</sup>	4'
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen

#### Differenzieren:

2% HCl-Alkohol <sup>2)</sup>	5''
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Ammoniakwasser <sup>3)</sup>	30''
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Fließendes Wasser	10'
Eosin <sup>4)</sup>	3'
Leitungswasser	spülen

#### Aufsteigende Alkoholreihe:

70% EtOH	spülen
96% EtOH	spülen
96% EtOH	spülen
96% EtOH	spülen
100% EtOH	spülen

---

100% EtOH	spülen
Xylol	spülen
Xylol	5'
Xylol	5'

<sup>1)</sup> Gebrauchsfertige Lösung, immer Frisch filtrieren

<sup>2)</sup> 2 ml HCl (37% rauchend) + 98 ml Alkopharm (70% Alkohol)

<sup>3)</sup> Immer frisch ansetzen. In eine volle H<sub>2</sub>O Küvette eine volle Pasteurpipette Ammoniak ca. 3 ml in 300 ml H<sub>2</sub>O geben

<sup>4)</sup> 1 g Eosin + 20 ml Aqua dest. + 80 ml 96% EtOH. Lösung in Küvette filtrieren und dann mit Eisessig ansäuern.

### **LFB-Färbung:**

Entparaffinieren

Schnellfärbung in 1%iger LFB Lösung<sup>1)</sup>:

LFB auf 60 Grad wärmen

Mikrowelle 600 W	15“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	10“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	10“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	5“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	5“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	10“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	10“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	5“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	5“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	15“ dann 5‘ stehen lassen
Mikrowelle 600 W	10“ dann 5‘ stehen lassen

### Differenzieren:

75% Isopropanol	spülen
Aqua dest.	spülen
Lithiumcarbonat <sup>2)</sup>	30“
75% Isopropanol	5“- 30“
Aqua dest.	30“

Mikroskopische Begutachtung ob ausreichend differenziert ist, ansonsten Differenzierung wiederholen

Nissl oder PAS-Färbung anschließen oder nach aufsteigender Alkoholreihe eindecken

<sup>1)</sup>1 g LFB (Solvent Blue 38, Sigma) + 100 ml 95% EtOH + 5 ml Eisessig

<sup>2)</sup>5 mg LiCO<sub>3</sub> (Firma,) + 100 ml Aqua dest.

### **Nissl-Färbung (nach LFB):**

1 % Kresylechtviolett <sup>1)</sup>	5' - 7'
Aqua dest.	spülen

### Differenzieren :

70% Isopropanol <sup>2)</sup>	-30"
80% Isopropanol <sup>3)</sup>	-30"

### Aufsteigende Alkoholreihe:

100% Isopropanol	3'
100% Isopropanol	3'
XEM <sup>4)</sup>	5'

<sup>1)</sup>2 g Kresylechtviolett + 200 ml Acetatpuffer<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Acetatpuffer: 15 ml 0,1 mol Natriumacetatlösung + 185 ml 0,1 mol Essigsäure

<sup>2)</sup> 70% Isopropanol + 2 Tropfen Eisessig aus der Pasteurpipette zugeben

<sup>3)</sup> 80% Isopropanol + 2 Tropfen Eisessig aus der Pasteurpipette zugeben

<sup>4)</sup>XEM Xylolersatzmedium gebrauchsfertig

### **PAS-Färbung (nach LFB):**

1% wässrige Periodsäure <sup>1)</sup>	10'
Aqua dest.	spülen
Aqua dest.	spülen
Schiffsches´ Reagenz <sup>2)</sup>	10`
Leitungswasser	spülen
Hämatoxilin <sup>3)</sup>	4'
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen

### Differenzieren:

2% HCL-Alkohol <sup>4)</sup>	5"
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Ammoniakwasser <sup>5)</sup>	30"

---

Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Leitungswasser	spülen
Fließendes Wasser	10'

Aufsteigende Alkoholreihe:

70% EtOH	spülen
96% EtOH	spülen
96% EtOH	spülen
96% EtOH	spülen
100% EtOH	spülen
100% EtOH	spülen
Xylol	spülen
Xylol	5'
Xylol	5'

<sup>1)</sup> 2 g Schiff Reagenz in 200 ml H<sub>2</sub>O lösen

<sup>2)</sup> Gebrauchsfertige Lösung, muss klar sein.

<sup>3)</sup> Gebrauchsfertige Lösung, immer Frisch filtrieren

<sup>4)</sup> 2 ml HCl (37% rauchend) + 98 ml Alkopharm (70% Alkohol)

<sup>5)</sup> Immer frisch ansetzen. In eine volle H<sub>2</sub>O Küvette eine volle Pasteurpipette Ammoniak ca. 3 ml in 300 ml H<sub>2</sub>O

## 8.2 Anhang 2: p-Werte des intraokulären Druckes nach Tukey's Post Hoc Test

### Anhang 2 A: IOP bei 14 Tagen Laufzeit

	(1) M=12,500	(2) M=12,630	(3) M=12,380	(4) M=12,460	(5) M=12,590	(6) M=12,240
MBP Baseline (1)		0,998127	0,998741	0,999995	0,999704	0,955150
MBP 14 Tage n. l. (2)	0,998127		0,991978	0,993221	0,999995	0,792181
ONA Baseline (3)	0,998741	0,991978		0,999834	0,982202	0,997295
ONA 14 Tage n. l. (4)	0,999995	0,993221	0,999834		0,998127	0,979125
CO Baseline (5)	0,999704	0,999995	0,982202	0,998127		0,856981
CO 14 Tage n. l. (6)	0,955150	0,792181	0,997295	0,978125	0,856981	

### Anhang 2 B: IOP bei 28 Tagen Laufzeit

	(1) M=12,488	(2) M=12,200	(3) M=13,240	(4) M=12,570	(5) M=12,380	(6) M=12,840	(7) M=12,690	(8) M=12,510	(9) M=12,900	(10) M=12,170	(11) M=12,270	(12) M=12,910
MBP 14 Tage n. l. (1)		0,999721	0,595091	1,000000	1,000000	0,999894	0,999985	1,000000	0,998227	0,999807	0,999970	0,995744
MBP 28 Tage n. l. (2)	0,999721		0,118878	0,995247	0,999998	0,782864	0,958795	0,999042	0,872220	1,000000	1,000000	0,852408
MBP Baseline (3)	0,595091	0,118878		0,851124	0,269105	0,995268	0,867983	0,521522	0,998201	0,057991	0,128569	0,997080
CO 14 Tage n. l. (4)	1,000000	0,995247	0,851124		0,999988	0,999558	1,000000	1,000000	0,997080	0,985268	0,999783	0,998201
CO 28 Tage n. l. (5)	1,000000	0,999998	0,269105	0,999988		0,958077	0,998350	1,000000	0,905538	0,999962	1,000000	0,893870
CO Baseline (6)	0,998894	0,782864	0,995268	0,999558	0,958077		0,999999	0,997080	1,000000	0,851124	0,838719	1,000000
KER 14 Tage n. l. (7)	0,999985	0,858795	0,897983	1,000000	0,998350	0,999999		0,999992	0,999992	0,905538	0,978502	0,999939
KER 28 Tage n. l. (8)	1,000000	0,999042	0,521522	1,000000	1,000000	0,997080	0,999992		0,997990	0,998201	0,999867	0,985268
KER Baseline (9)	0,998227	0,872220	0,998201	0,997080	0,905538	1,000000	0,999982	0,997990		0,521522	0,732917	1,000000
ONA 14 Tage n. l. (10)	0,998807	1,000000	0,057991	0,985268	0,999982	0,851124	0,905538	0,998201	0,521522		1,000000	0,499966
ONA 28 Tage n. l. (11)	0,999970	1,000000	0,128569	0,998783	1,000000	0,838719	0,978502	0,999857	0,732917	1,000000		0,713115
ONA Baseline (12)	0,995744	0,852408	0,997080	0,998201	0,893870	1,000000	0,999939	0,985268	1,000000	0,499966	0,713115	

### Anhang 2 C: IOP bei 42 Tagen Laufzeit

	(1) M=14,025	(2) M=14,680	(3) M=13,865	(4) M=14,078	(5) M=13,900	(6) M=14,340	(7) M=14,085	(8) M=14,011	(9) M=14,090	(10) M=14,910	(11) M=15,350	(12) M=13,925
CO Baseline (1)		0,997	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,958	0,586	1,000
CO 14 Tage n. l. (2)	0,997		0,980	0,999	0,998	1,000	0,999	0,997	0,999	1,000	0,994	0,990
CO 28 Tage n. l. (3)	1,000	0,980		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,870	0,398	1,000
CO 42 Tage n. l. (4)	1,000	0,999	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,977	0,887	1,000
MBP Baseline (5)	1,000	0,988	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,895	0,438	1,000
MBP 14 Tage n. l. (6)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,999	0,895	1,000
MBP 28 Tage n. l. (7)	1,000	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,974	0,856	1,000
MBP 42 Tage n. l. (8)	1,000	0,997	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,960	0,612	1,000
RGA Baseline (9)	1,000	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,975	0,682	1,000
RGA 14 Tage n. l. (10)	0,958	1,000	0,870	0,977	0,895	0,999	0,974	0,980	0,975		1,000	0,910
RGA 28 Tage n. l. (11)	0,586	0,994	0,398	0,887	0,438	0,895	0,856	0,612	0,682	1,000		0,467
RGA 42 Tage n. l. (12)	1,000	0,990	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,910	0,467	



### 8.3 Anhang 3: Vergleich der Färbemuster von IgG Ablagerungen und LFB/N im Sehnerv eines MBP immunisierten Tieres

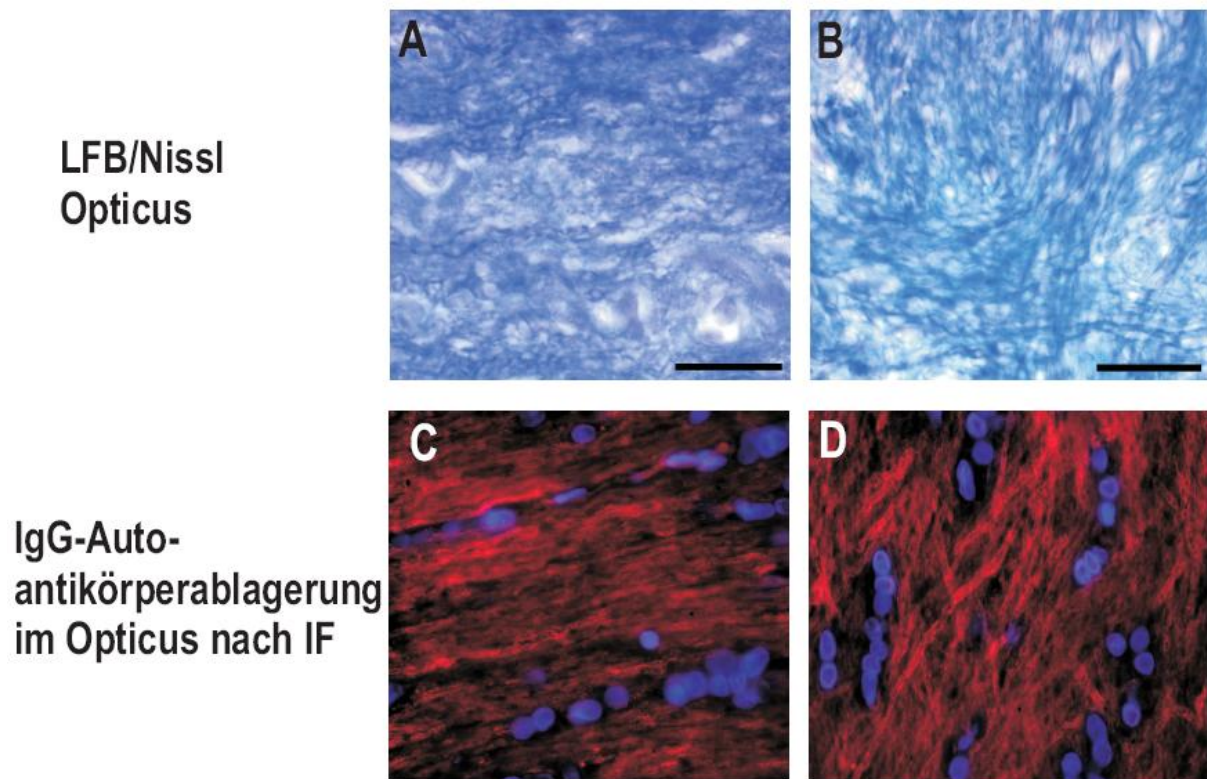


Abbildung Anhang 5: Mustervergleich der LFB/Nissl Färbung und den IgG Ablagerungen in den Sehnervenlängsschnitten MBP immunisierter Tiere. A und B zeigen die Strukturen des Sehnervens nach LFB/Nissl Färbung im Vergleich zu den IgG Autoantikörperablagerungen nach IF (C und D) Die Antikörper Färbung wies erstaunliche Übereinstimmungen mit den Mustern der LFB/Nissl Färbung innerhalb auf. Mutmaßlich binden die Autoantikörper an Bestandteile der Myelinscheiden. Die Doppelfärbung mit einem anti-MBP Antikörper könnte unter Umständen Klärung bringen. Die Bilder der IF wurden an den Maßstab der LFB/Nissl Bilder angeglichen. Deren Skala entspricht 20  $\mu\text{m}$

## 8.4 Anhang 4: p-Werte der IgG Antikörperreaktionen nach Tukey's Post Hoc Test

### Anhang 4 A: IgG Antikörperreaktivität Laufzeit 28 Tage

RetinaArray	(1) M=,75000	(2) M=1,5000	(3) M=,66667	(4) M=1,3333	(5) M=2,3333	(6) M=,26667	(7) M=,06667	(8) M=,13333	(9) M=,40000	(10) M=,40000	(11) M=,60000	(12) M=,46667
MBP 14 Tage n. l. (1)		0,752895	1,000000	0,914909	0,006790	0,979193	0,795836	0,861711	0,998345	0,998345	1,000000	0,999770
MBP 28 Tage n. l. (2)	0,752895		0,817575	0,999999	0,540798	0,072860	0,018123	0,029368	0,162377	0,162377	0,424519	0,231829
MBP Baseline (3)	1,000000	0,817575		0,819589	0,003031	0,994972	0,999145	0,952260	0,999872	0,999872	1,000000	0,999993
ONA 14 Tage n. l. (4)	0,914909	0,999999	0,819589		0,201149	0,135825	0,034588	0,058133	0,287020	0,287020	0,840277	0,392706
ONA 28 Tage n. l. (5)	0,005790	0,540798	0,003031	0,201149		0,000152	0,000132	0,000134	0,000220	0,000220	0,000797	0,000307
ONA Baseline (6)	0,979193	0,072860	0,994972	0,135825	0,000152		0,999987	1,000000	1,000000	1,000000	0,998189	0,999987
CO 14 Tage n. l. (7)	0,795836	0,018123	0,899145	0,034588	0,000132	0,999987		1,000000	0,998189	0,998189	0,929752	0,991337
CO 28 Tage n. l. (8)	0,881711	0,029368	0,952260	0,058133	0,000134	1,000000	1,000000		0,999773	0,999773	0,971879	0,998189
CO Baseline (9)	0,998345	0,162377	0,999872	0,287020	0,000220	1,000000	0,998189	0,999773		1,000000	0,999987	1,000000
KER 14 Tage n. l. (10)	0,998345	0,162377	0,999872	0,287020	0,000220	1,000000	0,998189	0,999773	1,000000		0,999987	1,000000
KER 28 Tage n. l. (11)	1,000000	0,424519	1,000000	0,840277	0,000797	0,998189	0,929752	0,971879	0,999987	0,999987		1,000000
KER Baseline (12)	0,999770	0,231829	0,999993	0,392706	0,000307	0,999987	0,991337	0,998189	1,000000	1,000000	1,000000	

OptimaArray	(1) M=,25000	(2) M=,50000	(3) M=1,7500	(4) M=,13333	(5) M=1,7333	(6) M=2,6000	(7) M=,13333	(8) M=,13333	(9) M=,13333	(10) M=,13333	(11) M=,20000	(12) M=,53333
MBP Baseline (1)		0,999771	0,002335	1,000000	0,001317	0,000129	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,998781
MBP 14 Tage n. l. (2)	0,999771		0,020809	0,998958	0,013540	0,000130	0,998858	0,998858	0,998858	0,998858	0,997999	1,000000
MBP 28 Tage n. l. (3)	0,002335	0,020809		0,000418	1,000000	0,254388	0,000418	0,000418	0,000418	0,000418	0,000731	0,015709
ONA Baseline (4)	1,000000	0,998958	0,000418		0,000244	0,000129	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,998588
ONA 14 Tage n. l. (5)	0,001317	0,013540	1,000000	0,000244		0,164865	0,000244	0,000244	0,000244	0,000244	0,000383	0,009466
ONA 28 Tage n. l. (6)	0,000129	0,000130	0,254388	0,000129	0,164865		0,000129	0,000129	0,000129	0,000129	0,000129	0,000129
CO Baseline (7)	1,000000	0,998958	0,000418	1,000000	0,000244	0,000129		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,998588
CO 14 Tage n. l. (8)	1,000000	0,998958	0,000418	1,000000	0,000244	0,000129	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,998588
CO 28 Tage n. l. (9)	1,000000	0,998958	0,000418	1,000000	0,000244	0,000129	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,998588
KER Baseline (10)	1,000000	0,998958	0,000418	1,000000	0,000244	0,000129	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,998588
KER 14 Tage n. l. (11)	1,000000	0,997999	0,000731	1,000000	0,000383	0,000129	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,991686
KER 28 Tage n. l. (12)	0,999781	1,000000	0,015709	0,998588	0,009466	0,000129	0,998588	0,998588	0,998588	0,998588	0,991886	

### Anhang 4 B: IgG Antikörperreaktivität Laufzeit 42 Tage

RetinaArray	(1) M=,20000	(2) M=,03333	(3) M=1,0000	(4) M=1,4000	(5) M=,13333	(6) M=,48148	(7) M=1,3333	(8) M=2,0000	(9) M=,10000	(10) M=,07407	(11) M=,22222	(12) M=,29630
RGA Baseline (1)		0,999498	0,005998	0,000119	1,000000	0,964282	0,000123	0,000118	0,999997	0,999975	1,000000	0,999998
RGA 14 Tage n. l. (2)	0,999498		0,000350	0,000118	0,999997	0,551991	0,000118	0,000118	1,000000	1,000000	0,998711	0,978417
RGA 28 Tage n. l. (3)	0,005998	0,000350		0,679287	0,001791	0,323319	0,871907	0,000490	0,001020	0,001000	0,011722	0,038219
RGA 42 Tage n. l. (4)	0,000119	0,000118	0,679287		0,000118	0,001126	1,000000	0,173199	0,000118	0,000118	0,000121	0,000137
MBP Baseline (5)	1,000000	0,999997	0,001791	0,000118		0,859152	0,000119	0,000118	1,000000	1,000000	0,999999	0,999985
MBP 14 Tage n. l. (6)	0,964282	0,551991	0,323319	0,001126	0,859152		0,003463	0,000118	0,771776	0,724198	0,984129	0,999151
MBP 28 Tage n. l. (7)	0,000123	0,000118	0,871907	1,000000	0,000119	0,003453		0,079641	0,000118	0,000118	0,000134	0,000204
MBP 42 Tage n. l. (8)	0,000118	0,000118	0,000490	0,173199	0,000118	0,000118	0,079641		0,000118	0,000118	0,000118	0,000118
CO Baseline (9)	0,999997	1,000000	0,001020	0,000118	1,000000	0,771776	0,000118	0,000118		1,000000	0,999982	0,998183
CO 14 Tage n. l. (10)	0,999975	1,000000	0,001000	0,000118	1,000000	0,724198	0,000118	0,000118	1,000000		0,999902	0,995552
CO 28 Tage n. l. (11)	1,000000	0,998711	0,011722	0,000121	0,999999	0,984129	0,000134	0,000118	0,999982	0,999902		1,000000
CO 42 Tage n. l. (12)	0,999998	0,978417	0,038219	0,000137	0,999985	0,999151	0,000204	0,000118	0,998183	0,995552	1,000000	

OptimaArray	(1) M=,16667	(2) M=,18519	(3) M=1,2667	(4) M=2,2000	(5) M=,20000	(6) M=,06667	(7) M=1,0667	(8) M=1,6250	(9) M=,10000	(10) M=,07407	(11) M=,11111	(12) M=,07407
RGA Baseline (1)		1,000000	0,00509	0,000118	1,000000	0,999999	0,009557	0,000119	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
RGA 14 Tage n. l. (2)	1,000000		0,001023	0,000118	1,000000	0,999997	0,017182	0,000123	1,000000	0,999999	1,000000	0,999999
RGA 28 Tage n. l. (3)	0,00509	0,001023		0,005908	0,000943	0,000178	0,999359	0,948285	0,000230	0,000243	0,000375	0,000243
RGA 42 Tage n. l. (4)	0,000118	0,000118	0,005908		0,000118	0,000118	0,000340	0,456199	0,000118	0,000118	0,000118	0,000118
MBP Baseline (5)	1,000000	1,000000	0,000943	0,000118		0,999988	0,015238	0,000121	0,999999	0,999995	1,000000	0,999995
MBP 14 Tage n. l. (6)	0,999999	0,999997	0,000178	0,000118	0,999988		0,002197	0,000118	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
MBP 28 Tage n. l. (7)	0,009557	0,017182	0,999359	0,000340	0,015238	0,002197		0,503020	0,003822	0,003851	0,006195	0,003851
MBP 42 Tage n. l. (8)	0,000119	0,000123	0,948285	0,456199	0,000121	0,000118	0,503020		0,000118	0,000118	0,000118	0,000118
CO Baseline (9)	1,000000	1,000000	0,000230	0,000118	0,999999	1,000000	0,003822	0,000118		1,000000	1,000000	1,000000
CO 14 Tage n. l. (10)	1,000000	0,999999	0,000243	0,000118	0,999995	1,000000	0,003851	0,000118	1,000000		1,000000	1,000000
CO 28 Tage n. l. (11)	1,000000	1,000000	0,000375	0,000118	1,000000	1,000000	0,008195	0,000119	1,000000	1,000000		1,000000
CO 42 Tage n. l. (12)	1,000000	0,999999	0,000243	0,000118	0,999995	1,000000	0,003851	0,000118	1,000000	1,000000	1,000000	

---

## Danksagung

---

**Lebenslauf**

## **Eidesstattliche Erklärung**