

Aus der Klinik für Neurologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Sven G. Meuth

**Myelinating CNS-cultures as a new model for the brain-/CNS-immune interface**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Marcel Brauweiler  
(2025)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Norbert Goebels

Zweitgutachterin: Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall

## Zusammenfassung

Die Myelinisierung von Axonen ist essenziell für die Funktionsweise des menschlichen Nervensystems. Die Multiple Sklerose (MS) als chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung führt zur Demyelinisierung von Axonen und bei ausbleibender Regeneration zum sekundären Untergang der Neurone. Zum Verständnis der Pathophysiologie sowie zur Entwicklung von neuen Therapiestrategien sind Myelinisierungsmechanismen Gegenstand der MS-Forschung. Diese stützt sich größtenteils auf das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Im Gegensatz dazu bietet das Modell der myelinisierenden Rückenmarkskultur (*spinal cord culture*, SCC) bei deutlich reduzierter Anzahl an Versuchstieren und geringerem Tierleid die Möglichkeit zur gezielteren Untersuchung potenzieller Therapeutika. Das Protein LINGO-1 (*leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*) gilt als Inhibitor des Neuritenwachstums, der Oligodendrozyten-Differenzierung und der Myelinisierung. Damit stellt LINGO-1 ein Target für alternative Therapieansätze bei MS dar.

Ziel der Arbeit ist die Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens zum Screening potenziell promyelinisierender Substanzen auf Basis von SCCs. Zu diesem Zweck wurden die anti-LINGO-1 Antikörper 1A7, Li03 und Li81 (patentiert von Biogen) eingesetzt. SCCs wurden aus dem Rückenmark von 13,5 Tage alten Mäuseembryonen gewonnen und für 21 bzw. 30 Tage im Mikrotiter-Format kultiviert. Innerhalb der ersten Woche bildete sich das neuronale Netzwerk aus. Nach 14 Tagen in Kultur setzte die Myelinisierung der Axone ein und erreichte ihr Maximum in den Wochen 3-4. An Tag 7 in Kultur startete die Behandlung der SCCs mit den anti-LINGO-1 Antikörpern. Als Positivkontrolle für eine gesteigerte Myelinisierung diente das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T3). Nach 14 Tagen Behandlung wurden die Zellkulturen fixiert und Zellkerne, Neurofilament sowie Myelin immunhistochemisch angefärbt. In Zusammenarbeit mit Hoffmann-La Roche erfolgte die Quantifizierung der Myelinisierung.

Li03 und Li81 (10 µg/ml) zeigten im Vergleich zur Lösemittelkontrolle eine relative Verstärkung der Myelinisierung um mehr als 40% ( $p < 0,05$ ). Li81 steigerte auch die Dichte des neuronalen Netzwerkes signifikant. Der Einsatz von 1A7 (10 µg/ml), Li03 und Li81 (jeweils 30 µg/ml) förderten zwar die Myelinisierung, allerdings waren die Unterschiede zur Lösemittelkontrolle nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ). Für 1A7 in 30 µg/ml konnte sogar eine Abnahme der Myelinisierung beobachtet werden (allerdings  $p > 0,05$ ).

Die anti-LINGO-1 Antikörper bewirkten eine Verstärkung der primären Myelinisierung. Hierbei zeigte sich keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung. Das SCC-Modell eignet sich für Hochdurchsatz-Screenings und stellt unter ökonomischen und ethischen Gesichtspunkten eine sinnvolle Ergänzung zum EAE-Modell dar. Zur Etablierung eines ergänzenden MS-Versuchsmodell ist die Entwicklung eines De- und Remyelinisierungsverfahrens geplant.

## Summary

The myelination of axons is very important for the functionality of the human nervous system. Multiple sclerosis (MS) as a chronic-inflammatory CNS-disease leads to demyelination and secondary loss of axons, if remyelination fails. The MS-research deals with processes of myelination for better understanding of MS-pathophysiology and development of new therapeutic strategies. It is mainly based on the model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In contrast, the model of myelinating spinal cord culture (SCC) needs less laboratory animals and causes less animal suffering but offers the opportunity of testing a great number of potential therapeutics. The protein LINGO-1 (leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1) inhibits neurite outgrowth, differentiation of oligodendrocytes and myelination. LINGO-1 might be a target for alternative therapeutic approaches for MS.

Aim of the study is the development of a high throughput system to investigate the potential promoting myelination of different substances. Therefore, we used the antagonistic LINGO-1 antibodies 1A7, Li03 and Li81 (patented by Biogen).

We prepared spinal cords from 13,5 days old murine embryos. The spinal cord cells were cultivated on microplates for 21 or 30 days. During the first week SCCs formed a dense neuronal network. After 14 days in vitro myelination started and reached its peak around week 3 and 4. At day in vitro (DIV) 7 we started the treatment with the anti-LINGO-1 antibodies. The thyroid hormone T3 was used as positive control for increased myelination. At DIV 21 cells were fixed and cell bodies, neurofilament as well as myelin were stained immunohistochemically. In cooperation with the company Hoffmann-La Roche we quantified the extent of myelination.

The Li03- and Li81-treatment (10 µg/ml) led, in comparison to the solvent control, to a 40% stronger myelination ( $p < 0,05$ ). Moreover, Li81 increased the density of neuronal network significantly. The use of 1A7 (10 µg/ml) and Li03 as well as Li81 (both 30 µg/ml) also promoted myelination but differences did not reach statistical significance ( $p > 0,05$ ). The high dose treatment with 1A7 even decreased the extent of myelination ( $p > 0,05$ ).

The use of anti-LINGO-1 antibodies increased the (primary) myelination significantly. We could show that there was no linear dose-effect relationship. In an economic and ethical point of view SCCs can support the EAE-model as a high throughput screening system. The development of a de- and remyelination assay is required to optimize our process for further MS-research.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure
<b>BDNF</b>	<i>brain-derived neurothrophic factor</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CNS</b>	<i>central nervous system</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>DIV</b>	<i>day(s) in vitro</i>
<b>DDT</b>	Dithiothreitol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DPBS</b>	Dulbecco's phosphate buffered saline
<b>E</b>	Exponentialdarstellung
<b>EAE</b>	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
<b>EDSS</b>	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
<b>ErbB</b>	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
<b>Fab</b>	<i>fragment antigen binding</i>
<b>Fc</b>	<i>fragment crystallizable</i>
<b>FOV</b>	<i>field of view</i>
<b>G</b>	G-Zahl
<b>g</b>	Gramm
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HBSS</b>	Hank's balanced salt solution
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IQR</b>	Interquartilsabstand
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>JCV</b>	John Cunningham Virus
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>l</b>	Liter
<b>LINGO-1</b>	<i>leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1</i>

<b>LRR</b>	<i>leucine-rich repeat</i>
<b>M</b>	Mittelwert
<b>MAG</b>	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
<b>MAP</b>	<i>mitogen-activated protein</i>
<b>Max.</b>	Maximum
<b>MBP</b>	Myelin-Basisches Protein
<b>Mdn.</b>	Median
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesium
<b>mg</b>	Milligramm
<b>Min.</b>	Minimum
<b>min</b>	Minute(n)
<b>mM</b>	Millimol
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MOG</b>	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>ml</b>	Milliliter
<b>n</b>	Anzahl/Stichprobenumfang
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NF</b>	Neurofilament
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NGF</b>	<i>nerve growth factor</i>
<b>NgR</b>	Nogo-66-Rezeptor
<b>NG2</b>	<i>neural/glial antigen 2</i>
<b>nM</b>	Nanomol
<b>Nogo</b>	<i>neurite outgrowth inhibitor</i>
<b>OPC</b>	<i>oligodendrocyte progenitor cell</i>
<b>OSC</b>	<i>organotypic brain slice culture</i>
<b>p</b>	p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	<i>potentia hydrogenii</i>
<b>PLL</b>	Poly-L-Lysin
<b>PLP</b>	Proteolipid Protein
<b>px</b>	Pixel
<b>p75NTR/ p75</b>	p75 Neurotrophin Rezeptor
<b>Ras</b>	<i>rat sarcoma</i>
<b>RhoA</b>	<i>rat sarcoma homologue A</i>
<b>RhoGDI</b>	<i>RhoGDP dissociation inhibitor</i>

<b>RIPA</b>	Radioimmunopräzipitation- <i>Assay</i>
<b>ROCK</b>	<i>rho-associated coiled-coil-containing protein kinase</i>
<b>RRMS</b>	<i>relapsing remitting multiple sclerosis</i>
<b>SCC</b>	<i>spinal cord culture</i>
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SD-(Solution)</b>	<i>soybean trypsin inhibitor solution</i>
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Tbl.</b>	Tablette
<b>T3</b>	Triiodthyronin
<b>U</b>	Units (Enzymaktivität)
<b>vs.</b>	<i>versus</i>
<b>ZETT</b>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>%</b>	Prozent
<b>3D</b>	dreidimensional

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entwicklung und Aufbau der Myelinscheide im ZNS	1
1.1.1	Oligodendrozyten	1
1.1.2	Myelin	2
1.1.3	Myelinisierung	2
1.2	Multiple Sklerose – Beispiel einer demyelinisierenden ZNS-Erkrankung	3
1.3	Versuchsmodelle in der MS-Forschung	5
1.3.1	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	5
1.3.2	Myelinisierende Rückenmarkskulturen (SCCs)	5
1.4	Einflussfaktoren der primären und sekundären Myelinisierung	6
1.4.1	LINGO-1	6
1.4.2	Aufbau des LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes	7
1.4.3	Wirkweise des LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes	8
1.4.4	Einfluss des ErbB2-Signalweges auf die OPC-Differenzierung	9
1.5	Anti-LINGO-1 Antikörper als alternativer Therapieansatz bei demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen	10
1.5.1	Funktionsweise der Antikörper 1A7, Li03 und Li81	10
1.5.2	SYNERGY-Studie zu Li81 (Opicinumab)	12
1.6	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Materialien	14
2.1.1	Laborgeräte	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Substanzen	17
2.1.4	Testsubstanzen	20
2.1.5	Kits	20
2.1.6	Antikörper zur immunhistochemischen Färbung und Western Blot Analyse	21
2.1.7	Programme	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Tierhaltung und -tötung zur Organentnahme	24
2.2.2	Präparation und Kultivierung von SCCs	24
2.2.3	Western Blot	27
2.2.4	Versuchsaufbau	28
2.2.4.1	Allgemeines	28

2.2.4.2	Vorversuche zu den Kontrollgruppen	29
2.2.4.3	Anti-LINGO-1 Experiment	29
2.2.5	Immunhistochemische Färbung	29
2.2.6	Bildgebung und Quantifizierung des anti-LINGO-1 Experiments	30
2.2.7	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Western Blot Analyse	33
3.2	Vorversuche zu den Kontrollgruppen	34
3.3	Anti-LINGO-1 Experiment	38
3.3.1	Allgemeines	38
3.3.2	Myelinisierungsgrad	40
3.3.3	Axonales Netzwerk	42
3.3.4	Gesamtzellzahl	44
3.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	46
4	Diskussion	48
4.1	Aufbau des anti-LINGO-1 Experiments	48
4.2	Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf die primäre Myelinisierung	49
4.3	Modell der SCC als Hochdurchsatz-Screeningverfahren	52
4.4	Einschränkungen der Arbeit	53
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick in die Zukunft	55
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	57
6	Anhang	62
6.1	Auswertung Vorversuche (Mann-Whitney-U-Test)	62
6.2	Auswertung anti-LINGO-1 Experiment (Mann-Whitney-U-Test)	63

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Entwicklungsstadien der Oligodendrozyten

Abb. 1.2: Funktionsweise des ternären LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes

Abb. 1.3: Bindungsmodelle des Li81-LINGO-1 Tetramers

Abb. 2.1: Präparationsschritte zur Gewinnung von Rückenmarkskulturen

Abb. 2.2: Zeitleiste zum Versuchsablauf

Abb. 2.3: Quantifizierung mithilfe des Operetta High Content Imaging Systems

Abb. 3.1: Western Blot mit Darstellung des LINGO-1 Expressionsmusters

Abb. 3.2: Vergleich der Kontrollgruppen bezogen auf den Myelinisierungsgrad

Abb. 3.3: Vergleich der Kontrollgruppen bezogen auf die Gesamtlänge der Axone

Abb. 3.4: Exemplarische Darstellung zur anti-LINGO-1 Versuchsreihe (Vorversuche)

Abb. 3.5: Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf den Myelinisierungsgrad

Abb. 3.6: Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf die Gesamtlänge der Axone

Abb. 3.7: Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf die Gesamtzellzahl

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Laborgeräte

Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste der Substanzen

Tabelle 4: Liste der Testsubstanzen

Tabelle 5: Liste der Kits

Tabelle 6: Liste der primären Antikörper zur immunhistochemischen Färbung

Tabelle 7: Liste der sekundären Antikörper zur immunhistochemischen Färbung

Tabelle 8: Liste der primären Antikörper zur Western Blot Analyse

Tabelle 9: Liste der sekundären Antikörper zur Western Blot Analyse

Tabelle 10: Liste der Programme

Tabelle 11: Zusammensetzung des Plattierungsmediums

Tabelle 12: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums

Tabelle 13: Zusammensetzung des Hormon-Mix

Tabelle 14: Zusammensetzung der SD-Lösung

Tabelle 15: Liste der Puffer für die Western Blot Analyse

Tabelle 16: Liste der Puffer zur immunhistochemischen Färbung

Tabelle 17: Gruppenvergleich zwischen DIV 5-16 und DIV 19-30

Tabelle 18: Länge der myelinisierten Axone (Vorversuche)

Tabelle 19: Gesamtlänge der Axone (Vorversuche)

Tabelle 20: Myelinisierungsgrad (anti-LINGO-1 Experiment)

Tabelle 21: Gesamtlänge der Axone (anti-LINGO-1 Experiment)

Tabelle 22: Gesamtzellzahl (anti-LINGO-1 Experiment)

Tabelle 23: Vergleich der Kontrollgruppen bezogen auf den Myelinisierungsgrad

Tabelle 24: Vergleich der Kontrollgruppen bezogen auf die Gesamtlänge der Axone

Tabelle 25: Gruppenvergleich des Myelinisierungsgrades (anti-LINGO-1 Experiment)

Tabelle 26: Gruppenvergleich der Gesamtlänge der Axone (anti-LINGO-1 Experiment)

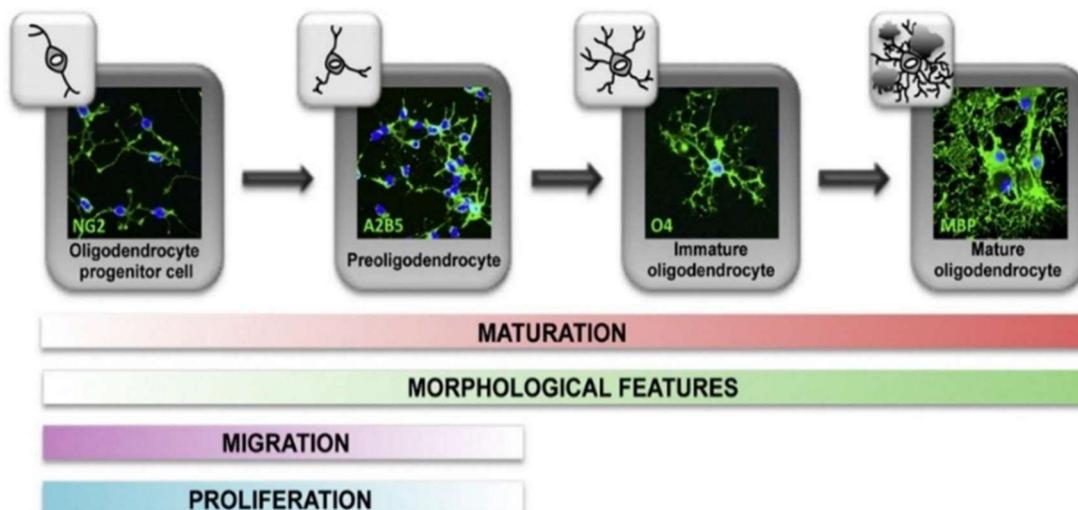
Tabelle 27: Gruppenvergleich der Gesamtzellzahl (anti-LINGO-1 Experiment)

## 1 Einleitung

### 1.1 Entwicklung und Aufbau der Myelinscheide im ZNS

#### 1.1.1 Oligodendrozyten

Die Myelinisierung von Axonen spielt für die Funktionsweise des menschlichen Nervensystems eine entscheidende Rolle. Diese Aufgabe wird im zentralen Nervensystem (ZNS) von Oligodendrozyten übernommen. Oligodendrozyten gehören zu den Gliazellen und entstammen dem Neurailepithel. In ihrer Entwicklung durchlaufen sie verschiedene Reifestadien, welche man anhand entwicklungspezifischer Marker (Proteine und Lipide) sowie morphologischer Charakteristika voneinander unterscheiden kann (siehe Abb. 1.1) (Barateiro and Fernandes, 2014). Die Zellstadien lassen sich in frühe und späte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte progenitor cells*, kurz OPCs und Pre-Oligodendrozyten), unreife (prämyelinisierende) und reife (myelinisierende) Oligodendrozyten unterteilen (Barateiro and Fernandes, 2014). Einige der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen differenzieren sich nicht und verbleiben in einem unreifen Entwicklungsstadium (Chang et al., 2000, Scolding et al., 1998). Ein Oligodendrozyt ist im Stande mehrere Zellfortsätze auszubilden, welche im Rahmen der Myelinisierung Segmente benachbarter Axone umhüllen können. Neben der Myelinbildung sind Oligodendrozyten durch den Austausch von Metaboliten an der Versorgung und Aufrechterhaltung des neuronalen Netzwerks beteiligt (Frühbeis et al., 2020, Lee et al., 2012).



#### Abb. 1.1: Entwicklungsstadien der Oligodendrozyten

Darstellung der entwicklungspezifischen Unterschiede von Oligodendrozyten. Die Markerproteine können als *Target* für immunhistochemische Färbungen genutzt werden.

A2B5: Gangliosid, MBP (*myelin basic protein*): Myelinprotein, NG2 (*neural/glial antigen 2*): Proteoglykan, O4: Sulfatid.

Abbildung modifiziert nach Barateiro and Fernandes, 2014, Nutzung genehmigt durch Elsevier.

### 1.1.2 Myelin

Unter Myelin versteht man im Wesentlichen eine mehrschichtige Biomembran, die von Fortsätzen der Oligodendrozyten gebildet wird. Die Zusammensetzung des Myelins unterscheidet sich deutlich von der anderer Biomembranen. Hauptbestandteil stellen mit bis zu 70-80% der Trockenmasse Lipide dar (Simons and Nave, 2015), unter denen Cholesterin, Galaktocerebroside und Phospholipide die größten Gruppen bilden (Quarles, 1999). Der Proteinanteil ist dagegen deutlich geringer. Hauptvertreter sind hier das Myelin-Basische Protein (MBP) sowie das Proteolipid Protein (PLP) (Quarles, 1999). Dem Myelin-assoziierten Glykoprotein (MAG) sowie dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) kommen eine besondere Bedeutung zu, da diese Proteine regulierende Funktionen bei der Regeneration des geschädigten ZNS einnehmen (Domeniconi et al., 2002, Liu et al., 2002, Wang et al., 2002b). Im Vergleich zur grauen Substanz des ZNS enthält das Myelin als Bestandteil der weißen Substanz einen geringeren Wasseranteil (Simons and Nave, 2015). Die Zusammensetzung der Myelinscheide erfüllt damit die Voraussetzungen einer elektrisch gut isolierenden und zugleich mechanisch stabilen Membran.

### 1.1.3 Myelinisierung

Die Myelinisierung ist ein komplexer Vorgang, der vereinfacht in die Abschnitte Migration, Proliferation sowie Differenzierung von OPCs, deren Membranwachstum, der Axonumhüllung und Myelinverdichtung sowie der Organisation der Ranvier-Schnürringen eingeteilt werden kann (Simons and Nave, 2015).

OPCs wandern ausgehend vom Neuraletpithel entlang der Faserstränge der sich entwickelnden weißen Substanz. Auf ihrem Weg durch das ZNS proliferieren die OPCs und reifen zu prämyelinisierenden Oligodendrozyten heran. Am Zielort differenziert sich ein Teil der Vorläuferzellen schließlich zu postmitotischen und myelinisierenden Oligodendrozyten (Simons and Nave, 2015). Die Interaktion zwischen Oligodendrozyt und Axonoberfläche führt schließlich zur Initiierung des Myelinisierungsvorgangs (Pedraza et al., 2014). Abschließend erfolgt die Verdichtung des Myelins. MBP besitzt eine tragende Rolle bei diesem Prozess. So konnte anhand von *shiverer* Mäusen (MBP-Nullmutanten) nachgewiesen werden, dass in Abwesenheit von MBP kaum kompakte Myelinschichten ausgebildet werden und es insgesamt zu einer verminderten Myelinisierung kommt (Privat et al., 1979).

## 1.2 Multiple Sklerose – Beispiel einer demyelinisierenden ZNS-Erkrankung

Die Neurologie umfasst eine Vielzahl an demyelinisierenden Erkrankungen des zentralen sowie peripheren Nervensystems. Unter verschiedenen Gesichtspunkten ist hierbei die Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata genannt, als chronisch-entzündliche und degenerative ZNS-Erkrankung hervorzuheben. Diese Arbeit wird dem Bereich der MS-Forschung zugeordnet, weshalb im Folgenden auf den aktuellen Erkenntnisstand sowie bisherige Therapieansätze der MS näher eingegangen wird.

Weltweit beträgt die Zahl der an MS erkrankten Menschen ungefähr 2,8 Millionen (MSIF, 2020) und ungefähr 10% der weltweit erkrankten Menschen leben allein in Deutschland (zusammengefasst in Holstiege et al., 2017). Die MS manifestiert sich häufig zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Hemmer and al., 2021). Aufgrund des frühen Krankheitsbeginns, der hohen Prävalenz in den Industrieländern und des häufig chronisch progredienten Verlaufs mit zunehmenden körperlichen Einschränkungen hat die MS eine hohe soziomedizinische Bedeutung (Flachenecker et al., 2017, zusammengefasst in Holstiege et al., 2017).

Pathophysiologisch zeichnet sich das Anfangsstadium durch multifokale Entmarkungsherde von Axonen, auch Plaques genannt, aus (Hufschmidt et al., 2017). Bei ausbleibender Remyelinisierung kommt es im weiteren Krankheitsverlauf zur Sklerosierung (Vernarbung) der Läsionsstellen durch Astrozyten und zur sekundären Schädigung der Axone (Hufschmidt et al., 2017). Insbesondere die axonalen Schäden und der daraus resultierende Untergang der betroffenen Neurone (Hirnatrophie) werden für die bleibenden kognitiven und körperlichen Einschränkungen verantwortlich gemacht (zusammengefasst in Criste et al., 2014, De Stefano et al., 1998, zusammengefasst in Hagemeyer et al., 2012 und, Kutzelnigg and Lassmann, 2005, Rudick et al., 2009). Die MS kann im Wesentlichen schubförmig oder (primär bzw. sekundär) progredient mit oder ohne aufgesetzte Schübe verlaufen. Ebenfalls charakteristisch für die MS ist eine Störung der Blut-Hirn-Schranke sowie die intrathekale Synthese von Immunglobulinen, welche sich als oligoklonale Banden liquorchemisch nachweisen lassen (zusammengefasst in Deisenhammer et al., 2019, Lowenthal et al., 1960).

Die derzeitigen therapeutischen Ansätze der MS werden in Schubtherapie sowie in Immuntherapie unterteilt (Hemmer and al., 2021). Die Schubtherapie zielt darauf ab den Verlauf (klinisch schwerer) Schübe zu verkürzen und zu mildern, wodurch eine bessere Rückbildungstendenz der Beschwerden erreicht werden soll (Hufschmidt et al., 2017, Kim, 2020). Als Goldstandard gilt die Stoßtherapie mit Methylprednisolon über mindestens 3-5 Tage (Hemmer and al., 2021). Zur Therapieeskalation bei schweren Schüben ohne wesentliche Rückbildungstendenz unter Kortisontherapie wird die Plasmapherese oder Immunadsorption individuell empfohlen (Hemmer and al., 2021). Die Immuntherapie umfasst inzwischen eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkstoffe, welche nach individuellen Krankheitsverlauf,

Verträglichkeit und Therapieerfolg zum Einsatz kommen sollten. Allgemeines Ziel der Immuntherapie ist es den Krankheitsverlauf der MS zu modifizieren, sodass (schwere) kognitive und körperliche Einschränkungen abgewendet oder zumindest verzögert werden (Hemmer and al., 2021). Eine Heilung ist zum aktuellen Zeitpunkt jedoch nicht möglich. Insbesondere wird der Progress der Beschwerden bei der schubförmigen Verlaufsform (*relapsing remitting multiple sclerosis*, kurz RRMS) verlangsamt, wohingegen die Effekte auf die primär- und auch sekundär-progredienten Verlaufsformen als äußerst gering einzuschätzen sind (zusammengefasst in Bates, 2011). Darüber hinaus sind auch schwere Nebenwirkungen, besonders unter dem Einsatz (hochpotenter) immunmodulatorisch wirkender Antikörper zu beachten. Die Nebenwirkungen lassen sich oftmals direkt auf die Hemmung des Immunsystems zurückführen (Hemmer and al., 2021). Hierzu zählt insbesondere das Auftreten opportunistischer Infektionen einschließlich der therapieassoziierten progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (unter Natalizumab), welche durch eine Infektion mit dem JC-Virus bzw. dessen Reaktivierung (nach zuvor latenter Infektion) hervorgerufen wird und gegen die bislang keine wirksame Therapie zur Verfügung steht (Hufschmidt et al., 2017, zusammengefasst in Schwab et al., 2018). Die Remission der Symptome unter den oben genannten Therapieansätzen kann nach aktuellem Kenntnisstand nicht (sicher) auf eine therapiebedingte Verstärkung von Reparationsvorgängen zurückgeführt werden, sondern beruht vielmehr auf einer Abschwächung der Entzündungsreaktion, wodurch die körpereigene Reparatur begünstigt werden soll (Hemmer and al., 2021, Kim, 2020).

Die Remyelinisierung wird u.a. auf die im (adulten) ZNS persistierenden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zurückgeführt (Gensert and Goldman, 1997, zusammengefasst in Gruchot et al., 2019, Kuhlmann et al., 2008), welche sich auch in MS-Plaques nachweisen lassen (Chang et al., 2000, Scolding et al., 1998). Die körpereigene Regeneration ist jedoch von Beginn an begrenzt (Blakemore, 1974) und es gibt Hinweise, dass die Fähigkeit zur Remyelinisierung im weiteren Krankheitsverlauf stetig abnimmt (Goldschmidt et al., 2009). Als ursächlich hierfür wird u.a. die eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit der residenten OPCs zu reifen (myelinisierenden) Oligodendrozyten angesehen (Kuhlmann et al., 2008).

Die dahinterstehenden Mechanismen sind sehr komplex und noch unzureichend verstanden. Die MS-Forschung beschäftigt sich u.a. mit der RhoA/ROCK-Signalkaskade (RhoA: *rat sarcoma homologue A*, ROCK: *rho-associated coiled-coil-containing protein kinase*) sowie der daran beteiligten Rezeptoren wie dem LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplex. Die Blockade der RhoA/ROCK-Signalkaskade führte in Experimenten an Ratten zur vermehrten Differenzierung von OPCs am Läsionsort sowie einer stärkeren Remyelinisierung (Pedraza et al., 2014). Diese Erkenntnisse stellen einen alternativen therapeutischen Ansatz mit Fokus auf einer verbesserten Regeneration von Axonen und somit geringen Behinderung der MS-Patienten dar. In Abschnitt 1.4.3 wird näher auf die Wirkweise des LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes eingegangen.

### 1.3 Versuchsmodelle in der MS-Forschung

#### 1.3.1 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

In der MS-Forschung gilt das Tierversuchsmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) als Goldstandard. Grundsätzlich lässt sich die EAE in eine aktive und passive Form unterteilen. Bei der passiven Form wird den Versuchstieren, meist Nagetieren oder auch nichtmenschlichen Primaten, T-Zellen injiziert, welche zuvor gegen Myelinbestandteile wie z.B. MBP oder Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) aktiviert worden sind (Paterson 1960, zusammengefasst in Stromnes and Goverman, 2006b). Dagegen basiert die aktive Form auf die Induktion einer Antigen-vermittelten Immunreaktion durch direkte Injektion von Antigenen (zusammengefasst in Mix et al., 2010, und in Stromnes and Goverman, 2006a). Beide EAE-Modelle führen zu einer T-Zell initiierten Autoimmunentzündung. Anhand eines EAE-Score-Systems wird der Krankheitsverlauf sowie die Wirksamkeit der zu untersuchenden Therapeutika quantifiziert. Nach Ablauf des Untersuchungszeitraums werden die Versuchstiere zur weiteren histologischen Untersuchung getötet. Das Modell der EAE ist gut etabliert und wird stetig weiterentwickelt. Unter Einsatz verschiedener Auto-Antigene und Tierstämme lassen sich diverse Verlaufsformen bzw. unterschiedliche Immunmechanismen der EAE hervorrufen sowie gezielt untersuchen (zusammengefasst in Merrill, 2009, und in Mix et al., 2010). Allerdings können mit einem EAE-Modell nicht alle Aspekte der komplexen MS-Vorgänge nachgebildet werden. Darüber hinaus eignen sich im EAE-Modell erfolgreich getestete Substanzen aufgrund schwerer Nebenwirkungen oder fehlender Wirksamkeit bei MS-Patienten oftmals nicht als Therapeutikum (zusammengefasst in Kipp et al., 2012, und in Sriram and Steiner, 2005). Aufgrund der Komplexität der dahinterstehenden Immunmechanismen erfordert das Modell der EAE eine Vielzahl an Versuchstieren. Neben den damit verbundenen hohen Kosten und dem immensen Zeitaufwand geht das EAE-Modell mit großen Belastungen für die Versuchstiere einher.

#### 1.3.2 Myelinisierende Rückenmarkskulturen (SCCs)

Alternativ zur EAE stehen auch Zell- oder Gewebeschnittkulturen sowohl der Grundlagen- als auch MS-Forschung zur Verfügung. Diese Arbeit beschäftigt sich mit myelinisierenden Rückenmarkskulturen (*spinal cord cultures*, kurz SCCs). Hierbei werden aus murinen Embryonen an Tag 13,5 Rückenmarkszellen gewonnen und auf Mikrotiterplatten kultiviert (Methode nach Thomson et al., 2008). Bereits nach wenigen Stunden in Kultur beginnt die Vernetzung zwischen den Neuronen. Nach einer Woche hat sich das neuronale Netzwerk vollständig entwickelt und ab Woche 3 in Kultur setzt die Myelinisierung ein (Thomson et al., 2008). In den Wochen 4 bis 5 erreicht die Myelinisierung ihr Maximum (Thomson et al., 2008).

Durch immunhistochemische Färbung lassen sich Myelin, Neurofilament sowie die Zellkörper darstellen und quantifizieren. Zur Gewinnung der Zellkulturen müssen ebenfalls Tiere getötet werden, allerdings werden verglichen mit dem EAE-Modell insgesamt weniger Versuchstiere benötigt. Außerdem geht die direkte Tötung zur Organentnahme mit einem geringeren Tierleid einher. Zellkulturen lassen sich zudem in einer definierten Umgebung kultivieren und Effekte können besser auf äußere Einflussgrößen zurückgeführt werden (Merrill, 2009).

## 1.4 Einflussfaktoren der primären und sekundären Myelinisierung

### 1.4.1 LINGO-1

Myelinisierungsvorgänge unterliegen Regulationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen wie z.B. der Differenzierung von Oligodendrozyten oder der Synthese von Myelinkomponenten. Dazu zählen auch inhibierend wirkende Mechanismen, welche für eine koordinierte Entwicklung des ZNS wichtig sind. Zugleich stehen diese Inhibitoren im wissenschaftlichen Fokus von gestörten Reparationsvorgängen. Ein Beispiel für einen solchen Inhibitor im ZNS stellt das *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1* (LINGO-1) dar, welches im Mittelpunkt dieser Arbeit steht.

Die Familie der LINGO-Proteine besteht aus den vier Subtypen LINGO-1, -2, -3 und -4 (Mi et al., 2004). Dem LINGO-1 kommt eine besondere Bedeutung zu, da es im Vergleich zu den anderen Subtypen ausschließlich in Nervengewebe exprimiert wird (Mi et al., 2004). Es setzt sich aus einer extra- sowie einer intrazellulären Domäne zusammen, welche durch eine Transmembranregion miteinander verbunden sind (Mi et al., 2004). Die extrazelluläre Domäne besteht im Wesentlichen aus dem namensgebenden Leucin-reichen Strukturmotiv und einem Immunglobulin-Abschnitt, welche zusammen u.a. für die Interaktion mit Molekülen bzw. Co-Rezeptoren mitverantwortlich sind (zusammengefasst in Kobe and Kajava, 2001, Mosyak et al., 2006, Pepinsky et al., 2014). Die zytoplasmatische Domäne enthält eine Tyrosinkinase, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt ist (Mi et al., 2004). Als ZNS-spezifisches Transmembranprotein wird LINGO-1 von Oligodendrozyten und Neuronen exprimiert, wobei OPCs eine besonders starke LINGO-1 Expression aufweisen (Mi et al., 2008).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von LINGO-1 in späteren Entwicklungsstadien deutlich abnimmt (Mi et al., 2004). Allerdings konnten in spinalen Läsionen adulter Ratten sowie in MS-Läsionen der weißen Substanz des Menschen wieder ein Anstieg der LINGO-1 Konzentrationen nachgewiesen werden (Mi et al., 2004, Mi et al., 2008).

Als multifunktionelles Regulatorprotein beeinflusst LINGO-1 in Zusammenspiel mit einigen bekannten Co-Rezeptoren, aber auch unabhängig hiervon, neben der Zellapoptose insbesondere das Neuritenwachstum, die Differenzierung von Oligodendrozyten und damit die Myelinisierung

(Ji et al., 2006, Mi et al., 2005, zusammengefasst in Mi et al., 2008). Diese Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass LINGO-1 aufgrund seiner inhibierenden Effekte für einen geregelten Ablauf der neuronalen Entwicklung entscheidend ist. LINGO-1 nimmt aber als Inhibitor der Myelinisierung auch bei demyelinisierenden Erkrankungen eine Schlüsselfunktion ein. Diese Regulationsvorgänge werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

#### 1.4.2 Aufbau des LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes

LINGO-1 ist funktioneller Bestandteil des ternären LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes, welcher nach Ligandenbindung seine regulierende Funktion im ZNS einnimmt. Im Folgenden wird kurz auf die weiteren Bestandteile dieses Komplexes eingegangen, um anschließend deren Wirkweise im Rezeptorkomplex näher zu erläutern.

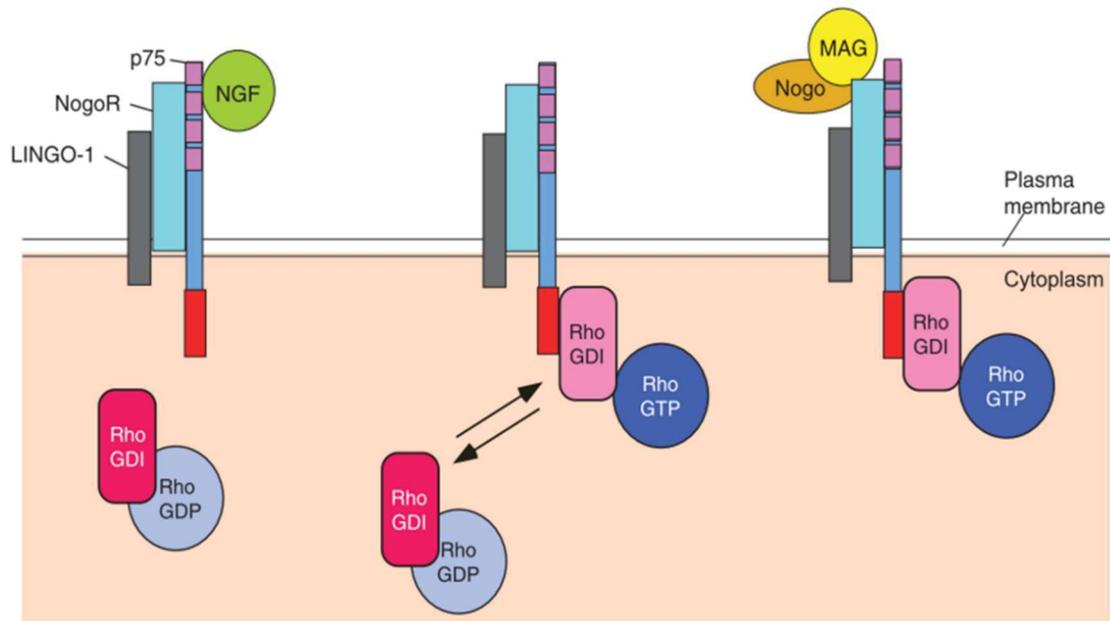
Der Nogo-66-Rezeptor (kurz NgR) ist ähnlich wie LINGO-1 ein Leucin-reiches Membranprotein im ZNS (Fournier et al., 2001). Neben MAG und MOG bindet das Protein Nogo (*neurite outgrowth inhibitor*) an diesem Rezeptor und zusammen hemmen die genannten Myelinkomponenten die axonale Regeneration (Chong et al., 2012, Domeniconi et al., 2002, Fournier et al., 2001, Fournier et al., 2002, Liu et al., 2002, Wang et al., 2002b, Wang et al., 2002a). Der NgR besitzt keine intrazelluläre Domäne, sodass eine Signalweiterleitung nach Ligandenbindung erst durch Interaktion mit anderen Co-Rezeptoren erfolgen kann (Mathew et al., 2009, Mi et al., 2004).

Der p75 Neurotrophin Rezeptor (p75NTR oder p75) gehört zur großen Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren. Zu den Liganden dieses Rezeptors zählen neurotrophe Faktoren wie z.B. NGF (*nerve growth factor*) und BDNF (*brain-derived neurothrophic factor*) (Rodriguez-Tébar and Barde, 1988, Rodriguez-Tébar et al., 1990). Der p75-Rezeptor wird in eine extra- sowie in eine intrazelluläre Domäne unterteilt. Der extrazelluläre Abschnitt zeichnet sich durch zahlreiche Cystein-Wiederholungen aus, welche wichtig für die Ligandenbindung sind (Yan and Chao, 1991). Die intrazelluläre Domäne wird auch als *death domain* bezeichnet (Chapman, 1995, Liepinsh et al., 1997). Für die Bindung von Neurotrophinen an p75 wurden unterschiedliche Effektmeechanismen beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Bindung von Neurotrophinen an p75 der programmierte Zelltod initiiert werden kann (Casaccia-Bonnet et al., 1996, Friedman, 2000). Im Gegensatz dazu kann aber die Bindung von Neurotrophinen an p75 auch zum Neuritenwachstum führen, vorausgesetzt p75 interagiert mit bestimmten Co-Rezeptoren (Mathew et al., 2009). Neben der jeweiligen Ligandenbindung und Interaktion mit Co-Rezeptoren nehmen Zelltyp und Entwicklungsstadium der Zelle Einfluss auf die durch p75 vermittelten Effekte (zusammengefasst in Friedman and Greene, 1999). Hieraus lässt sich ableiten, dass p75 ebenfalls eine wichtige Rolle für eine regulierte Zellentwicklung einnimmt.

### 1.4.3 Wirkweise des LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes

Die Schädigung von myelinisierten Axonen führt zur Freisetzung von Myelinkomponenten wie MAG, MOG oder Nogo. Die Bindung einer dieser Myelinkomponenten an den NgR verstärkt die Interaktion zwischen den Rezeptorpartnern des LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes (Wang et al., 2002a). Die intrazelluläre Signaltransduktion des ternären Komplexes führt zur Inhibition des an der *death domain* gebundenen RhoGDI (*RhoGDP dissociation inhibitor*) (Mathew et al., 2009, Yamashita and Tohyama, 2003). Die Inhibition von RhoGDI hat zur Folge, dass das an RhoA gebundene Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht werden kann, wodurch letztendlich RhoA in die aktive Form (RhoA-GTP) überführt wird (Mathew et al., 2009). Durch Interaktion zwischen RhoA und weiteren Kinasen, wie z.B. ROCK, wird die Signalkaskade fortgesetzt, welche schließlich in einer Hemmung der OPC-Differenzierung (Paintlia et al., 2005, Paintlia et al., 2008, Pedraza et al., 2014) sowie des Neuritenwachstums (zusammengefasst in Gallo and Letourneau, 2004, Katoh et al., 1996, Katoh et al., 1998) mündet. Die Bindung von NGF an den ternären Komplex führt im Gegensatz zu den Myelin-assoziierten Inhibitoren zur Stabilisierung des RhoGDI-RhoA-Komplexes, wodurch kein Austausch von GDP durch GTP an RhoA erfolgen kann. RhoA verbleibt in der inaktiven Form, was ein gesteigertes Neuritenwachstum sowie eine verstärkte Zelldifferenzierung zur Folge hat (Mathew et al., 2009). Die OPC-Differenzierung und das Neuritenwachstum können somit durch Bindung von NGF über den LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor Signalweg auch verstärkt werden. Die oben genannten Signalkaskaden werden in Abb. 1.2 zusammenfassend dargestellt.

Der LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor ruft im Wesentlichen durch Bindung von Myelinbestandteilen seinen inhibierend wirkenden Effekt hervor, sodass diesem Rezeptorkomplex vorwiegend Bedeutung im Rahmen von Schädigungen im ZNS zukommt. Allerdings konnte an Mäusen gezeigt werden, dass durch Ausschaltung des LINGO-1 Gens (LINGO-1 *knock-out* Mäuse) die primäre Myelinisierung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich gesteigert wird (Mi et al., 2005). Dieser Beobachtung müssen entsprechend zusätzliche LINGO-1 Mechanismen zugrunde liegen, welche insbesondere die primäre Myelinisierung betreffen.



**Abb. 1.2: Funktionsweise des ternären LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes**

Links: Die RhoA-Kinase bleibt nach Bindung von NGF an RhoGDI gebunden und ist somit inaktiv (GDP-Status).

Mitte: Bei fehlender Ligandenbindung besteht ein Gleichgewicht zwischen RhoGTP- und -GDP-Status.

Rechts: Die Bindung von Myelininhibitoren am Nogo-66-Rezeptor führt zum Austausch von GDP durch GTP und RhoA wird aktiviert. Über weitere Signalkaskaden kommt es zur Stabilisierung des Zytoskeletts, wodurch das Neuritenwachstum und die Zelldifferenzierung gehemmt werden.

GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintriphosphat, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, MAG: Myelin-assoziiertes Glykoprotein, NGF: *nerve growth factor*, Nogo: *neurite outgrowth inhibitor*, NogoR: Nogo-66-Rezeptor, p75: Neurotrophinrezeptor, RhoA: *rat sarcoma homologue A*, RhoGDI: *Rho GDP dissociation inhibitor*.

Abbildung modifiziert nach Mathew et al., 2009, Nutzung genehmigt durch The Journal of Cell Science.

#### 1.4.4 Einfluss des ErbB2-Signalweges auf die OPC-Differenzierung

ErbB2 (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) gehört als Mitglied der ErbB-Familie zu den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (Scaltriti and Baselga, 2006). Im ZNS konnte ErbB2 u.a. in Oligodendrozyten und Astrozyten nachgewiesen werden (Park et al., 2001, Vartanian et al., 1997). Die extrazelluläre Domäne von ErbB2 weist eine Cystein-Wiederholungssequenz auf, die an der Ligandenbindung beteiligt ist und zur Signalweiterleitung verfügt ErbB2 intrazellulär über eine autophosphorylierende Tyrosinkinase (zusammengefasst in Yarden and Sliwkowski, 2001).

Das Wirkprinzip der ErbB-Rezeptoren kann vereinfacht wie folgt dargestellt werden: Die Bindung eines Liganden führt zur homologen bzw. heterologen Dimerisierung von zwei ErbB-

Rezeptor-Subtypen sowie zu deren Phosphorylierung. Hierdurch kommt es zur Interaktion mit Adapterproteinen bzw. Enzymen, wodurch, abhängig vom Liganden und den beteiligten Partnern, eine von zahlreichen intrazellulären Signalkaskaden in Gang gesetzt wird (zusammengefasst in Yarden and Sliwkowski, 2001). Durch Aktivierung von ErbB2 kommt es über den Ras-MAP-Kinase Signalweg (Ras: *rat sarcoma*, MAP: *mitogen-activated protein*) zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und zur Veränderung der Genexpression (zusammengefasst in Yarden and Sliwkowski, 2001). Im Falle der Oligodendrozyten führt dies vor allem zur (terminalen) Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu reifen (myelinisierenden) Oligodendrozyten (Kim et al., 2003, Park et al., 2001). Anhand von transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des ErbB2-Rezeptors neben einer reduzierten Anzahl an reifen Oligodendrozyten auch eine Hypomyelinisierung zur Folge hat (Kim et al., 2003). Zusammengefasst nimmt ErbB2 entscheidenden Einfluss auf die (terminale) Entwicklung der Oligodendrozyten und damit auf die primäre Myelinisierung. Durch direkte Bindung von LINGO-1 am ErbB2-Rezeptor wird dessen hemmende Wirkung auf die ErbB2-vermittelte Oligodendrozyten-Differenzierung und Myelinisierung hervorgerufen (Lee et al., 2014). Die Gesamtkonzentration an ErbB2-Rezeptoren in der Membran von Oligodendrozyten bleibt hierbei unverändert. Allerdings wird durch LINGO-1 die Verschiebung von ErbB2 in die *lipid rafts* (Lipidflöße) blockiert (Lee et al., 2014). Außerhalb der *lipid rafts* wird ErbB2 weniger phosphoryliert und weist damit eine geringere Aktivität auf. Eine verminderte Expression von LINGO-1 bzw. dessen Blockierung begünstigt die Lokalisation von ErbB2 in den *lipid rafts*, welche letztlich essenziell für den durch ErbB2 vermittelten Effekt auf die Oligodendrozyten-Differenzierung ist (Lee et al., 2014).

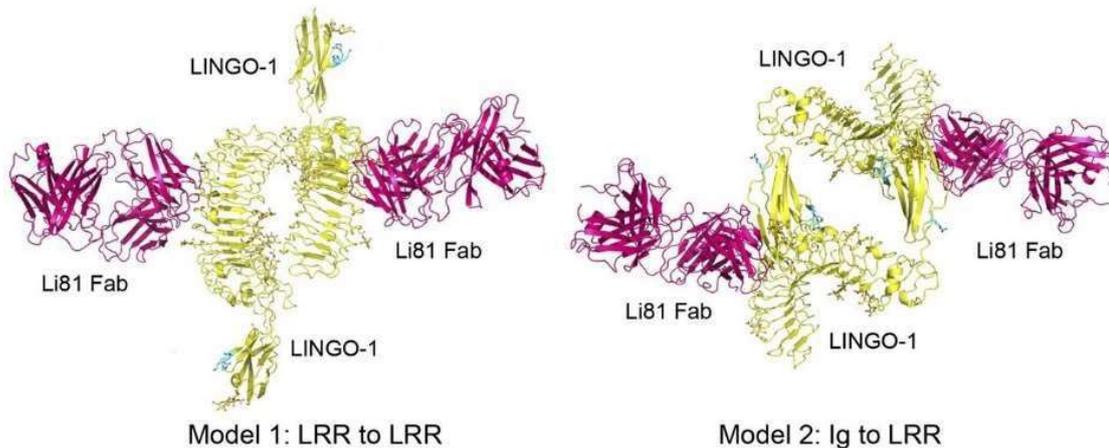
## 1.5 Anti-LINGO-1 Antikörper als alternativer Therapieansatz bei demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen

### 1.5.1 Funktionsweise der Antikörper 1A7, Li03 und Li81

Die antagonistischen anti-LINGO-1 Antikörper 1A7, Li03 und Li81 (letzterer auch Opicinumab genannt) sind vom Pharma-Unternehmen Biogen entwickelt worden.

1A7 ist ein monoklonaler Immunglobulin G (IgG)-Antikörper, der durch die Immunisierung von Mäusen mit LINGO-1 Fc (*fragment crystallizable*) gewonnen wurde (Fu et al., 2008, Mi et al., 2019) und einen der ersten Prototypen der anti-LINGO-1 Antikörper darstellt (Fu et al., 2008, Mi et al., 2009). 1A7 bindet direkt an der Ig-Domäne von LINGO-1, wodurch die Interaktion mit Co-Rezeptoren und damit die Aktivität von LINGO-1 blockiert werden soll (Mi et al., 2019, Mosyak et al., 2006, Pepinsky et al., 2014). Hierbei bindet ein 1A7-Antikörper-Molekül an der Ig-Domäne eines LINGO-1 Proteins (1:1-Bindungsmodus) (Pepinsky et al., 2014). Aufgrund der im

Vergleich zum Li81 schlechteren Bindungsaffinität zu LINGO-1 wurde 1A7 mit der Zeit durch Li81 vollständig ersetzt (Pepinsky et al., 2014). Li03 und Li81 sind rekombinante humane Antikörper. Das primäre Epitop stellt bei beiden Antikörpern das *leucine-rich repeat* (LRR)-Motiv und nicht die Ig-Domäne dar (Mi et al., 2019). Für Li03 sind allerdings keine näheren Angaben über die Bindungseigenschaften und die Wirkweise publiziert worden. Die alleinige Blockierung der LRR-Domäne kann jedoch nicht den inhibierenden Effekt der Antikörper-Behandlung erklären, da LINGO-1 trotz Ausschaltung der LRR-Domäne seinen inhibierenden Effekt auf die Oligodendrozyten-Differenzierung beibehält (Bourikas et al., 2010). Die LRR-Region spielt vielmehr eine wichtige Rolle für die Konfiguration von LINGO-1. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die LRR-Region von LINGO-1 eine (homologe) Oligomerisierung von vier LINGO-1 Proteinen begünstigt wird (Mosyak et al., 2006, Pepinsky et al., 2014). Hierbei sind die Ig-Domänen nach außen gerichtet und frei zugänglich. Es wird angenommen, dass diese Konfiguration die Interaktion mit Co-Rezeptoren begünstigt (Mosyak et al., 2006). Strukturanalysen konnten zeigen, dass die homologe Tetramerisierung von LINGO-1 durch den Einfluss von Li81 aufgehoben wird und sich stattdessen ein ebenfalls ringförmiger Komplex aus LINGO-1 und Li81 bildet (Pepinsky et al., 2014). Hierbei binden zwei Li81-Antikörper-Moleküle an die LRR-Domäne von zwei LINGO-1 Proteinen (2:2-Bindungsmodus) (Pepinsky et al., 2014). Zwei verschiedene Konfigurationen konnten hierfür vorhergesagt werden (siehe Abb. 1.3). In Modell 1 besteht die Verbindung der beiden LINGO-1 Proteine zwischen den jeweiligen Enden des LRR-Motivs, sodass die Ig-Domänen nach außen gerichtet sind. In Modell 2 gehen die Ig- sowie LRR-Domänen des jeweils benachbarten LINGO-1 Proteins untereinander eine Bindung ein, wodurch sich die Ig-Domänen im Inneren dieses Komplexes befinden. In beiden Modellen bindet Li81 an die nach außen gerichtete, konvexe Seite der LRR-Wiederholungssequenz und sorgt damit für die Stabilisierung dieses Komplexes (Pepinsky et al., 2014). Biochemische Untersuchungen und Funktionsanalysen konnten beweisen, dass die Ig-Domänen im LINGO-1/Li81-Komplex nicht frei zugänglich sind (Pepinsky et al., 2014). Diese Ergebnisse sprechen für Modell 2, da hier die Ig-Domänen ins Innere des LINGO-1/Li81-Komplexes verlagert und damit verdeckt werden. Zusammengefasst wird die Ig-Domäne von LINGO-1 durch Li81 sterisch blockiert, wodurch die Interaktion mit anderen Rezeptoren und damit die Aktivität von LINGO-1 gehemmt wird (Pepinsky et al., 2014).



**Abb. 1.3: Bindungsmodelle des Li81-LINGO-1 Tetramers**

Li81 (pink dargestellt) bindet in beiden Modellen an die konvexe Seite der LRR-Wiederholungssequenz von LINGO-1 (gelb dargestellt) und stabilisiert somit die jeweilige Konfiguration.

Modell 1: Bindung zweier LINGO-1 Proteine über die jeweiligen Enden der LRR-Domänen. Die Ig-Domänen sind hierbei nach außen gerichtet und frei zugänglich.

Modell 2: Bindung der LINGO-1 Proteine zwischen der Ig- und der LRR-Domäne des jeweils benachbarten LINGO-1 Proteins. Die Ig-Domänen sind ins Innere des Tetramers verlagert und somit nicht frei zugänglich.

Fab: *fragment antigen binding*, Ig: Immunglobulin, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, Li81: Opicinumab, LRR: *leucine-rich repeat*.

Abbildung modifiziert nach Pepinsky et al., 2014, Nutzung genehmigt durch The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

### 1.5.2 SYNERGY-Studie zu Li81 (Opicinumab)

Li81 (Opicinumab) wurde aufgrund einer nachweislich gesteigerten Myelinisierung in präklinischen Versuchen für klinische Studien freigegeben. In der SYNERGY-Studie (2013) wurde die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Li81 intravenös (i.v.) (alle 4 Wochen über insgesamt 72 Wochen) in unterschiedlichen Dosierungen im Vergleich zu einem Placebo untersucht (Cadavid et al., 2019). Sowohl die Placebo- als auch die Li81-Behandlungsgruppe erhielten zudem eine Basistherapie mit Interferon beta-1a (Avonex®; einmal wöchentlich). In die Studie wurden 419 an MS erkrankte Probanden eingeschlossen. Die Probanden waren zwischen 18-58 Jahre alt und der EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) betrug im Schnitt 3 Punkte. Neben dem EDSS-Wert diente eine Kombination verschiedener Tests (25-Fußgehtest, der *Nine-Hole-Peg-Test* und der *3-Second-Paced Auditory Serial Addition Test*) als Messinstrument. Eine Wirksamkeit lag vor, wenn über drei Monate der EDSS-Wert um mindestens einen Punkt sank und/oder ein mindestens 15% besseres Ergebnis in einem der anderen Tests erreicht wurde. Eine mittlere Dosierung mit 10 sowie 30 mg Li81/kg Körpergewicht (KG) zeigte im Vergleich zur Placebogruppe einen stärkeren Rückgang der Symptome (63% bzw. 65% *versus* (vs.) 49% der

Patienten unter Placebo). Dagegen wies eine Dosierung von 3 mg/kg KG zum Placebo keinen wesentlichen Unterschied auf (47% vs. 49%). Entgegen den präklinischen Studienergebnissen bildeten sich die Beschwerden in der Probandengruppe, die die hochdosierte Behandlung mit Li81 (100 mg/kg KG) erhielt, weniger zurück (40% vs. 49%). Nur für die Gruppe mit 30 mg Li81/kg KG waren die Ergebnisse statistisch signifikant. Insgesamt schienen insbesondere jüngere RRMS-Patienten im frühen Krankheitsstadium sowie mit gering ausgeprägter Hirnatrophie von der Li81-Behandlung zu profitieren (Müller, 2016). Die Ergebnisse deuten nicht auf eine lineare, sondern auf eine inverse U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung hin (Cadavid et al., 2019). Die hierfür zugrunde liegende Ursache ist bislang nicht geklärt.

### 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Hochdurchsatz-Screeningverfahrens auf Grundlage von myelinisierenden SCCs. Für die Versuchsreihe setzten wir drei anti-LINGO-1 Antikörper Subtypen ein. Dabei galt es folgende Fragen zu behandeln:

- 1) Hat der Einsatz der anti-LINGO-1 Antikörper einen positiven Einfluss auf die Myelinisierung von SCCs?
- 2) Eignet sich das SCC-Modell als Hochdurchsatz-Screeningverfahren und stellt es eine (unter ethischen und ökonomischen Gesichtspunkten) sinnvolle Ergänzung zur etablierten EAE in der MS-Forschung dar?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

**Tabelle 1: Liste der Laborgeräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Aspirationssystem, Vacusafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Autoklav Systec V-150	Systec, Linden, Deutschland
Automatischer Zellzähler, TC10	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator, BBD 6620	Heraeus, Hanau, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Hepa Class 100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Elektrophorese Netzteil, Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Flockeneisbereiter, AF100	Scotsman Ice, Mailand, Italien
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo, Moriguchi, Japan
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gelelektrophoresesystem, Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Geldokumentationssystem, Odyssey CLx	LI-COR, Lincoln, NE, USA
Gel Transfer System, Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock, ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hochdurchsatz Scanner System, Operetta CLS	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Inkubationshaube, TH 15	Huber & CO. AG, Reinach, Schweiz

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Inverses Lichtmikroskop, Leica DM IL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kaltlichtquelle, KL 1600 LED	Schott, Mainz, Deutschland
Kompaktschüttler, KS-15 control	Huber & CO. AG, Reinach, Schweiz
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	SKAN, Allschwil, Schweiz
Mikroplatten-Lesegerät, Tecan Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
pH-Elektrode	Hanna-Instrumente Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
pH-Meter, HI 221	Hanna-Instrumente Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
Pinzetten zur Gewebepreparation	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Pipette, Multipette M4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (10/100/200/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Scheren zur Gewebepreparation	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Schütteltisch	Bibby Scientific Ltd., Stone, England
Schütteltisch	Biometra, Göttingen, Deutschland
Spektralphotometer, Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortexer	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waage	Kern, Balingen, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge, 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifuge, Galaxy Mini Star silverline	VWR, Radnor, PA, USA
Zentrifuge, Minispin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmaterialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Dialysekassette, Slide-A-Lyzer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dispenser Spitzen, Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmal-Standardskalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Einweg Pasteurpipette (2,5 ml)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Multiwell-Zellkulturplatte (12-Well), Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Multiwell-Zellkulturplatte (96-Well), Falcon	VWR International, Radnor, PA, USA
Nadeln, Austerlitz Insect Pins	Entomoravia, Slavkov u Brna, Tschechien
PCR-Röhrchen, Sapphire	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10/20/100/200/1000 µl), TipOne	Starlab, Hamburg, Deutschland
Polypropylen Röhrchen, Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen (5/10/20/50 ml)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter, Aerodisc	Pall Corporation, Port Washington, NY, USA
Untersuchungshandschuhe	Ansell, Richmond, Australien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Vakuumfiltrationseinheit 0,2 µm, Filtropur (250/500 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Verschlussfolie, Parafilm	Pechinery Plastic Packaging, Akron, OH, USA
Zellkulturflaschen (40/200 ml), Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen, unbeschichtet (92 x 16 mm)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellsieb (70 µm), Corning	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zellzählkammer-Platte für TC10	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

### 2.1.3 Substanzen

**Tabelle 3: Liste der Substanzen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Demineralisiertes Wasser	Fischar GmbH & Co. KG., Saarbrücken, Deutschland
DNase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 1 g/l Glukose)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 4,5 g/l Glukose)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), frei von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol (absolut zur Analyse)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fertiggel, Mini-Protean TGX	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Hank's balanced salt solution (HBSS), frei von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hank's balanced salt solution (HBSS), mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Pufferlösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hydrokortison	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Insulin Lösung (Human)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isofluran	Piramal Critical Care GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase Typ I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Leibovitz's L15 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nuklease-freies Wasser, Ambion	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phosphatase-Inhibitor	Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA
Progesteron	Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA
Protease-Inhibitor	Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz
Proteinlade-Puffer (4X)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Putrescin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA
Radioimmunpräzipitation- <i>Assay</i> (RIPA)-Puffer (10X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Ladepuffer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Selenium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodium Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris/Glycerin Elektrophoresepuffer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Triton-X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin 2,5%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin Inhibitor (aus Soja)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 80	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vorgefärbt Protein Marker V peqGold	Peqlab Biotechnologie, Erlangen Deutschland
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.4 Testsubstanzen**Tabelle 4: Liste der Testsubstanzen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
3,3',5-Triod-L-Thyronin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1A7 P1AA0878-002 anti-LINGO-1 IgG (5,25 mg/ml)	Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz
Li03 P1AA0877-002 anti-LINGO-1 IgG (4,63 mg/ml)	Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz
Li81 LINGO-1-0001-0008 anti-LINGO-1 IgG (6,06 mg/ml)	Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz
IgG-Kontrolle (9,6 mg/ml)	Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz
Antikörper-Lösemittel (20 mM Histidin, 140 mM NaCl, pH 6,0)	Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz

Die anti-LINGO-1 Antikörper, das Antikörper-Lösemittel (*solvent control*) sowie die IgG-Kontrolle wurden uns im Rahmen der Zusammenarbeit mit der Firma F. Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Kits**Tabelle 5: Liste der Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BCA Assay zur Proteinquantifizierung	Interchim, Mannheim, Deutschland

2.1.6 Antikörper zur immunhistochemischen Färbung und Western Blot Analyse**Tabelle 6: Liste der primären Antikörper zur immunhistochemischen Färbung**

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
NF200	Maus	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:500
NF200	Hase	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:500
MBP	Ratte	Maus	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	1:500

**Tabelle 7: Liste der sekundären Antikörper zur immunhistochemischen Färbung**

<b>Konjugat</b>	<b>Spezies</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Cy3	Ziege	Ratte	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	1:500
Cy3	Ziege	Hase	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	1:500
Cy5	Ziege	Ratte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	1:500
Alexa Fluor 647	Ziege	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:500

**Tabelle 8: Liste der primären Antikörper zur Western Blot Analyse**

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
LINGO-1	Hase	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
β-Actin	Maus	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:5000
MBP	Ratte	Maus	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	1:1000

**Tabelle 9: Liste der sekundären Antikörper zur Western Blot Analyse**

<b>Konjugat</b>	<b>Spezies</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
IRDye 680RD	Esel	Hase	LI-Cor, Lincoln, NE, USA	1:15000
IRDye 680RD	Esel	Maus	LI-Cor, Lincoln, NE, USA	1:15000
IRDye 800CW	Ziege	Ratte	LI-Cor, Lincoln, NE, USA	1:15000

2.1.7 Programme

Tabelle 10: Liste der Programme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
EndNote	Clarivate Analytics, London, England
GraphPad Prism	GraphPad, San Diego, CA, USA
Harmony	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
ImageJ Fiji	Wayne Rasband, (NIH) Bethesda MD, USA
Magellan 6	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft 365	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
SPSS	IBM, Endicott, NY, USA

## 2.2 Methoden

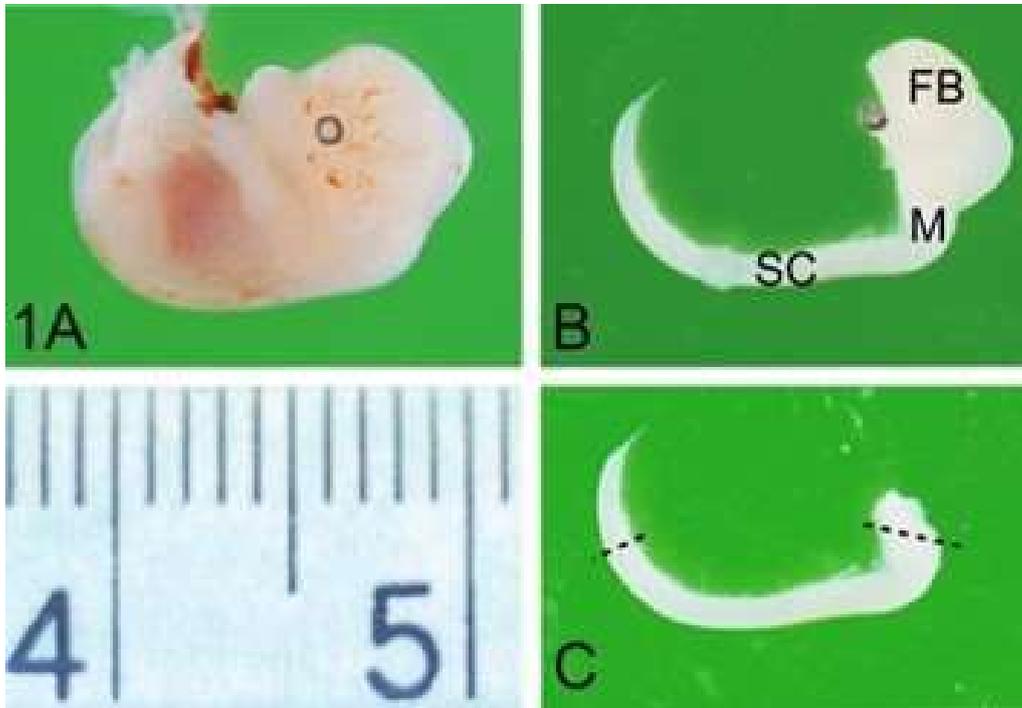
### 2.2.1 Tierhaltung und -tötung zur Organentnahme

Die Mäuse (Stamm C57BL/6J) wurden von Janvier Labs gezüchtet und verpaart. Die verpaarten Mäuse wurden bis zur Präparation in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Die Tötung und die Organentnahme erfolgten nach den Richtlinien der ZETT unter dem Aktenzeichen O48/11 und nach Erwerb des Fachkundenachweises gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes (21.08.2015).

### 2.2.2 Präparation und Kultivierung von SCCs

Die SCC-Präparation erfolgte nach dem Vorbild von Thomson et al., 2008. Hierzu wurden 13,5 Tage lang trächtige Mäuse (Mäusestamm C57BL/6J) zunächst mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde das Genick der Mäuse gebrochen und diese dann dekapitiert. Die Mäuseembryonen wurden entnommen und in einer Petrischale, gefüllt mit DMEM (1000 mg/l Glukose), gesammelt (siehe Abb. 2.1). Im Anschluss wurde nach zuvor erfolgter Dekapitation der Mäuseembryonen deren Rückenmark freipräpariert und dann von den Meningen restlos befreit. Das gesammelte Rückenmarksgewebe wurde in einem weiteren Schritt mithilfe eines Skalpells grob zerkleinert und in HBSS (frei von  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) überführt. Bis hierhin erfolgten die Schritte gekühlt auf Eis und mithilfe eines Binokulars unter nicht sterilen Bedingungen. Alle weiteren Schritte wurden unter einer mikrobiologischen Sicherheitsbank durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Gewebesuspension mit 0,25% Trypsin und 1% Kollagenase für 20 min und bei 37°C. Die Zugabe von *soybean trypsin inhibitor* (SD)-Lösung beendete die enzymatische Dissoziation des Gewebes. Die Gewebesuspension wurde anschließend durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und durch einen Zellfilter (70 µm) gesiebt. Nach Zentrifugation (90 g) wurde der Überstand isoliert und mit Plattierungsmedium (0,4 ml pro präpariertes Rückenmark) aufgefüllt. Die somit gewonnenen Zellen wurden in einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml auf eine 12- bzw. 96-Well-Platte ausplattiert und bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Zuvor erfolgte die Beschichtung der Multi-Well-Platten mit Poly-L-Lysin (PLL) für mindestens 2-3 Stunden bei 37°C (13,3 µg/ml PLL in HBSS frei von  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ). Nach 2-3 Stunden hatten sich die Zellen am Well-Boden ausreichend angeheftet und es erfolgte zum Schluss die Zugabe von 100 µl frischem Differenzierungsmedium pro Well. Die Zellkulturplatten wurden bis zum Versuchsende weiter im  $\text{CO}_2$ -Inkubator kultiviert und jeden 2.-3. Tag wurde die Hälfte des Zellmediums durch frisches Differenzierungsmedium ausgetauscht. Für die ersten 12-

14 Tage wurde dem Differenzierungsmedium gemäß Protokoll Insulin zugefügt (Thomson et al., 2008).



**Abb. 2.1: Präparationsschritte zur Gewinnung von Rückenmarkskulturen**

Die Präparation erfolgte an einem 13,5 Tage alten Mäuseembryo nach Entfernung aus dem Uterus.

1A: Freipräparierter Mäuseembryo.

B: Intakte Neuraxis; FB: *forebrain*, M: *myelencephalon*, SC: *spinal cord*.

C: Präparat bestehend aus Myelencephalon und Rückenmark. Das zwischen den gestrichelten Linien gelegene Gewebe wird zur Gewinnung der Rückenmarkskulturen weiter aufbereitet.

Skala (links unten) in Millimeter.

Abbildung aus Thomson et al., 2008, Nutzung genehmigt durch Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Plattierungsmediums

Reagens (Zielkonzentration)	Volumen
DMEM mit 1 g/l Glukose + Natrium Pyruvate + 4 mM L-Glutamin	200 ml
Penicillin/Streptomycin (100 Units [U]/ml)	4 ml
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	100 ml
HBSS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	100 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums

Reagens (Zielkonzentration)	Volumen
DMEM mit 4,5 g/l Glukose + Natrium Pyruvate + 4 mM L-Glutamin	500 ml
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml)	5 ml
Hormon-Mix (0,5%)	2,5 ml
Biotin (10 ng/ml)	5 $\mu\text{l}$
Hydrokortison (50 nM)	2,5 ml
Insulin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0,5 ml

Tabelle 13: Zusammensetzung des Hormon-Mix

Reagens (Zielkonzentration)	Volumen/Menge
DMEM/F12 zugesetzt mit Penicillin/Streptomycin (100 U/ml)	50 ml
Apo-Transferrin (1 mg/ml)	50 mg
Putrescin (20 mM)	88,15 mg
Progesteron (4 $\mu\text{M}$ )	62,9 $\mu\text{l}$
Selenium (6 $\mu\text{M}$ )	51,89 $\mu\text{l}$

Tabelle 14: Zusammensetzung der SD-Lösung

Reagens (Zielkonzentration)	Volumen/Menge
Leibovitz's L15 Medium mit Glutamin, + L-Aminosäuren; zugesetzt mit Penicillin/Streptomycin (100 U/ml)	50 ml
Trypsin Inhibitor aus Soja (0,52 mg/ml)	26 mg
DNase (0,04 mg/ml)	DNase muss frisch hinzugegeben werden
Albumin Fraktion V (BSA; 3 mg/ml)	150 mg

### 2.2.3 Western Blot

Für die Western Blot Analyse erfolgte die Kultivierung der SCCs auf 12-Well Mikrotiterplatten. Zunächst wurde das Differenzierungsmedium komplett entfernt und DPBS zugegeben. Mithilfe eines Zellschabers konnten die Zellen vom Boden gelöst werden. Anschließend wurde die Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Nach Zentrifugation (300 G für 10 min) wurde der Überstand entfernt. Durch Zugabe des Lyse-Puffers für 10 min (bei Raumtemperatur) löste sich das Zellpellet auf. Im Anschluss wurde das Lysat erneut zentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden dann bei -80°C gesammelt. Nach dem Auftauen erfolgte die Proteinquantifizierung (mittels BCA-Assay), damit die gleiche Proteinmenge pro Probe auf das Elektrophorese-Gel aufgetragen werden konnte. Zur Denaturierung wurden den Proben Ladepuffer sowie Dithiothreitol (DDT) zugegeben und das Gemisch für 5 min bei 95°C inkubiert. Dann wurden die Proben auf das Elektrophorese-Gel (Polyacrylamid) aufgetragen und bei 135 Volt für 30 min aufgetrennt. Anschließend konnte das Gel mithilfe des Trans-Blot Turbo Systems auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen werden. Danach wurden die freien Bindungsstellen auf der Polyvinylidenfluorid-Membran mit 5% Rinderserumalbumin für mindestens 1,5 Stunden geblockt. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 8) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei Waschgängen mit 0,005% DPBS-Tween konnte der sekundäre (Färbe-)Antikörper (siehe Tabelle 9) zugegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde erfolgten drei weitere Waschgänge mit DPBS-Tween. Zum Schluss wurden die Western Blots mithilfe des Mikroplatten-Lesegeräts (Tecan reader) aufgenommen und quantifiziert (Image Studio Lite Analyse Software). Die gemessenen Intensitäten wurden dazu in Relation zum  $\beta$ -Actin (*housekeeping gene*) gesetzt.

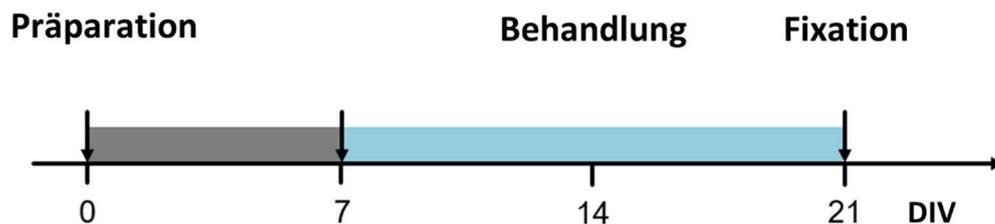
Tabelle 15: Liste der Puffer für die Western Blot Analyse

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	10 ml Puffer + 1 Tbl. Protease-Inhibitor + 1 Tbl. Phosphatase-Inhibitor
Blockierungs-Puffer	5% BSA in DPBS-Tween
Antikörper-Puffer	2,5% BSA in DPBS-Tween

## 2.2.4 Versuchsaufbau

### 2.2.4.1 Allgemeines

Nach sieben Tagen in Kultur (DIV 7) hatten sich die Zellen an die *in vitro* Konditionen adaptiert und unter lichtmikroskopischer Kontrolle ein dichtes axonales Netzwerk ausgebildet. Zu diesem Zeitpunkt begann der Einsatz der nachfolgenden Substanzen, welche gelöst im Differenzierungsmedium alle 2-3 Tage hinzugegeben wurden. Nach einem Behandlungszeitraum von insgesamt 14 Tagen wurde das Experiment beendet (DIV 21) und die Zellen mit PFA 4% fixiert (siehe Abb. 2.2).



**Abb. 2.2: Zeitleiste zum Versuchsablauf**

Von DIV 0-7 enthielt das Differenzierungsmedium der SCCs keine Behandlungszusätze. An DIV 7 wurde das Experiment mit den unten genannten Substanzen gestartet. Nach insgesamt 21 Tagen in Kultur wurden die SCCs fixiert und das Myelin, das Neurofilament und die Zellkerne angefärbt (siehe Abschnitt 2.2.5).

DIV: *day(s) in vitro*, SCC: *spinal cord culture(s)*.

#### 2.2.4.2 Vorversuche zu den Kontrollgruppen

Für die IgG-Kontrolle wurden Konzentrationen von 10 µg/ml und 30 µg/ml, angelehnt an das anti-LINGO-1 Experiment, gewählt. Die „unbehandelte“ Kontrolle (*solvent control*) erhielt ein äquivalentes Volumen an Antikörper-Lösemittel entsprechend der IgG-Kontrolle 10 µg/ml und 30 µg/ml. Zur Vereinfachung werden die Kontrollgruppen als *solvent control* 10 µg/ml und 30 µg/ml bezeichnet, auch wenn das reine Lösemittel keinen Antikörper enthält.

#### 2.2.4.3 Anti-LINGO-1 Experiment

Die Kontrollgruppe (*solvent control*) erhielt das äquivalente Volumen an Antikörper-Lösemittel wie die Behandlungsgruppen 1A7, Li03 und Li81 in niedriger Antikörperkonzentration (10 µg/ml). Für die IgG-Kontrolle wurde eine Konzentration von 30 µg/ml und für die Positivkontrolle Triiodthyronin (T3) eine Konzentration von 30 ng/ml gewählt. In Abschnitt 4.1 wird die Auswahl der jeweiligen Konzentrationen sowie die Einschränkung auf jeweils eine Konzentration der Kontrollgruppen (*solvent control* und IgG-Kontrolle) erläutert.

Zusätze:

- Kontrollgruppe (Antikörper-Lösemittel, auch *solvent control* genannt)
- T3 (Positivkontrolle, 30 ng/ml)
- IgG-Kontrolle (30 µg/ml)
- 1A7 (10 µg/ml)
- 1A7 (30 µg/ml)
- Li03 (10 µg/ml)
- Li03 (30 µg/ml)
- Li81 (10 µg/ml)
- Li81 (30 µg/ml)

#### 2.2.5 Immunhistochemische Färbung

Die Zellkulturen wurden für 15 min bei Raumtemperatur mit PFA 4% fixiert und dann erfolgte zur Permeabilisierung die Zugabe von 1% Triton X-100 gelöst in DPBS. Nach 30 min wurden die Zellkulturen dreimal für jeweils 15 min mit DPBS gewaschen. Zur Reduktion von unspezifischen Antikörper-Bindungen wurden die Kulturen mit 10% Ziegen Serum für 45 min geblockt. Nach oben aufgeführtem Verdünnungsschema erfolgte dann zur

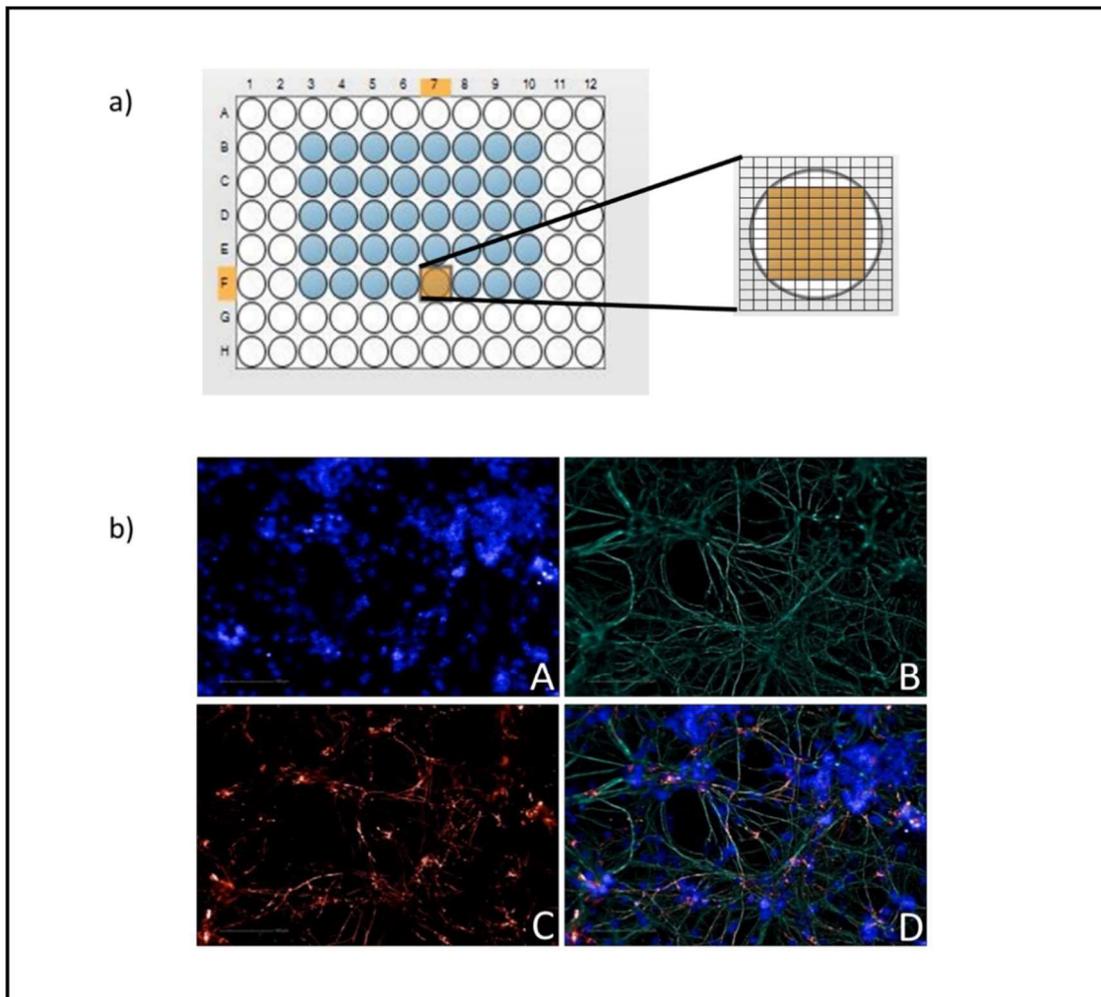
immunhistochemischen Anfärbung die Zugabe des primären Antikörpers (siehe Tabelle 6). Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe Tabelle 7) bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf einem Laborschüttler. Dann wurden die Zellkulturen erneut dreimal mit DPBS gewaschen, wobei dem DPBS im zweiten Waschgang Hoechst (0,2 µg/ml) zur Zellkernfärbung zugegeben wurde. Zum Schluss wurden die Wells mit DPBS aufgefüllt und die Zellkulturplatten bei 4°C gelagert.

**Tabelle 16: Liste der Puffer zur immunhistochemischen Färbung**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Permeabilisierungs-Puffer	1% Triton X-100 in DPBS
Blockierungs-Puffer	10% Ziegen Serum in 0,2% Triton X-100 in DPBS
Antikörper-Puffer	1% Ziegen Serum in 0,2% Triton X-100 in DPBS

### 2.2.6 Bildgebung und Quantifizierung des anti-LINGO-1 Experiments

Nach Fixierung und immunhistochemischer Anfärbung wurden die Zellkulturen im 96-Well-Format mithilfe des Operetta High Content Imaging Systems gescannt. Detektiert wurden die Farbstoffe Cy3, Cy5 und Hoechst. Ein Well wurde dazu in 63 Sichtfelder (*fields of view*, FOV) unterteilt. Anhand der Anfärbung des Myelins (MBP), des Neurofilaments (NF200) und der Zellkerne (Hoechst) konnte die Gesamtlänge/-fläche an Myelin sowie der Axone, der Myelinisierungsgrad der Axone und die Gesamtzellzahl dargestellt bzw. selektiert werden. Mithilfe der Software Harmony erfolgte die Quantifizierung (siehe Abb. 2.3) Das *Imaging* sowie die Quantifizierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Neuroscience: Neurodegeneration and Regeneration“ unter Leitung von Herrn Eduard Urich und Herrn Per-Ola Freskgard der Firma F. Hoffmann-La Roche.



**Abb. 2.3: Quantifizierung mithilfe des Operetta High Content Imaging Systems**  
 a) Bildbereich links: Darstellung des 96-Well Mikrotiter-Formats mit Auswahl der Zell-besetzten Wells (blau) und des zu analysierenden Wells (orange).  
 Bildbereich rechts: Aufteilung des zu analysierenden Wells in 63 FOV.  
 b) Exemplarische Darstellung eines FOV einer SCC nach Behandlung mit T3 (Positivkontrolle).  
 A: Zellkerne (Hoechst-Färbung); B: Axonales Netzwerk (Neurofilament [NF200]-Färbung)  
 C: Myelin (MBP-Färbung); D: *Overlay*-Darstellung von Zellkernen, Axone und Myelin.  
 Maßstableiste 100  $\mu\text{m}$ .  
 FOV: *field(s) of view*, MBP: Myelin-Basisches Protein, SCC: *spinal cord culture*,  
 T3: Triiodthyronin,  $\mu\text{m}$ : Mikrometer.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS von IBM (Version 28.0) verwendet. In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob die Ergebnisse der anti-LINGO-1 Versuchsreihe normalverteilt sind. Die Mehrheit der Ergebnisse zeigte keine Normalverteilung, weshalb zur besseren Vergleichbarkeit ein non-parametrischer Test ausgewählt wurde. Bei dem von uns verwendeten Test handelt es sich um den Mann-Whitney-U-Test, mit dem zunächst der mittlere

Rang aus den Werten eines Gruppenvergleiches (z.B. zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe) bestimmt wurde. Auf Basis der mittleren Ränge konnte dann geprüft werden, ob gemessene Unterschiede eine statistische Signifikanz aufweisen. Für die deskriptive Statistik wurde primär der Median anstelle des Mittelwerts verwendet, da dieser gegenüber (extremen) Ausreißern robuster ist. Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Box-Plots. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Statistikberatung punkt05 in Düsseldorf.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Western Blot Analyse

Für die Western Blot Analyse wurden die SCCs an den Tagen 5, 7, 9, 12, 16, 19, 23, 26 und 30 in Kultur nach oben genannter Methode (siehe Abschnitt 2.2.2) aufbereitet. Insgesamt führten wir drei Western Blots aus drei separaten SCCs durch. Damit sollten für jeden Zeitpunkt drei Replikate ( $n = 3$ ) vorliegen. Allerdings konnte für DIV 23 in einem der drei Western Blots weder ein Signal für  $\beta$ -Actin noch für LINGO-1 nachgewiesen werden (DIV 23  $n = 2$ ). Zur Bestimmung des Ausmaßes der Expression wurde das LINGO-1 Signal ins Verhältnis zum  $\beta$ -Actin (*housekeeping gene*) gesetzt. Für den Zeitraum DIV 9-16 konnte die stärkste LINGO-1 Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1). Bei einem Stichprobenumfang von  $n = 3$  wurden die Werte zum besseren Vergleich in die Gruppen „DIV 5-16“ und „DIV 19-30“ aufgeteilt. Für die erste Hälfte des Kultivierungszeitraums konnte im Vergleich zur zweiten Hälfte eine deutlich stärkere LINGO-1 Expression nachgewiesen werden (Median<sub>DIV 5-16</sub>: 0,24 vs. Median<sub>DIV 19-30</sub>: 0,12). Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs sowie der teilweise deutlichen Streuung der Einzelwerte (siehe Tabelle 17) wurde auf eine tiefere statistische Auswertung verzichtet. Zusammengefasst lässt sich anhand der Western Blots sagen, dass die LINGO-1 Expression der SCCs innerhalb der ersten 2,5 Wochen ihr Maximum erreicht und sich im weiteren Verlauf wieder deutlich verringert hat.

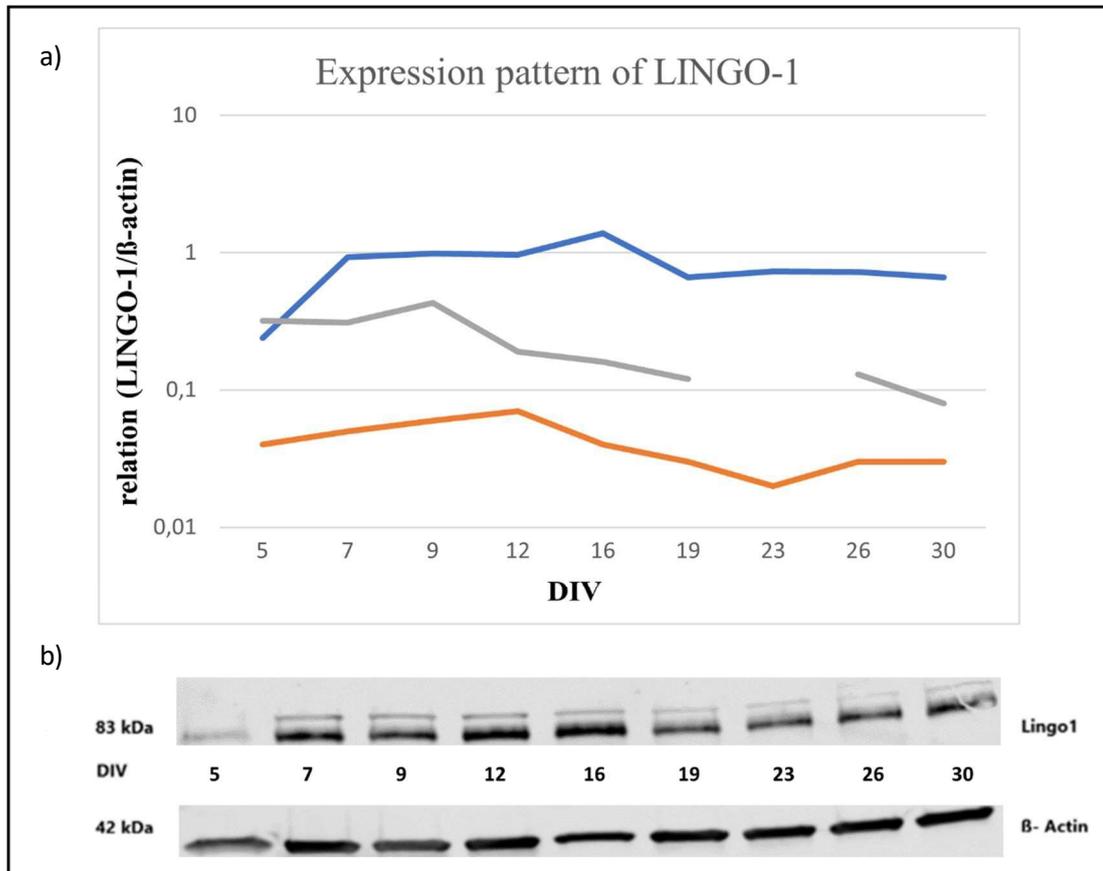
#### Auswertung Western Blot

Gruppe	Anzahl (ungültige Werte)	M	SD	Min.	Max.	Perzentile		
						25%	50%	75%
<b>DIV 5-16</b>	15 (0)	0,41	0,44	0,04	1,39	0,06	0,24	0,93
<b>DIV 19-30</b>	11 (1*)	0,29	0,32	0,02	0,73	0,03	0,12	0,66

**Tabelle 17: Gruppenvergleich zwischen DIV 5-16 und DIV 19-30**

Zum besseren Vergleich wurden die Ergebnisse in die oben genannten Gruppen zusammengefasst. Aufgrund der geringen Stichprobenmenge und der zum Teil deutlichen Streuung der Werte war eine weiterführende statistische Auswertung nicht sinnvoll. Der Vergleich der Mediane beider Gruppen zeigt, dass eine stärkere LINGO-1 Expression in der ersten Hälfte des Kultivierungszeitraums vorliegt. \*An DIV 23 konnte in einem Western Blot weder ein Signal für  $\beta$ -Actin noch für LINGO-1 detektiert werden.

DIV: *day(s) in vitro*, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, M: Mittelwert, Max.: Maximum, Min.: Minimum, SD: Standardabweichung.



**Abb. 3.1: Western Blot mit Darstellung des LINGO-1 Expressionsmusters**

a) Die y-Achse stellt das Verhältnis zwischen den gemessenen LINGO-1- und  $\beta$ -Actin-Signalen dar. Die x-Achse umfasst den kompletten Kultivierungszeitraum (Einheit in Tagen).

\* An DIV 23 konnte in einem Western Blot kein Signal für  $\beta$ -Actin oder für LINGO-1 detektiert werden.

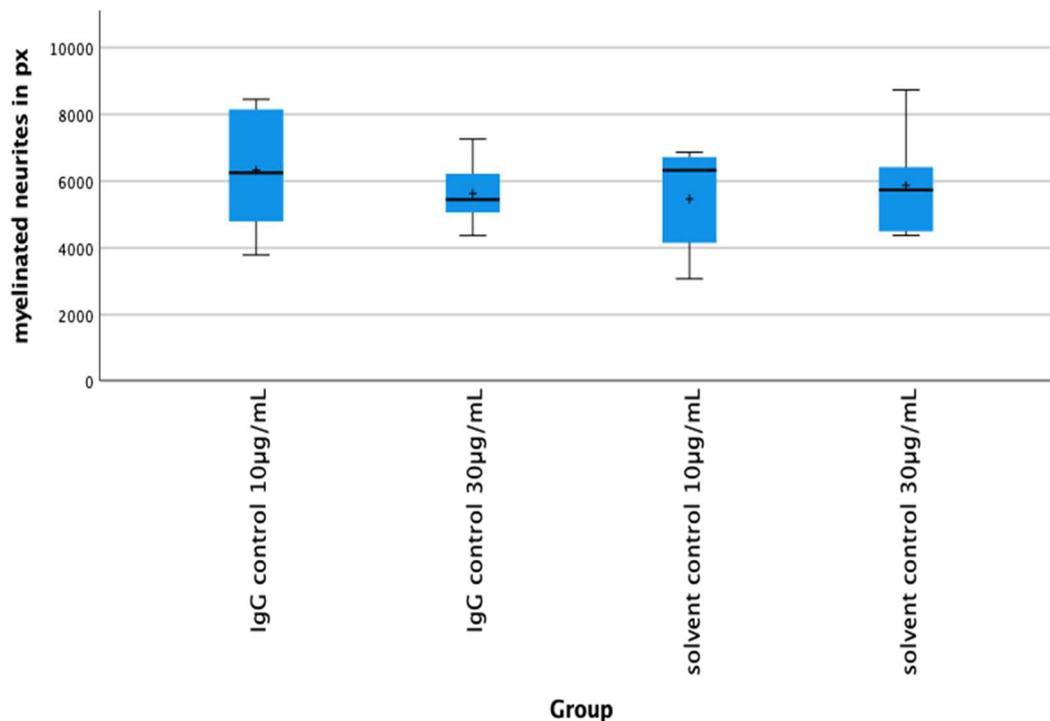
b) Exemplarische Darstellung eines Western Blots. Immunhistochemische Anfärbung der  $\beta$ -Actin- (42 kDa) und LINGO-1- (83 kDa) Banden.  $\beta$ -Actin dient als *housekeeping gene* zur Bestimmung des Ausmaßes der LINGO-1 Expression.

DIV: *day(s) in vitro*, kDa: Kilodalton, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*.

### 3.2 Vorversuche zu den Kontrollgruppen

Vor Durchführung der anti-LINGO-1 Experimente untersuchten wir in Vorversuchen, ob dosisabhängige Unterschiede innerhalb der Gruppen Antikörper-Lösemittel (*solvent control*) und IgG-Kontrolle vorliegen. Hierzu wurden das Antikörper-Lösemittel sowie die IgG-Kontrollen (10  $\mu$ g/ml und 30  $\mu$ g/ml) ab DIV 7 dem Differenzierungsmedium zugegeben. Nach 21 Tagen in Kultur wurden die SCCs mit PFA 4% fixiert und zur weiteren Quantifizierung aufbereitet (siehe 2.2.5 und 2.2.6). Wir konnten nachweisen, dass keine dosisabhängigen Unterschiede zwischen den zwei *solvent control* Gruppen hinsichtlich Myelinisierungsgrad sowie Neuritenwachstum vorliegen. Für den Gruppenvergleich zwischen IgG-Kontrolle 10  $\mu$ g/ml und 30  $\mu$ g/ml konnte bezüglich des Myelinisierungsgrades ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied

festgestellt werden. Allerdings zeigte sich eine leichte, aber dafür signifikante Zunahme für das Neuritenwachstum für die IgG-Kontrolle 30 µg/ml im Vergleich zur Gruppe mit 10 µg/ml IgG (Median [Mdn.] 10 µg/ml: 460391 Pixel [px] vs. Mdn. 30 µg/ml: 480528 px). Alle Ergebnisse werden in Abb. 3.2 und in Abb. 3.3 grafisch dargestellt.



**Abb. 3.2: Vergleich der Kontrollgruppen bezogen auf den Myelinisierungsgrad**  
 Quantifizierung der myelinisierten Axone (n = 10 Wells pro Gruppe). Darstellung in Form von Box-Plots mit zusätzlicher Angabe des Mittelwerts (+). Median als durchgehende Linie in der Box angegeben. Die y-Achse stellt die Länge der myelinisierten Axone in Pixel (px) dar. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen.  
 IgG: Immunglobulin G, ml: Milliliter, n: Anzahl, px: Pixel, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, µg: Mikrogramm.

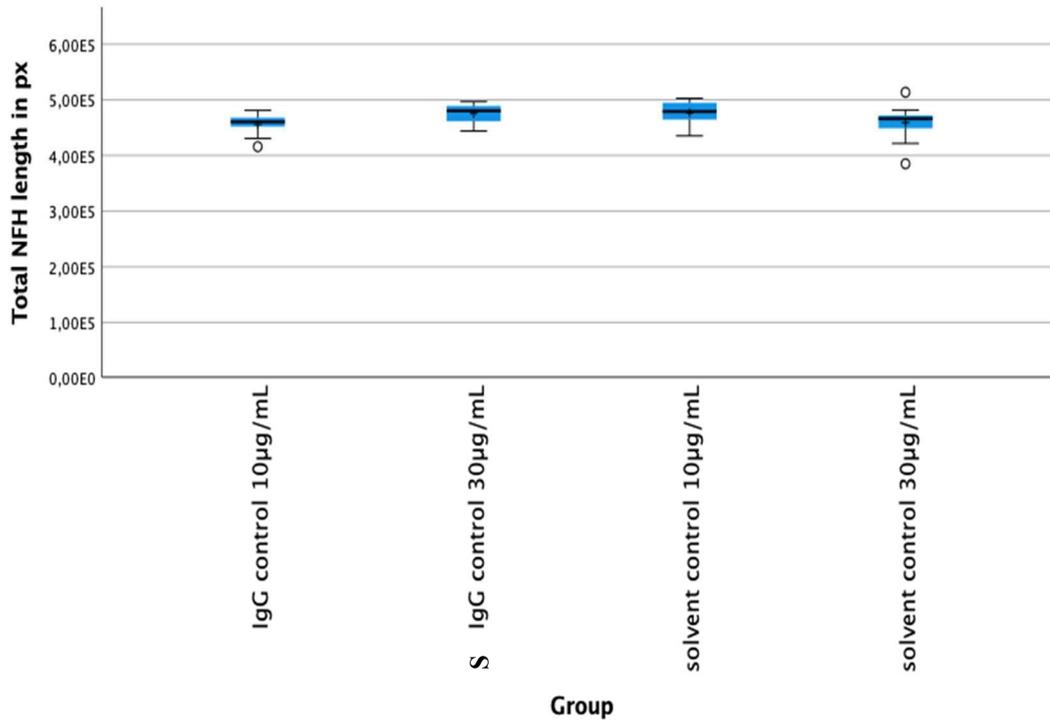
### Deskriptive Statistik: Länge der myelinisierten Axone

Gruppe	M	SD	Min.	Max.	Perzentile		
					25%	50%	75%
<i>solvent control</i> 10 µg/ml	5465,0	1553,5	3080,2	6866,1	3899,1	6329,7	6725,5
<i>solvent control</i> 30 µg/ml	5874,5	1464,1	4379,6	8736,4	4492,3	5738,4	6760,2
<b>IgG-Kontrolle</b> 10 µg/ml	6333,4	1738,7	3788,4	8450,8	4758,0	6251,8	8178,4
<b>IgG-Kontrolle</b> 30 µg/ml	5631,7	912,4	4373,1	7262,2	4955,9	5451,4	6335,3

**Tabelle 18: Länge der myelinisierten Axone (Vorversuche)**

Darstellung der deskriptiven Statistik zu Abb. 3.2. Einheit in Pixel (px). Tabelle zum Mann-Whitney-U-Test ist im Anhang zu finden.

IgG: Immunglobulin G, M: Mittelwert, Max.: Maximum, Min.: Minimum, ml: Milliliter, SD: Standardabweichung, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, µg: Mikrogramm.



**Abb. 3.3: Vergleich der Kontrollgruppen bezogen auf die Gesamtlänge der Axone**  
 Quantifizierung der Axonlänge (n = 10 Wells pro Gruppe). Darstellung in Form von Box-Plots mit zusätzlicher Angabe des Mittelwerts (+). Median als durchgehende Linie in der Box angegeben. Die y-Achse stellt die Gesamtlänge der Axone in Pixel (px) dar. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen. Milde Ausreißerwerte (zwischen 1,5-fachen und 3-fachen Interquartilsabstand [IQR]) werden mit einem Kreis markiert. Die mit S markierte Gruppe zeigt im direkten Gruppenvergleich einen signifikanten Unterschied.  
 E: Exponentialdarstellung, IgG: Immunglobulin G, IQR: Interquartilsabstand, ml: Milliliter, n: Anzahl, NFH: Neurofilament, px: Pixel, S: Signifikantes Ergebnis, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, µg: Mikrogramm.

**Deskriptive Statistik: Gesamtlänge der Axone**

Gruppe	M	SD	Min.	Max.	Perzentile		
					25%	50%	75%
<i>solvent control</i> 10 µg/ml	476660	21431	435494	502657	462376	479145	496033
<i>solvent control</i> 30 µg/ml	458982	34685	385203	513643	442374	466137	474322
<b>IgG-Kontrolle</b> 10 µg/ml	455729	19382	415984	480916	446697	460391	468948
<b>IgG-Kontrolle</b> 30 µg/ml	475291	17162	444199	496628	461166	480528	490152

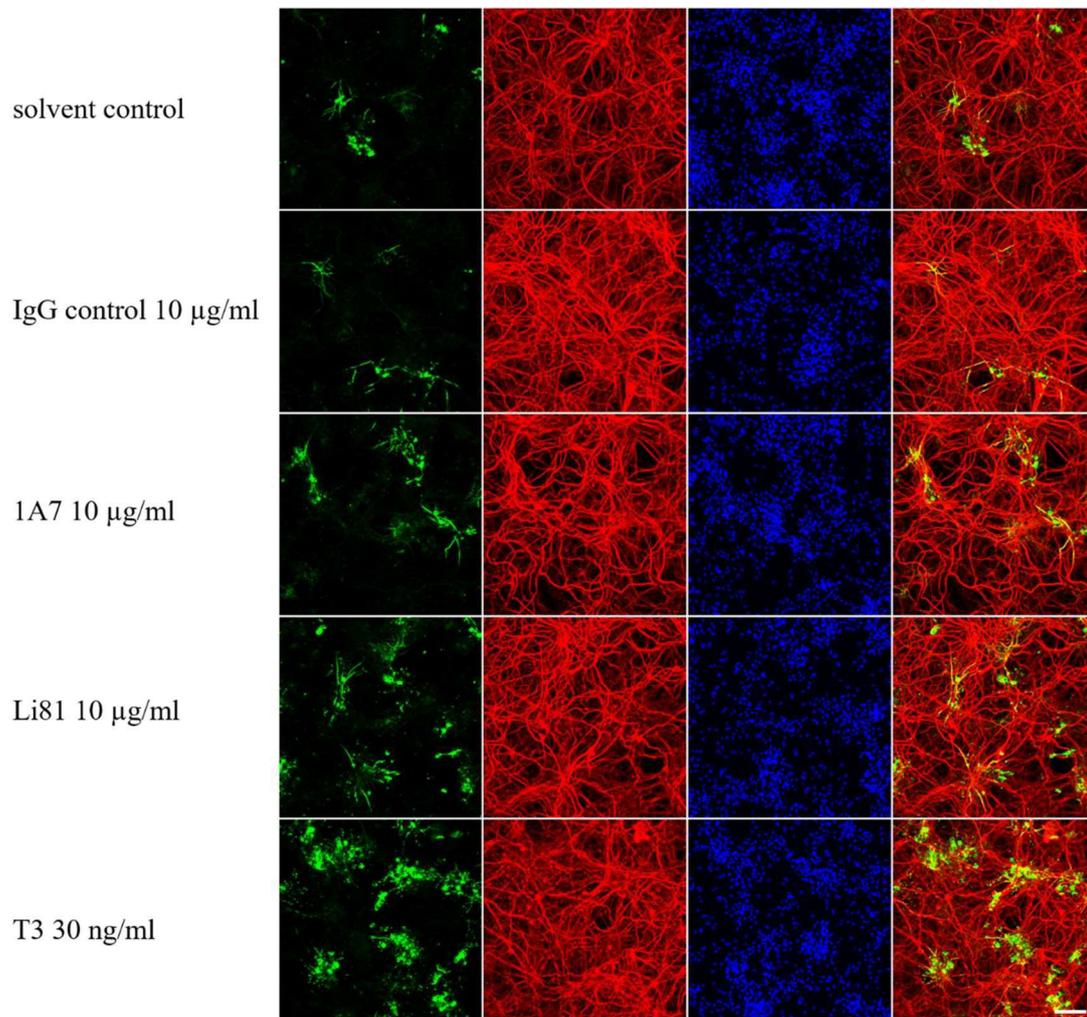
**Tabelle 19: Gesamtlänge der Axone (Vorversuche)**

Darstellung der deskriptiven Statistik zu Abb. 3.3. Einheit in Pixel (px). Tabelle zum Mann-Whitney-U-Test ist im Anhang zu finden.

IgG: Immunglobulin G, M: Mittelwert, Max.: Maximum, Min.: Minimum, ml: Milliliter, px: Pixel, SD: Standardabweichung, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, µg: Mikrogramm.

**3.3 Anti-LINGO-1 Experiment****3.3.1 Allgemeines**

Das anti-LINGO-1 Experiment setzte sich aus insgesamt 9 Versuchsansätzen zusammen und jede der in Abschnitt 2.2.4.3 aufgeführten Konditionen umfasste 34 Replikate ( $n = 34$ ). Die Versuchsdurchführung und die Aufbereitung der SCCs nach Versuchsende sind den Abschnitten 2.2.4 und 2.2.5 zu entnehmen. In Abb. 3.4 werden exemplarisch Aufnahmen zum anti-LINGO-1 Experiment (Vorversuche) dargestellt, welche die Basis der weiterführenden Analysen waren.



**Abb. 3.4: Exemplarische Darstellung zur anti-LINGO-1 Versuchsreihe (Vorversuche)**  
 Beispiel eines FOV der Behandlungsgruppen Lösemittelkontrolle (*solvent control*), IgG-Kontrolle, 1A7 und Li81 (jeweils 10 µg/ml) sowie T3 (30 ng/ml) nach oben aufgeführten Versuchsaufbau (siehe 2.2.4.1 und 2.2.4.3). Bilder entstammen Vorversuchen zur anti-LINGO-1 Versuchsreihe (Ergebnisse der Quantifizierung nicht dargestellt).

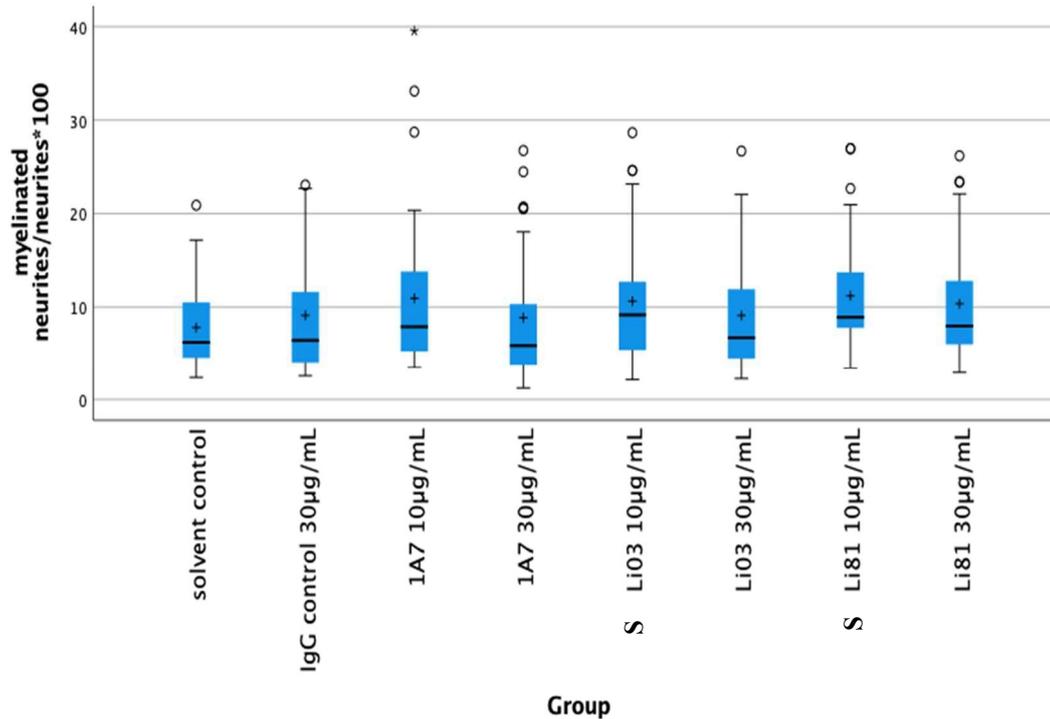
Von links nach rechts: Dargestellt wurden Myelin in grün (MBP-Färbung); axonales Netzwerk in rot (Neurofilament [NF200]-Färbung) und Zellkerne in blau (Hoechst-Färbung); *Overlay*-Darstellung von Zellkernen, Axone und Myelin.

Maßstableiste 100 µm.

FOV: *field(s) of view*, IgG: Immunglobulin G, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, Li81: Opicinumab, MBP: Myelin-Basisches Protein, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, µm: Mikrometer, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

### 3.3.2 Myelinisierungsgrad

Der Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf den Myelinisierungsgrad stand im Mittelpunkt unserer Untersuchung. Der Anteil an myelinisierten Axonen (Median) betrug in der *solvent control* sowie der IgG-Kontrolle etwas weniger als 6,5%. Im Vergleich waren die Unterschiede zwischen diesen Gruppen nicht statistisch signifikant ( $p = 0,99$ ). Die Positivkontrolle mit T3 in einer Dosierung von 30 ng/ml wies mit ungefähr 33,6% (Mdn.) im Vergleich zur *solvent control* einen deutlich höheren Anteil an myelinisierten Axonen auf ( $p < 0,001$ ). Die Antikörper Li03 und Li81 (jeweils 10  $\mu\text{g/ml}$ ) verstärkten die Myelinisierung in Relation zur *solvent control* um mehr als 48% (Mdn.  $\text{Li03 } 10 \mu\text{g/ml}$ : 9,2%) bzw. 43% (Mdn.  $\text{Li81 } 10 \mu\text{g/ml}$ : 8,9%). Die Unterschiede zwischen *solvent control* und Li03 bzw. Li81 waren zudem statistisch signifikant ( $p_{\text{Li03}} = 0,048$  und  $p_{\text{Li81}} = 0,003$ ). Die Gruppen 1A7 10  $\mu\text{g/ml}$  sowie Li03 und Li81 in hoher Dosierung (30  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigten eine leichte aber statistisch nicht signifikante Steigerung der Myelinisierung (Mdn.  $1\text{A7 } 10 \mu\text{g/ml}$ : 7,9%; Mdn.  $\text{Li03 } 30 \mu\text{g/ml}$ : 6,7%; Mdn.  $\text{Li81 } 30 \mu\text{g/ml}$ : 8,0%). Gemessen an der *solvent control* konnte für die Gruppe mit 1A7 30  $\mu\text{g/ml}$  sogar ein geringerer Anteil an myelinisierten Axonen nachgewiesen werden (Mdn.  $1\text{A7 } 30 \mu\text{g/ml}$ : 5,9%,  $p > 0,05$ ). Die Effekte im Gruppenvergleich zwischen niedrig- und hochdosierter Behandlung mit anti-LINGO-1 Antikörpern unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; siehe Tabelle 25 im Anhang). Alle Ergebnisse werden in Abb. 3.5 grafisch dargestellt.



**Abb. 3.5: Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf den Myelinisierungsgrad**

Quantifizierung des Myelinisierungsgrades (n = 34 Wells pro Gruppe). Darstellung in Form von Box-Plots mit zusätzlicher Angabe des Mittelwerts (+). Median als durchgehende Linie in der Box angegeben. Die y-Achse stellt den axonalen Myelinisierungsgrad in Prozent dar. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen. Milde Ausreißerwerte (zwischen 1,5x IQR und 3x IQR) werden mit einem Kreis markiert, extreme Ausreißer (> 3x IQR) sind mit einem Stern (\*) dargestellt. Die mit S markierten Gruppen zeigten im Gruppenvergleich zur Lösemittel-Kontrolle (*solvent control*) einen signifikanten Unterschied.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse der T3-Behandlung nicht mit aufgeführt (siehe Tabelle 25).

IgG: Immunglobulin G, IQR: Interquartilsabstand, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, ml: Milliliter, n: Anzahl, S: Signifikantes Ergebnis, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

## Deskriptive Statistik: Myelinisierungsgrad

Gruppe	M	SD	Min.	Max.	Perzentile		
					25%	50%	75%
<i>solvent control</i>	7,8	4,5	2,4	20,9	4,5	6,2	10,6
IgG-Kontrolle	9,1	6,7	2,6	23,1	3,9	6,4	12,2
30 µg/ml							
1A7	11,0	8,5	3,5	39,6	5,2	7,9	13,8
10 µg/ml							
1A7	8,9	7,2	1,2	26,8	3,8	5,9	12,1
30 µg/ml							
Li03	10,6	6,7	2,1	28,7	5,3	9,2	12,9
10 µg/ml							
Li03	9,1	6,5	2,3	26,7	4,5	6,7	12,4
30 µg/ml							
Li81	11,2	6,0	3,4	27,0	7,6	8,9	13,9
10 µg/ml							
Li81	10,4	6,4	2,9	26,2	5,9	8,0	13,6
30 µg/ml							
T3 30	35,9	9,2	21,7	54,6	28,2	33,6	44,3
ng/ml							

**Tabelle 20: Myelinisierungsgrad (anti-LINGO-1 Experiment)**

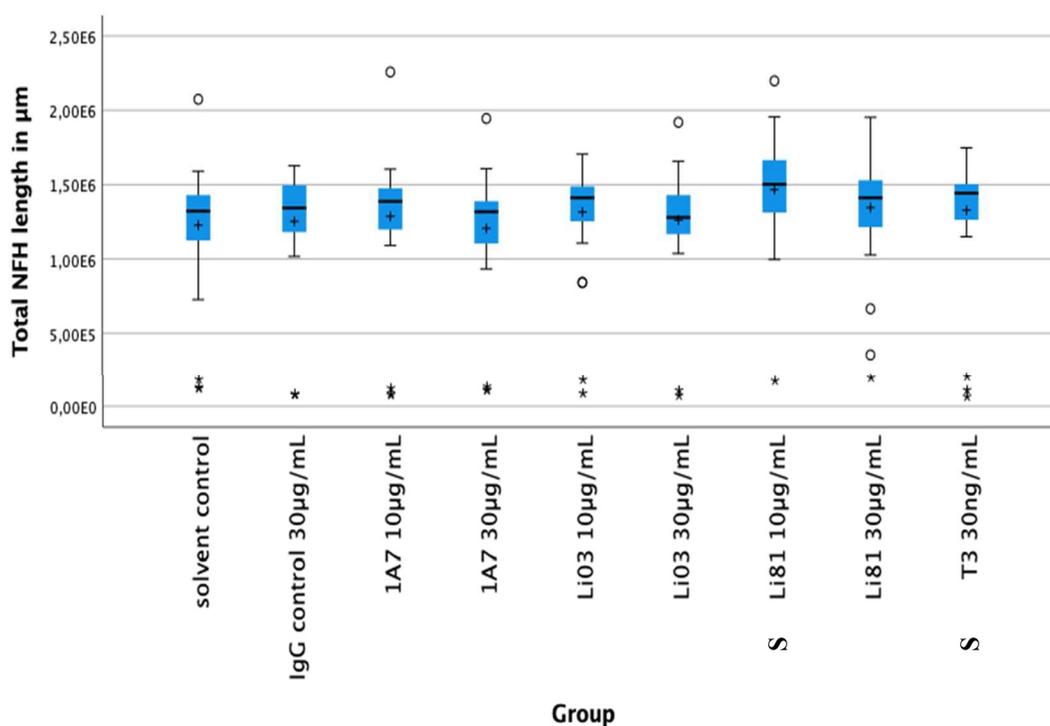
Deskriptive Statistik zu Abb. 3.5. Einheit in Prozent. Tabelle zum Mann-Whitney-U-Test ist im Anhang zu finden.

IgG: Immunglobulin G, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, M: Mittelwert, Max.: Maximum, Min.: Minimum, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, SD: Standardabweichung, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

### 3.3.3 Axonales Netzwerk

Um den Einfluss der Myelinisierung besser einordnen zu können, musste auch untersucht werden, wie sich die eingesetzten Substanzen auf das axonale Netzwerk auswirken. Als Maß diente hierzu die Gesamtlänge der Axone. Zwischen der *solvent control* und der IgG-Kontrolle zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 3.6). Unter Einsatz von T3 konnte eine mäßige, aber dafür signifikante Zunahme des axonalen Geflechts nachgewiesen werden ( $p = 0,039$ ). Li81 in

niedriger Dosierung (10 µg/ml) führte unter allen Testkonditionen mit einer Zunahme der Axonlänge um mehr als 13,5% zum dichtesten Ausbau des neuronalen Netzwerkes ( $p = 0,004$ ). Die Antikörper 1A7 und Li03 (jeweils 10 µg/ml) sowie Li81 in 30 µg/ml wiesen im Vergleich zur *solvent control* nur eine geringe und statistisch nicht signifikante Zunahme der Axonlänge auf. Die Hochdosis-Behandlung mit 1A7 und Li03 (30 µg/ml) hatten dagegen keinerlei positiven Einfluss auf das Neuritenwachstum. Die Gruppenvergleiche zwischen niedrig- und hochdosierter anti-LINGO-1 Antikörper-Behandlung zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 26 im Anhang). Alle Ergebnisse werden in Abb. 3.6 grafisch dargestellt.



**Abb. 3.6: Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf die Gesamtlänge der Axone**  
Quantifizierung der Axongesamtlänge ( $n = 34$  Wells pro Gruppe). Darstellung in Form von Box-Plots mit zusätzlicher Angabe des Mittelwerts (+). Median als durchgehende Linie in der Box angegeben. Die y-Achse stellt die Gesamtlänge der Axone in µm dar. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen. Milde Ausreißerwerte (zwischen 1,5x IQR und 3x IQR) werden mit einem Kreis markiert, extreme Ausreißer ( $> 3x$  IQR) sind mit einem Stern (\*) dargestellt. Die mit S markierten Gruppen zeigten im Gruppenvergleich zur Lösemittel-Kontrolle (*solvent control*) einen signifikanten Unterschied.

E: Exponentialdarstellung, IgG: Immunglobulin G, IQR: Interquartilsabstand, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, ml: Milliliter, n: Anzahl, NFH: Neurofilament, ng: Nanogramm, S: Signifikantes Ergebnis, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, µm: Mikrometer, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

## Deskriptive Statistik: Gesamtlänge der Axone

Gruppe	M	SD	Min.	Max.	Perzentile		
					25%	50%	75%
<i>solvent control</i>	1227829	412504	119975	2074680	1124423	1322195	1430560
IgG-Kontrolle 30 µg/ml	1253547	402664	78661	1627660	1181753	1343550	1496925
1A7 10 µg/ml	1286932	425974	74842	2258230	1193743	1387975	1477345
1A7 30 µg/ml	1206200	398355	106659	1945510	1100685	1318040	1395393
Li03 10 µg/ml	1315804	357140	86792	1706220	1246790	1411855	1490608
Li03 30 µg/ml	1263121	349031	71741	1919800	1167145	1279735	1433600
Li81 10 µg/ml	1467112	350347	172440	2198650	1308873	1502805	1665490
Li81 30 µg/ml	1346110	368791	193030	1953540	1212480	1411950	1539478
T3 30 ng/ml	1328279	406819	64056	1747780	1263090	1442615	1510878

**Tabelle 21: Gesamtlänge der Axone (anti-LINGO-1 Experiment)**

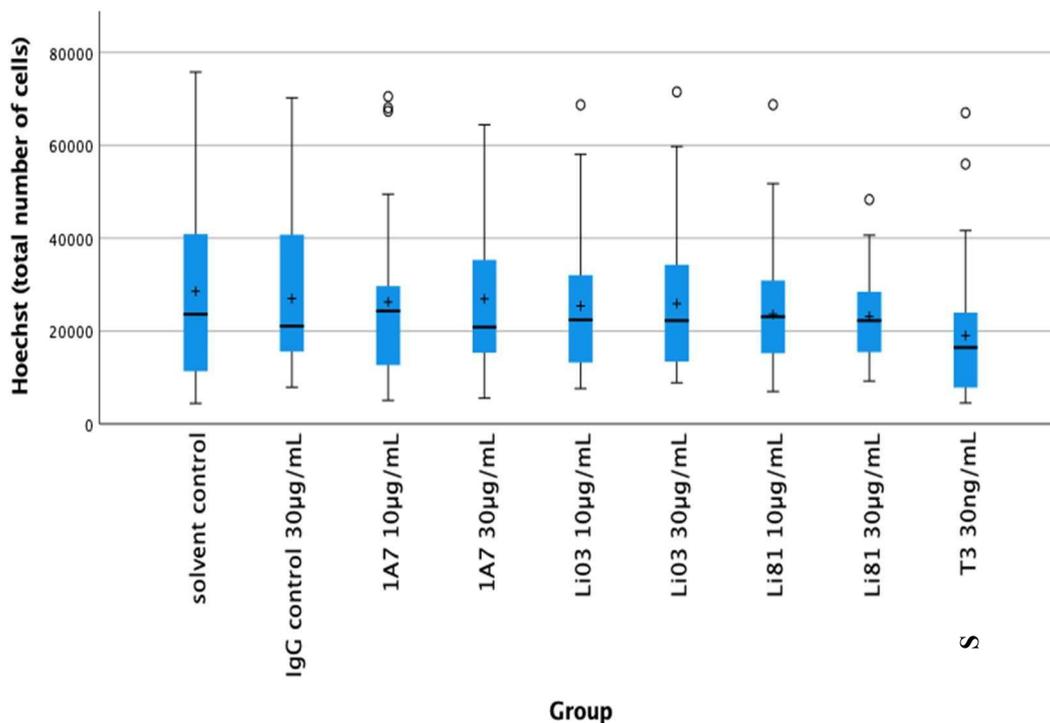
Deskriptive Statistik zu Abb. 3.6. Einheit in µm. Tabelle zum Mann-Whitney-U-Test ist im Anhang zu finden.

IgG: Immunglobulin G, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, M: Mittelwert, Max.: Maximum, Min.: Minimum, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, SD: Standardabweichung, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, µm: Mikrometer, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

3.3.4 Gesamtzellzahl

Um den Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen zu untersuchen, bestimmten wir neben dem Myelinisierungsgrad sowie dem Ausbau des axonalen Netzwerks auch die Gesamtzellzahl. Im Wesentlichen zeigten sich im Vergleich zur *solvent control* weder für die IgG-Kontrolle noch für die drei verschiedenen anti-LINGO-1 Antikörper ein signifikanter Effekt auf die Zellzahl. Auch kamen keine signifikanten

Unterschiede in den Gruppenvergleichen zwischen niedrig- und hochdosierter anti-LINGO-1 Antikörper-Behandlung zur Darstellung (siehe Tabelle 27 im Anhang). Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von T3 zu einer ausgeprägten Reduktion der Zellzahl um 30% ( $p = 0,032$ ). Eine genauere Aussage auf welchen Zelltyp sich T3 hier primär auswirkte, kann aufgrund der (zellunspezifischen) Hoechst-Färbung nicht getroffen werden. Eine nähere Einordnung dieser Ergebnisse wird im Abschnitt 4.2 vorgenommen. Alle Ergebnisse werden in Abb. 3.7 grafisch dargestellt.



**Abb. 3.7: Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf die Gesamtzellzahl**

Quantifizierung der Gesamtzellzahl ( $n = 34$  Wells pro Gruppe). Darstellung in Form von Box-Plots mit zusätzlicher Angabe des Mittelwerts (+). Median als durchgehende Linie in der Box angegeben. Die y-Achse stellt die Gesamtzellzahl dar. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Gruppen. Milde Ausreißerwerte (zwischen  $1,5x$  IQR und  $3x$  IQR) werden mit einem Kreis markiert, extreme Ausreißer ( $> 3x$  IQR) sind mit einem Stern (\*) dargestellt. Die mit S markierte Gruppe zeigte im Gruppenvergleich zur Lösemittel-Kontrolle (*solvent control*) einen signifikanten Unterschied.

Hoechst: Zellkernfärbung, IgG: Immunglobulin G, IQR: Interquartilsabstand, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, ml: Milliliter, n: Anzahl, ng: Nanogramm, S: Signifikantes Ergebnis, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

## Deskriptive Statistik: Gesamtzellzahl

Gruppe	M	SD	Min.	Max.	Perzentile		
					25%	50%	75%
<i>solvent control</i>	28563,4	19878,8	4423,0	75772,0	11323,3	23628,0	41920,8
IgG-Kontrolle 30 µg/ml	27005,6	16558,3	7906,0	70213,0	15358,8	21045,5	41558,3
1A7 10 µg/ml	26274,2	17147,4	5096,0	70508,0	12666,0	24356,0	29982,3
1A7 30 µg/ml	26960,3	16258,5	5563,0	64449,0	15256,3	20871,5	36407,0
Li03 10 µg/ml	25429,2	14426,5	7630,0	68717,0	13213,3	22409,0	32401,0
Li03 30 µg/ml	25910,8	15656,0	8883,0	71519,0	13154,3	22267,5	35335,5
Li81 10 µg/ml	23610,6	12296,7	6986,0	68754,0	14918,3	23113,0	31065,0
Li81 30 µg/ml	23145,3	9122,2	9253,0	48329,0	15444,8	22282,5	28491,8
T3 30 ng/ml	19041,6	14494,2	4500,0	67016,0	7737,8	16474,5	24036,3

**Tabelle 22: Gesamtzellzahl (anti-LINGO-1 Experiment)**

Deskriptive Statistik zu Abb. 3.7. Tabelle zum Mann-Whitney-U-Test ist im Anhang zu finden. IgG: Immunglobulin G, LINGO-1: *leucine-rich repeat and Ig-like domain-containing Nogo receptor interacting protein 1*, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, M: Mittelwert, Max.: Maximum, Min.: Minimum, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, SD: Standardabweichung, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die IgG-Kontrolle zeigte im Vergleich zur *solvent control* keine signifikanten Unterschiede bezüglich Myelinisierungsgrad, Axonlänge sowie Gesamtzellzahl. Die Positivkontrolle mit T3 wies im Vergleich zur *solvent control* eine statistisch signifikante Zunahme des Neuritenwachstums sowie der Myelinisierung bei zeitgleich signifikanter Abnahme der Gesamtzellzahl auf. Hierbei muss hervorgehoben werden, dass unter allen Testkonditionen die

Myelinisierung der Axone durch T3 am stärksten zunahm. Des Weiteren konnte nur unter T3 ein signifikanter Einfluss auf die Gesamtzellzahl nachgewiesen werden. Die Antikörper Li03 und Li81 in 10 µg/ml förderten im Vergleich zueinander die Myelinisierung in ähnlichem Ausmaß (relative Zunahme um 48% bzw. 43%). Die Ergebnisse hierzu waren zudem statistisch signifikant. Nur Li81 konnte unter den anti-LINGO-1 Antikörpern zusätzlich eine signifikante Zunahme der Dichte des axonalen Netzwerkes hervorrufen. Im Vergleich zu T3 fällt die Zunahme des Neuritenwachstums unter Li81 10 µg/ml auch stärker aus. In den Gruppen Li03 sowie Li81 jeweils 30 µg/ml sowie 1A7 in niedriger und hoher Konzentration (10 µg/ml und 30 µg/ml) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich Myelinisierungsgrad, Axonlänge sowie Gesamtzellzahl nachgewiesen werden. Allerdings zeichnete sich der Trend ab, dass die Myelinisierung der Axone bei einer Antikörperkonzentration von 30 µg/ml verglichen mit einer Konzentration von 10 µg/ml geringer ausgeprägt war. Für den Antikörper 1A7 mit 30 µg/ml fiel der Myelinisierungsgrad im Vergleich zur *solvent control* sogar geringer aus ( $p > 0,05$ ).

## 4 Diskussion

Im Fokus unserer Arbeit steht die Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens auf Basis von SCCs um zukünftig in großem Umfang Substanzen auf ihre (re-)myelinisierenden Eigenschaften zu untersuchen. Hierzu setzten wir in Zusammenarbeit mit der Firma Hoffmann-La Roche drei anti-LINGO-1 Antikörper ein und bewerteten deren Effekt auf die primäre Myelinisierung, die Axonlänge sowie die Zellzahl.

### 4.1. Aufbau des anti-LINGO-1 Experiments

Die anti-LINGO-1 Versuchsreihe wurde anhand unserer Beobachtungen zur Entwicklung der SCCs sowie der Ergebnisse der Western Blot Analyse aufgebaut. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle entwickelten die SCCs innerhalb der ersten Woche in Kultur ein dichtes axonales Netzwerk. DIV 7 eignete sich somit als Beginn der Versuchsreihe, da die axonale Vernetzung das Gerüst für die darauffolgende Myelinisierung darstellte. Nach ungefähr 2 Wochen setzte die Myelinisierung der SCCs ein, welche in den Wochen 4 bis 5 ihr Maximum erreichte (Ergebnisse nicht dargestellt). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Thomson und Kollegen (Thomson et al., 2008). Mit Beginn der 5. Woche zeigte sich in unseren Kulturen ein zunehmender Rückgang des axonalen Geflechts mit Entstehung von Hohlräumen innerhalb der Kultur, weshalb die SCC-Kultivierung für die anti-LINGO-1 Versuchsreihe unsererseits auf 3 Wochen begrenzt wurde.

Die Western Blot Analyse diente dazu das Expressionsmuster von LINGO-1 in SCCs über den Kultivierungszeitraum darzustellen. Anhand des LINGO-1 Expressionsmusters sollte der optimale Zeitraum für die anti-LINGO-1 Behandlung definiert werden. Das Ausmaß der LINGO-1 Expression erreichte für den Zeitraum DIV 9-16 ihr Maximum. Die normalisierten Werte zur LINGO-1 Expression wiesen zwischen den drei durchgeführten Western Blots zum Teil deutliche Unterschiede auf. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse zur besseren Vergleichbarkeit in die Gruppen „DIV 5-16“ und „DIV 19-30“ zusammengefasst und gegenübergestellt. Der Vergleich der Mediane beider Gruppen zeigte, dass die LINGO-1 Expression in der ersten Hälfte des Kultivierungszeitraums (DIV 5-16) wesentlich stärker als in der zweiten Hälfte (DIV 19-30) ausgeprägt war. Die Ergebnisse sprechen für eine stärkere LINGO-1 Expression im früheren Entwicklungsstadium der SCCs. Unsere Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Mi et al., welche ebenfalls eine verstärkte LINGO-1 Expression zu Beginn des sich entwickelnden ZNS nachweisen konnten (Mi et al., 2004). Damit stellt die Zeitspanne der stärksten LINGO-1 Expression (DIV 9-16) den optimalen Zeitraum für die anti-LINGO-1 Behandlung dar. Die durchgeführten Western Blots dienten zur Planung der anti-LINGO-1 Experimente, sodass aufgrund des geringen Stichprobenumfangs sowie der teilweise deutlichen

Streuung der Einzelwerte auf eine tiefergehende statistische Auswertung verzichtet wurde. Basierend auf unseren Beobachtungen zur Entwicklung der SCCs sowie der Ergebnisse der Western Blot Analyse wurde der Behandlungszeitraum von DIV 7-21 gewählt.

Die von uns genutzten Zellkulturplatten bestehen aus insgesamt 96 Wells. Allerdings wurden aufgrund des stärkeren Verdunstungseffekts in den außenliegenden Wells (Rand-Wells) lediglich die im Inneren befindlichen Wells von uns genutzt. Zusätzlich wurden zur Reduktion des Verdunstungseffekt die übrigen nicht Zell-besetzten Wells sowie der umliegende Graben mit DPBS aufgefüllt. Damit pro Platte eine ausreichende Anzahl an Wells für die Behandlungsgruppen zur Verfügung stehen, wollten wir für die Kontrollen (*solvent control* und IgG-Kontrolle) lediglich eine der beiden Konzentrationen einsetzen. Aus diesem Grund führten wir Vorversuche durch, um zu untersuchen, ob für die Kontrollen ein dosisabhängiger Unterschied vorliegt. Für die *solvent control* zeigte sich hinsichtlich des Myelinisierungsgrades und der Axonlänge kein signifikanter Unterschied. Deshalb entschieden wir uns für ein äquivalentes Volumen an Antikörper-Lösemittel, das dem der anti-LINGO-1 Behandlungsgruppen mit 10 µg/ml entspricht. Für die IgG-Kontrolle konnte hinsichtlich des Myelinisierungsgrades kein dosisabhängiger Unterschied nachgewiesen werden. Allerdings konnte zwar eine geringe, aber dafür signifikante Zunahme der Axonlänge für eine IgG-Konzentration von 30 µg/ml im Vergleich zu einer Konzentration von 10 µg/ml nachgewiesen werden. Eine unspezifische Antikörper-Interaktion konnte hiermit nicht sicher ausgeschlossen werden. Aufgrund des geringen Unterschieds hinsichtlich des Neuritenwachstums wählten wir für die IgG-Kontrolle eine Konzentration von 30 µg/ml. Die Bestimmung der optimalen T3-Konzentration erfolgte basierend auf unseren Beobachtungen in anderen Vorversuchen in denen Konzentrationen von 30, 50, 100 sowie 200 ng/ml T3 eingesetzt wurden (Ergebnisse nicht dargestellt). Unter 30 ng/ml T3 konnte unsererseits eine optimale Verstärkung der Myelinisierung ohne Gefahr eines verfrühten Proliferationsstopps erreicht werden.

#### 4.2 Einfluss der anti-LINGO-1 Behandlung auf die primäre Myelinisierung

Der Vergleich zwischen *solvent control* und IgG-Kontrolle zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Myelinisierungsgrades, der Axonenlänge und der Zellzahl. Dies bedeutet, dass kein relevanter Einfluss durch unspezifische Antikörper-Interaktionen nachgewiesen werden konnte. Unter den anti-LINGO-1 Antikörpern erhöhte, mit Ausnahme von 1A7, die Behandlung in niedriger Konzentration (10 µg/ml) den Anteil an myelinisierten Axone signifikant. Sowohl Li03 als auch Li81 gehören zu den von Biogen weiterentwickelten anti-LINGO-1 Antikörpern (Mi et al., 2019). Im Vergleich zum Vorläufer 1A7 weisen Li03 und Li81 eine höhere Bindungsaffinität zu LINGO-1 auf. Außerdem binden Li03 und Li81 nicht direkt an

die für die Wirkung von LINGO-1 mitverantwortliche Fc-Region, sondern an die LRR-Wiederholungssequenz (Mi et al., 2019, Pepinsky et al., 2014). Für Li81 konnte im Rahmen von Strukturanalysen gezeigt werden, dass durch Bindung an das LRR-Motiv von LINGO-1 eine Tetramerisierung (Bindungsmodus 2:2) hervorgerufen wird (Pepinsky et al., 2014). Diese Konfiguration sorgt für eine sterische Blockade von LINGO-1, indem die Fc-Region ins Innere des Tetramers gerichtet und somit nicht frei zugänglich für Co-Rezeptoren ist (Pepinsky et al., 2014). Für Li03 sind keine näheren Angaben zum Bindungsmodus publiziert worden. Es ist anzunehmen, dass diese optimierten Bindungseigenschaften von Li03 und Li81 auch in unserem Experiment ursächlich für die bessere Wirksamkeit sind. In einer Konzentration von 10 µg/ml führte Li81 als einziger unter den eingesetzten anti-LINGO-1 Antikörpern auch zu einem signifikant dichteren Ausbau des neuronalen Netzwerks. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche im Vorfeld bereits zeigen konnten, dass die Blockade von LINGO-1 bzw. der nachfolgenden RhoA-ROCK-Signalkaskade den Kollaps des axonalen Wachstumskegels vermindert und damit das Neuritenwachstum fördert (zusammengefasst in Gallo and Letourneau, 2004, Katoh et al., 1996, Katoh et al., 1998). Zusätzlich bewirkt die Hemmung von LINGO-1, sowohl direkt über den ErbB2-Signalweg als auch in Zusammenspiel mit p75 und NgR, eine verstärkte Differenzierung von OPCs zu reifen (myelinisierenden) Oligodendrozyten (Lee et al., 2014, Mathew et al., 2009, Paintlia et al., 2005, Paintlia et al., 2008, Pedraza et al., 2014). Ein indirekter Hinweis auf eine verstärkte Oligodendrozyten-Differenzierung könnte im Sinne eines früher einsetzenden Proliferationsstopp mit einer reduzierten Zellzahl einhergehen. Die Quantifizierung der Gesamtzellzahl zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen *solvent control* und den Antikörpern 1A7, Li03 sowie Li81 (jeweils 10 und 30 µg/ml), sodass der (indirekte) Nachweis für eine verstärkte Zelldifferenzierung im Falle der anti-LINGO-1 Antikörper ausblieb.

Die Behandlung mit den anti-LINGO-1 Antikörpern in hoher Dosierung (30 µg/ml) führte zu keiner signifikanten Verstärkung der Myelinisierung. Für 1A7 in 30 µg/ml zeichnete sich sogar ein Trend zur Abnahme des axonalen Myelinisierungsgrades ab ( $p > 0,05$ ). Im Rahmen von Vorversuchen setzten wir anfangs auch eine niedrigere Dosis (3 µg/ml) von 1A7, Li03 und Li81 ein. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Myelinisierung beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt), weshalb in den darauffolgenden Versuchen auf eine niedrige Dosis von anti-LINGO-1 Antikörpern verzichtet wurde. Unter Berücksichtigung der oben genannten Beobachtungen in unseren Vorversuchen bestehen deutliche Parallelen zwischen unseren Ergebnissen und denen der SYNERGY-Studie. In der SYNERGY-Studie wurde der Anteil an Probanden aus den Opicinumab-Behandlungsgruppen bestimmt, der einen klinisch relevanten Rückgang der Beschwerden aufwies und mit einer Placebogruppe verglichen (Cadavid et al., 2019). Der Anteil an Probanden mit relevanter klinischer Verbesserung unterschied sich zwischen der Behandlungsgruppe mit Opicinumab

(Li81) in niedriger Konzentration (3 mg/kg KG) und der Placebogruppe nicht signifikant (47% vs. 49% der Patienten der Placebogruppe). In der Behandlungsgruppe mit 100 mg Opicinumab /kg KG zeigte sich im Vergleich zur Placebogruppe sogar der Trend einer geringeren Rückbildungstendenz der Symptome (40% vs. 49% in der Placebogruppe;  $p > 0,05$ ). Diese Beobachtung deckt sich mit unseren Ergebnissen insofern, dass die Behandlung mit hochdosiertem Li03 und Li81 (30  $\mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zur Behandlung mit 10  $\mu\text{g/ml}$  eine geringere Förderung der Myelinisierung aufwies. 1A7 in 30  $\mu\text{g/ml}$  zeigte verglichen mit der *solvent control* sogar eine Abnahme des Myelinisierungsgrades ( $p > 0,05$ ). Allerdings muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass sich der Wirkmechanismus und die Bindungsaffinität zu LINGO-1 zwischen 1A7 und Opicinumab (Li81) unterscheiden (Mi et al., 2019, Pepinsky et al., 2014). Die signifikante Symptomrückbildung in der Behandlungsgruppe mit Opicinumab in mittlerer Dosierung (30 mg/kg KG) zeigt Parallelen zur signifikant gesteigerten Myelinisierung mit Li03 und Li81 in ebenfalls mittlerer Dosierung (10  $\mu\text{g/ml}$ ) in unserer Versuchsreihe. Unsere Versuchsergebnisse sowie die der SYNERGY-Studie weisen auf eine nicht-lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung hin. Die genaue Ursache, warum die anti-LINGO-1 Behandlung in höherer Dosierung keine bessere Wirkung zeigte, ist derzeit nicht bekannt. Ein möglicher Grund könnte in der Funktion von LINGO-1 als Co-Rezeptor gesehen werden. Die Blockade des LINGO-1 Rezeptors könnte dazu führen, dass die ansonsten mit LINGO-1 interagierenden Co-Rezeptoren vermehrt über andere Signalkaskaden wirksam sind. Zum Beispiel erfüllt p75 unterschiedliche Aufgaben im menschlichen Organismus einschließlich des ZNS. Es konnte nachgewiesen werden, dass p75 in Abhängigkeit von Liganden und anderen Rezeptoren ebenso die Myelinisierung sowie das Neuritenwachstum fördern, als auch den Zelltod und damit eine (Neuro-)Degeneration herbeiführen kann (Casaccia-Bonofil et al., 1996, Friedman, 2000, Mathew et al., 2009). Eine vermehrte Blockade von LINGO-1 könnte dazu führen, dass p75 zunehmend über andere Signalwege seine Wirkung ausübt. Möglicherweise könnte p75 hierüber eine im Vergleich zum LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplex negativeren Einfluss auf die Myelinisierung bzw. Regeneration im ZNS haben. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass der LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplex nur durch Bindung von Myelinbestandteilen den RhoA-ROCK-Signalweg aktiviert und damit eine Hemmung der Myelinisierung herbeiführt. Durch Bindung von NGF an den LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplex kommt es dagegen zur Hemmung des RhoA-ROCK-Signalwegs (Mathew et al., 2009). Diese aktiv vermittelte Hemmung der Hemmung führt wiederum zu einem gesteigerten Wachstum der Axone sowie einer vermehrten Differenzierung von Oligodendrozyten (Mathew et al., 2009, Paintlia et al., 2005, Paintlia et al., 2008, Pedraza et al., 2014). In welchem Ausmaß der LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor durch Bindung von NGF die Myelinisierung fördert, ist nicht ausreichend bekannt. Der LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplex nimmt durch seinen sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf den RhoA-

ROCK-Signalweg eine regulierende Funktion für Myelinisierungsvorgänge ein. Es ist vorstellbar, dass bei zunehmendem Wegfall des LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes auch vermehrt dessen inhibitorische Wirkung auf den RhoA-ROCK-Signalweg abnimmt, was sich ab einem gewissen Ausmaß zunehmend negativ auf die Regeneration auswirken könnte. Die Behandlung mit anti-LINGO-1 Antikörpern könnte somit möglicherweise ab einer gewissen Dosis zu einer Umkehr des promyelinisierenden Effekts führen. Hierbei handelt es sich um einen rein theoretischen Erklärungsansatz auf Basis des bisherigen Kenntnisstands über die Wirkweise von LINGO-1.

Zusammenfassend konnte unter Einsatz von anti-LINGO-1 Antikörpern eine signifikante Verstärkung der primären Myelinisierung der SCCs nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Behandlung mit anti-LINGO-1 Antikörpern führte der Einsatz von T3 neben einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl zur stärksten Myelinisierung. Angesichts der deutlich gesteigerten Myelinisierung lässt sich die reduzierte Zellzahl nicht durch eine vermehrte Apoptose von Rückenmarkszellen sinnvoll erklären. Vielmehr ist anzunehmen, dass durch Einsatz von T3 eine beschleunigte Zelldifferenzierung einsetzt, welche einen früheren Proliferationsstopp (von Gliazellen) hervorruft. Diese Annahme ist nach bisherigem Forschungsstand am plausibelsten (Barres et al., 1994, Billon et al., 2001, Lü et al., 2008). In Zusammenschau der Ergebnisse hat sich T3 aufgrund seiner promyelinisierenden Effekte als Positivkontrolle in unserem Versuchsmodell bewährt. Aufgrund seiner vielfältigen Effekte auf den gesamten (menschlichen) Organismus und den damit einhergehenden Nebenwirkungen (zusammengefasst in Paschke and Voigt, 2010) eignet sich T3 trotz der oben beschriebenen positiven Effekte im SCC-Modell nicht als Therapeutikum bei demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen.

#### 4.3 Modell der SCC als Hochdurchsatz-Screeningverfahren

Zu den Grundvoraussetzungen eines Hochdurchsatz-Screeningverfahrens gehören zusammengefasst eine etablierte und auch weitgehend automatisierbare Methode, welche in kurzer Zeit reproduzierbare sowie kohärente Ergebnisse garantiert. Neben der Zeitersparnis muss die Hochdurchsatzmethode auch wirtschaftlich sein. Experimente auf Basis von SCCs erfordern im Vergleich zum EAE-Modell eine geringere Anzahl an Versuchstieren. Gemessen an unserer (Zell-)Ausbeute konnte die Zahl an Versuchstieren im Gegensatz zum EAE-Modell in vergleichbaren Stichprobenumfang um mehr als 70% reduziert werden. Das SCC-Modell erfordert keine Untersuchungen am lebenden Tier, wodurch deutlich geringere Kosten für die Tierhaltung entstehen. Dagegen werden die Versuchstiere im Rahmen von EAE-Versuchsreihen meist über mehrere Wochen gehalten. In diesem Zeitraum müssen die Tiere mit den zu untersuchenden Substanzen regelmäßig behandelt werden. Neben den hohen personellen Kosten

bzw. dem zeitlichen Aufwand werden zum Erreichen der gewünschten Wirkstoffkonzentration im Vergleich zum SCC-Modell größere Mengen an Testsubstanzen verbraucht. Dieser Aspekt spielt insbesondere bei teuren bzw. aufwendig herzustellenden Substanzen, wie z.B. Antikörpern eine entscheidende Rolle. Außerdem wird durch die Übertragung der komplexen *in vivo* Situation auf ein definiertes Zellkultursystem die Untersuchung von Myelinisierungsvorgängen oder auch ZNS-Pathologien vereinfacht (Buchser et al., 2004, Merrill, 2009). Zugleich bleibt im Gegensatz zu Mono-Zellkulturen, wie z.B. isolierten OPC-Kulturen, Zellinteraktionen zwischen Neuronen und Gliazellen in SCCs erhalten. Im Vergleich zum EAE-Modell und zu Gewebekulturen, wie der von unserer Arbeitsgruppe genutzten *organotypic brain slice cultures* (OSCs), ist die Präparation von SCCs weniger aufwendig. Zudem ist die Kultivierung der SCCs im 96-Well Mikrotiterformat platzsparender und somit im Sinne eines Hochdurchsatzverfahrens effizienter. Nach Fixation und Anfärbung der SCCs ist mithilfe von *High-Content Imaging* Systemen, wie dem von uns genutzten Operetta-System eine halbautomatische Auswertung der Versuche möglich. Darüber hinaus können Zellkulturen einfach für andere Analyseverfahren wie z.B. Western Blots oder Durchflusszytometrie genutzt werden.

Neben den genannten ökonomischen Aspekten spielen auch ethische Gesichtspunkte eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang ist das von William Russell und Rex Burch definierte 3-R-Prinzip (*replace, reduce, refine*) zu nennen (Russell; and Burch, 1959). Durch Ausbau und Weiterentwicklung von z.B. *in vitro* Modellen sollen Tierversuche zukünftig zunehmend ersetzt werden (*replace*). Wie bereits eingangs erwähnt wird durch das SCC-Modell die Anzahl an Versuchstieren verglichen mit der EAE-Methode deutlich reduziert (*reduce*). Zur Organentnahme erfolgt die direkte Tötung (nach zuvor eingeleiteter CO<sub>2</sub>-Narkose) ohne vorangegangene Lebendversuche. Hiermit kann das Leid der Tiere ebenfalls auf ein Minimum verringert werden (*refine*).

Insgesamt erfüllt das SCC-Modell unter ökonomischen sowie ethischen Gesichtspunkten die Grundvoraussetzungen für ein Hochdurchsatz-Screeningverfahren und stellt somit eine sinnvolle Ergänzung für die neurobiologische Grundlagen- sowie MS-Forschung dar.

#### 4.4 Einschränkungen der Arbeit

In einem ersten Schritt konnten wir unter Einsatz der anti-LINGO-1 Antikörper ein Hochdurchsatz-Screeningverfahren etablieren, mit dem wir im Stande sind Substanzen auf beispielsweise promyelinisierende Eigenschaften zu untersuchen. Die Auswertung der Versuchsergebnisse zeigte, dass einige Einzelwerte deutlich streuten. Angesichts des mäßigen Stichprobenumfangs (n = 34) begünstigt diese Streuung, dass einige Ergebnisse nicht statistisch

signifikant sind. Zur Verbesserung der Aussagekraft der Ergebnisse ist eine Erhöhung des Stichprobenumfangs sinnvoll.

Mit unserer Versuchsreihe können derzeit ausschließlich Rückschlüsse auf die primäre Myelinisierung gezogen werden. Diese unterliegt zum Teil anderen Mechanismen als die sekundäre Myelinisierung nach vorangegangener Demyelinisierung. Ein konkretes Beispiel stellt hierbei die Wirkweise des ternären LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplexes dar. Dieser Rezeptorkomplex wird vorwiegend durch Freisetzung von Myelinbestandteilen als Ausdruck einer Schädigung des ZNS aktiviert (Chong et al., 2012, Domeniconi et al., 2002, Fournier et al., 2001, Fournier et al., 2002, Liu et al., 2002, Wang et al., 2002b, Wang et al., 2002a). Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass der LINGO-1/p75/Nogo-66-Rezeptor-Komplex die primäre Myelinisierung nicht wesentlich beeinflusst. Die in unserem Experiment nachgewiesenen positiven Effekte auf die Myelinisierung sind vorwiegend auf andere Signalkaskaden, wie z.B. dem ErbB2-Signalweg (Lee et al., 2014), zurückzuführen. Hierdurch konnte unsererseits nicht das volle Potential der anti-LINGO-1 Antikörper-Behandlung dargestellt werden. Dementsprechend muss für zukünftige Untersuchungen ein (immunvermitteltes) Demyelinisierungsverfahren entwickelt werden. Damit könnten Vorgänge demyelinisierender ZNS-Erkrankungen bestmöglich widerspiegelt werden.

Die Kultivierung einer ZNS-Mischkultur kann die Analyse der komplexen Myelinisierungsvorgänge vereinfachen. Allerdings führt der Transfer der komplexen 3D-Architektur des ZNS in ein Zellsystem dazu, dass die erhobenen Ergebnisse nur eingeschränkt auf die eigentliche *in vivo* Situation übertragen werden können. Zum Beispiel sind die SCCs den eingesetzten Substanzen direkt ausgesetzt, da in diesem Modell keine relevante Barriere, im Sinne einer Blut-Hirn-Schranke, existiert. Im Gegensatz dazu könnten zuvor erfolgreich getestete Substanzen beim Menschen aufgrund der oben genannten Barrierefunktion am Übertritt vom Blut ins ZNS gehindert werden und somit nicht ihre Wirkkonzentration am Zielort erreichen. Einen weiteren Unterschied zwischen dem SCC-Modell und der *in vivo* Situation bei MS-Patienten stellt der fehlende Einfluss von (peripheren) Immunzellen dar (zusammengefasst in Alvarez et al., 2011, und in Hemmer et al., 2002). Zudem muss ähnlich wie beim EAE-Modell von interspezifischen Unterschieden zwischen den Zellen des Menschen und beispielsweise denen von Nagetieren ausgegangen werden. Diese strukturellen Unterschiede führen beim SCC-Modell, ähnlich wie bei den Tierversuchsmodellen (Merrill, 2009, zusammengefasst in Mestas and Hughes, 2004), dazu, dass keine gesicherten Aussagen über die Verträglichkeit und Wirksamkeit von potenziellen Therapeutika für den Menschen getroffen werden können. Zusammengefasst kann das SCC-Modell als *ex vivo* Modell nicht alle Aspekte der *in vivo* Situation abbilden.

#### 4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick in die Zukunft

Im Rahmen unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass die Behandlung mit anti-LINGO-1 Antikörpern die primäre Myelinisierung der Rückenmarkskulturen signifikant fördert. Hierbei ist hervorzuheben, dass die Verbesserung der Bindungsaffinität der neueren Generation der anti-LINGO-1 Antikörper in unseren Versuchen einen deutlichen Unterschied zeigte (Li03/Li81 vs. 1A7). Durch Einsatz von 30 µg/ml anti-LINGO-1 Antikörper konnte im Vergleich zur Gruppe mit 10 µg/ml anti-LINGO-1 Antikörper eine geringe Steigerung der Myelinisierung beobachtet werden. Im Falle des Antikörpers 1A7 zeigte sich bei einer Konzentration von 30 µg/ml sogar im Vergleich zur *solvent control* eine leichte Abnahme des Myelinisierungsgrades. Diese Ergebnisse sind zwar nicht statistisch signifikant, allerdings weisen unsere Beobachtungen Parallelen zur SYNERGY-Studie auf, in der eine inverse, U-förmige Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen wurde (Cadavid et al., 2019). Die Ursache hierfür ist derzeit noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die SYNERGY-Studie konnte ähnlich zu unserer Versuchsreihe lediglich einen mäßig positiven Effekt auf die Myelinisierung bzw. Rückbildung von Symptomen für vorwiegend junge Patienten in frühem Krankheitsstadium nachweisen (Cadavid et al., 2019). Allerdings stellt die Behandlung mit anti-LINGO-1 Antikörpern einen alternativen Behandlungsansatz zu den bisherigen MS-Therapeutika dar. Sowohl die akute Behandlung von Schüben sowie die Schubprophylaxe basieren darauf das Immunsystem zu modulieren, um das Fortschreiten der MS und die damit einhergehende Zunahme von kognitiven sowie körperlichen Einschränkungen zu vermindern (Hemmer and al., 2021). Die anti-LINGO-1 Behandlung setzt dagegen primär an der Remyelinisierung und nicht an einer Modulation der Entzündungsreaktion an und bietet somit einen zusätzlichen Behandlungsansatz. Derzeit sind noch weitere Untersuchungen erforderlich, ob und wie die Behandlung mit anti-LINGO-1 Antikörpern in die bisherigen MS-Therapieschemata integriert werden können, damit eine bestmögliche Regeneration und somit ein günstiger Verlauf der MS erreicht werden kann.

Das Modell der SCC ist sowohl in der (neurowissenschaftlichen) Grundlagen- sowie der MS-Forschung vielfältig einsetzbar (Thomson et al., 2008). Durch Isolierung der SCCs aus der komplexen *in vivo* Situation wird die gezieltere Analyse von Myelinisierungsvorgängen bzw. die Auswirkungen von Testsubstanzen vereinfacht. Trotzdem bleiben wichtige Zellinteraktionen in der Mischzellkultur erhalten (Buchser et al., 2004). Hiermit wird eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus im Vergleich zu Einzelzellkultursystemen angestrebt. Allerdings bestehen ähnlich wie beim EAE-Modell weiterhin interspezifische Unterschiede, z.B. im Hinblick auf immunologische Vorgänge (zusammengefasst in Mestas and Hughes, 2004), die insgesamt noch nicht weitreichend verstanden sind. Außerdem können im Vergleich zu Tierversuchsmodellen mithilfe des SCCs geringe Rückschlüsse auf mögliche

Nebenwirkungen gezogen werden. Dennoch stellt das SCC-Modell eine wertvolle Ergänzung zum etablierten EAE-Modell dar, weil es die Möglichkeit bietet in kurzer Zeit eine Vielzahl an Experimenten unter definierten Bedingungen durchzuführen. Außerdem ist die Kultivierung im Mikrotiter-Format im Vergleich zur Tierhaltung beim EAE-Modell platzsparender und weniger kosten- sowie zeitintensiv. Darüber hinaus konnten wir mithilfe des SCC-Modells die Anzahl an Versuchstieren und gleichzeitig auch das Leid der Tiere deutlich reduzieren (3-R-Prinzip). Aus oben genannten Gründen lässt sich sagen, dass sich SCCs für den Einsatz von Hochdurchsatz-Screenings eignen. Allerdings muss angemerkt werden, dass noch Weiterentwicklungen unserer Methodik erforderlich sind. Zur Optimierung der SCC-Methode möchten wir zukünftig ein (stabiles) immunvermitteltes De- und Remyelinisierungsverfahren etablieren. Angelehnt an das von uns ebenfalls genutzte Modell der Kleinhirnschnittkulturen sollen hierzu Antikörper und Komplement-System zum Einsatz kommen (Winter et al., 2016). Nach Adaption der De- und Remyelinisierungsmethode auf das SCC-Modell können gemeinsame Endpunkte der Struktur-/Interaktionsanalyse der Kleinhirnschnittkulturen mit dem Hochdurchsatz-Screening der SCCs verglichen werden. Durch die Kombination von Struktur-/Interaktionsanalysen und Wirkstoff-Screening wäre es uns möglich bessere Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation ziehen zu können. In einem weiteren Schritt streben wir, ähnlich zum Hirnschnittkultursystem, eine *Live-Imaging* Methode unter Verwendung von immunfluoreszierenden Mäusestämmen an. Das *Live-Imaging* ermöglicht es Einflüsse von Testsubstanzen an noch lebenden Zellkulturen in Echtzeit zu untersuchen. Für zukünftige Versuchsreihen ist zudem die standardmäßige Anfärbung von entwicklungspezifischen Markern wie *neural/glial antigen 2* (NG2) für Oligodendrozyten-Vorläuferzellen geplant. Im Gegensatz zur alleinigen Bestimmung der Gesamtzellzahl könnten somit exaktere Rückschlüsse auf den Einfluss von Testsubstanzen auf die Oligodendrozyten-Entwicklung geschlossen werden. Mit dieser Arbeit konnten die Grundsteine für die oben genannten Optimierungen unseres Hochdurchsatzverfahrens gelegt werden.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ALVAREZ, J. I., CAYROL, R. & PRAT, A. 2011. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 252-64.
- BARATEIRO, A. & FERNANDES, A. 2014. Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 1917-29.
- BARRES, B. A., LAZAR, M. A. & RAFF, M. C. 1994. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development*, 120, 1097-108.
- BATES, D. 2011. Treatment effects of immunomodulatory therapies at different stages of multiple sclerosis in short-term trials. *Neurology*, 76, S14-25.
- BILLON, N., TOKUMOTO, Y., FORREST, D. & RAFF, M. 2001. Role of thyroid hormone receptors in timing oligodendrocyte differentiation. *Dev Biol*, 235, 110-20.
- BLAKEMORE, W. F. 1974. Pattern of remyelination in the CNS. *Nature*, 249, 577-578.
- BOURIKAS, D., MIR, A. & WALMSLEY, A. R. 2010. LINGO-1-mediated inhibition of oligodendrocyte differentiation does not require the leucine-rich repeats and is reversed by p75(NTR) antagonists. *Mol Cell Neurosci*, 45, 363-9.
- BUCHSER, W., COLLINS, M., GARYANTES, T., GUHA, R., HANEY, S., LEMMON, V., LI, Z. & TRASK, O. J. 2004. Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging. In: MARKOSSIAN, S., GROSSMAN, A., BRIMACOMBE, K., ARKIN, M., AULD, D., AUSTIN, C. P., BAELL, J., CHUNG, T. D. Y., COUSSENS, N. P., DAHLIN, J. L., DEVANARAYAN, V., FOLEY, T. L., GLICKSMAN, M., HALL, M. D., HAAS, J. V., HOARE, S. R. J., INGLESE, J., IVERSEN, P. W., KALES, S. C., LAL-NAG, M., LI, Z., MCGEE, J., MCMANUS, O., RISS, T., SARADJIAN, P., SITTAMPALAM, G. S., TARSELLI, M., TRASK, O. J., JR., WANG, Y., WEIDNER, J. R., WILDEY, M. J., WILSON, K., XIA, M. & XU, X. (eds.) *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- CADAVID, D., MELLION, M., HUPPERTS, R., EDWARDS, K. R., CALABRESI, P. A., DRULOVIĆ, J., GIOVANNONI, G., HARTUNG, H. P., ARNOLD, D. L., FISHER, E., RUDICK, R., MI, S., CHAI, Y., LI, J., ZHANG, Y., CHENG, W., XU, L., ZHU, B., GREEN, S. M., CHANG, I., DEYKIN, A. & SHEIKH, S. I. 2019. Safety and efficacy of opicinumab in patients with relapsing multiple sclerosis (SYNERGY): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol*, 18, 845-856.
- CASACCIA-BONNEFIL, P., CARTER, B. D., DOBROWSKY, R. T. & CHAO, M. V. 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*, 383, 716-9.
- CHANG, A., NISHIYAMA, A., PETERSON, J., PRINEAS, J. & TRAPP, B. D. 2000. NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, 20, 6404-12.
- CHAPMAN, B. S. 1995. A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett*, 374, 216-20.
- CHONG, S. Y., ROSENBERG, S. S., FANCY, S. P., ZHAO, C., SHEN, Y. A., HAHN, A. T., MCGEE, A. W., XU, X., ZHENG, B., ZHANG, L. I., ROWITCH, D. H., FRANKLIN, R. J., LU, Q. R. & CHAN, J. R. 2012. Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 1299-304.
- CRISTE, G., TRAPP, B. & DUTTA, R. 2014. Axonal loss in multiple sclerosis: causes and mechanisms. *Handb Clin Neurol*, 122, 101-13.
- DE STEFANO, N., MATTHEWS, P. M., FU, L., NARAYANAN, S., STANLEY, J., FRANCIS, G. S., ANTEL, J. P. & ARNOLD, D. L. 1998. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain*, 121 ( Pt 8), 1469-77.

- DEISENHAMMER, F., ZETTERBERG, H., FITZNER, B. & ZETTL, U. K. 2019. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*, 10, 726.
- DOMENICONI, M., CAO, Z., SPENCER, T., SIVASANKARAN, R., WANG, K., NIKULINA, E., KIMURA, N., CAI, H., DENG, K., GAO, Y., HE, Z. & FILBIN, M. 2002. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, 35, 283-90.
- FLACHENECKER, P., KOBELT, G., BERG, J., CAPSA, D. & GANNEDAHL, M. 2017. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe: Results for Germany. *Mult Scler*, 23, 78-90.
- FOURNIER, A. E., GRANDPRÉ, T., GOULD, G., WANG, X. & STRITTMATTER, S. M. 2002. Nogo and the Nogo-66 receptor. *Prog Brain Res*, 137, 361-9.
- FOURNIER, A. E., GRANDPRE, T. & STRITTMATTER, S. M. 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*, 409, 341-6.
- FRIEDMAN, W. J. 2000. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci*, 20, 6340-6.
- FRIEDMAN, W. J. & GREENE, L. A. 1999. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res*, 253, 131-42.
- FRÜHBEIS, C., KUO-ELSNER, W. P., MÜLLER, C., BARTH, K., PERIS, L., TENZER, S., MÖBIUS, W., WERNER, H. B., NAVE, K. A., FRÖHLICH, D. & KRÄMER-ALBERS, E. M. 2020. Oligodendrocytes support axonal transport and maintenance via exosome secretion. *PLoS Biol*, 18, e3000621.
- FU, Q. L., HU, B., WU, W., PEPINSKY, R. B., MI, S. & SO, K. F. 2008. Blocking LINGO-1 function promotes retinal ganglion cell survival following ocular hypertension and optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 975-85.
- GALLO, G. & LETOURNEAU, P. C. 2004. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol*, 58, 92-102.
- GENSERT, J. M. & GOLDMAN, J. E. 1997. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron*, 19, 197-203.
- GOLDSCHMIDT, T., ANTEL, J., KÖNIG, F. B., BRÜCK, W. & KUHLMANN, T. 2009. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology*, 72, 1914-21.
- GRUCHOT, J., WEYERS, V., GÖTTLE, P., FÖRSTER, M., HARTUNG, H. P., KÜRY, P. & KREMER, D. 2019. The Molecular Basis for Remyelination Failure in Multiple Sclerosis. *Cells*, 8.
- HAGEMEIER, K., BRUCK, W. & KUHLMANN, T. 2012. Multiple sclerosis - remyelination failure as a cause of disease progression. *Histol Histopathol*, 27, 277-87.
- HEMMER, B. & AL., E. 2021. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*.
- HEMMER, B., CEPOK, S., NESSLER, S. & SOMMER, N. 2002. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. *Current Opinion in Neurology*, 15, 227-231.
- HOLSTIEGE, J., STEFFEN, A., GOFFRIER, B. & BÄTZING, J. 2017. Epidemiologie der Multiplen Sklerose –  
eine populationsbasierte deutschlandweite  
Studie.
- HUFSCHEMIDT, A., LÜCKING, C. H., RAUER, S. & GLOCKER, F. X. 2017. *Neurologie compact - Für Klinik und Praxis*, Thieme.
- JI, B., LI, M., WU, W.-T., YICK, L.-W., LEE, X., SHAO, Z., WANG, J., SO, K.-F., MCCOY, J. M., BLAKE PEPINSKY, R., MI, S. & RELTON, J. K. 2006. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 33, 311-320.
- KATOH, H., AOKI, J., ICHIKAWA, A. & NEGISHI, M. 1998. p160 RhoA-binding kinase ROKalpha induces neurite retraction. *J Biol Chem*, 273, 2489-92.

- KATOH, H., NEGISHI, M. & ICHIKAWA, A. 1996. Prostaglandin E Receptor EP3 Subtype Induces Neurite Retraction via Small GTPase Rho \*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 29780-29784.
- KIM, J. S. 2020. Development of a high-throughput drug screening platform for oligodendrocyte myelination (for progressive multiple sclerosis).
- KIM, J. Y., SUN, Q., OGLESBEE, M. & YOON, S. O. 2003. The role of ErbB2 signaling in the onset of terminal differentiation of oligodendrocytes in vivo. *J Neurosci*, 23, 5561-71.
- KIPP, M., VAN DER STAR, B., VOGEL, D. Y., PUENTES, F., VAN DER VALK, P., BAKER, D. & AMOR, S. 2012. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord*, 1, 15-28.
- KOBE, B. & KAJAVA, A. V. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*, 11, 725-32.
- KUHLMANN, T., MIRON, V., CUI, Q., WEGNER, C., ANTEL, J. & BRÜCK, W. 2008. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain*, 131, 1749-58.
- KUTZELNIGG, A. & LASSMANN, H. 2005. Cortical lesions and brain atrophy in MS. *J Neurol Sci*, 233, 55-9.
- LEE, X., SHAO, Z., SHENG, G., PEPINSKY, B. & MI, S. 2014. LINGO-1 regulates oligodendrocyte differentiation by inhibiting ErbB2 translocation and activation in lipid rafts. *Mol Cell Neurosci*, 60, 36-42.
- LEE, Y., MORRISON, B. M., LI, Y., LENGACHER, S., FARAH, M. H., HOFFMAN, P. N., LIU, Y., TSINGALIA, A., JIN, L., ZHANG, P. W., PELLERIN, L., MAGISTRETTI, P. J. & ROTHSTEIN, J. D. 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, 487, 443-8.
- LIEPINSH, E., ILAG, L. L., OTTING, G. & IBÁÑEZ, C. F. 1997. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo j*, 16, 4999-5005.
- LIU, B. P., FOURNIER, A., GRANDPRÉ, T. & STRITTMATTER, S. M. 2002. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*, 297, 1190-3.
- LOWENTHAL, A., VANSANDE, M. & KARCHER, D. 1960. The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. *J Neurochem*, 6, 51-6.
- LÜ, H. Z., WANG, Y. X., LI, Y., FU, S. L., HANG, Q. & LU, P. H. 2008. Proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells induced from rat embryonic neural precursor cells followed by flow cytometry. *Cytometry A*, 73, 754-60.
- MATHEW, S. J., HAUBERT, D., KRONKE, M. & LEPTIN, M. 2009. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J Cell Sci*, 122, 1939-46.
- MERRILL, J. E. 2009. In Vitro and In Vivo Pharmacological Models to Assess Demyelination and Remyelination. *Neuropsychopharmacology*, 34, 55-73.
- MESTAS, J. & HUGHES, C. C. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172, 2731-8.
- MI, S., LEE, X., SHAO, Z., THILL, G., JI, B., RELTON, J., LEVESQUE, M., ALLAIRE, N., PERRIN, S., SANDS, B., CROWELL, T., CATE, R. L., MCCOY, J. M. & PEPINSKY, R. B. 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 7, 221-8.
- MI, S., MILLER, R. H., LEE, X., SCOTT, M. L., SHULAG-MORSKAYA, S., SHAO, Z., CHANG, J., THILL, G., LEVESQUE, M., ZHANG, M., HESSION, C., SAH, D., TRAPP, B., HE, Z., JUNG, V., MCCOY, J. M. & PEPINSKY, R. B. 2005. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci*, 8, 745-51.
- MI, S., MILLER, R. H., TANG, W., LEE, X., HU, B., WU, W., ZHANG, Y., SHIELDS, C. B., ZHANG, Y., MIKLASZ, S., SHEA, D., MASON, J., FRANKLIN, R. J., JI, B., SHAO, Z., CHÉDOTAL, A., BERNARD, F., ROULOIS, A., XU, J., JUNG, V. & PEPINSKY, R. B. 2009. Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Ann Neurol*, 65, 304-15.

- MI, S., PEPINSKY, B., SHAO, Z., GARBER STARK, E. A., MIKLASZ, S. & GRAFF, C. 2019. *Sp35 antibodies and uses thereof*.
- MI, S., SANDROCK, A. & MILLER, R. H. 2008. LINGO-1 and its role in CNS repair. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1971-8.
- MIX, E., MEYER-RIENECKER, H., HARTUNG, H. P. & ZETTL, U. K. 2010. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol*, 92, 386-404.
- MOSYAK, L., WOOD, A., DWYER, B., BUDDHA, M., JOHNSON, M., AULABAUGH, A., ZHONG, X., PRESMAN, E., BENARD, S., KELLEHER, K., WILHELM, J., STAHL, M. L., KRIZ, R., GAO, Y., CAO, Z., LING, H. P., PANGALOS, M. N., WALSH, F. S. & SOMERS, W. S. 2006. The structure of the Lingo-1 ectodomain, a module implicated in central nervous system repair inhibition. *J Biol Chem*, 281, 36378-90.
- MSIF 2020. Atlas of MS – 3rd Edition.
- MÜLLER, T. 2016. Remyelinisierung — nur geringer Erfolg mit Anti-LINGO-Antikörper. *InFo Neurologie & Psychiatrie*, 18, 65-65.
- PAINTLIA, A. S., PAINTLIA, M. K., KHAN, M., VOLLMER, T., SINGH, A. K. & SINGH, I. 2005. HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis. *Faseb j*, 19, 1407-21.
- PAINTLIA, A. S., PAINTLIA, M. K., SINGH, A. K. & SINGH, I. 2008. Inhibition of rho family functions by lovastatin promotes myelin repair in ameliorating experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Pharmacol*, 73, 1381-93.
- PARK, S. K., MILLER, R., KRANE, I. & VARTANIAN, T. 2001. The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J Cell Biol*, 154, 1245-58.
- PASCHKE, R. & VOIGT, K. 2010. *Physiologie*, Thieme Verlag.
- PATERSON, P. Y. 1960. TRANSFER OF ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS IN RATS BY MEANS OF LYMPH NODE CELLS. *Journal of Experimental Medicine*, 111, 119-136.
- PEDRAZA, C. E., TAYLOR, C., PEREIRA, A., SENG, M., THAM, C. S., IZRAEL, M. & WEBB, M. 2014. Induction of oligodendrocyte differentiation and in vitro myelination by inhibition of rho-associated kinase. *ASN Neuro*, 6.
- PEPINSKY, R. B., ARNDT, J. W., QUAN, C., GAO, Y., QUINTERO-MONZON, O., LEE, X. & MI, S. 2014. Structure of the LINGO-1-anti-LINGO-1 Li81 antibody complex provides insights into the biology of LINGO-1 and the mechanism of action of the antibody therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 350, 110-23.
- PRIVAT, A., JACQUE, C., BOURRE, J. M., DUPOUEY, P. & BAUMANN, N. 1979. Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse "shiverer". *Neurosci Lett*, 12, 107-12.
- QUARLES, P. M. A. R. H. 1999. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Lippincott-Raven.
- RODRIGUEZ-TÉBAR, A. & BARDE, Y. A. 1988. Binding characteristics of brain-derived neurotrophic factor to its receptors on neurons from the chick embryo. *J Neurosci*, 8, 3337-42.
- RODRIGUEZ-TÉBAR, A., DECHANT, G. & BARDE, Y. A. 1990. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron*, 4, 487-92.
- RUDICK, R. A., LEE, J. C., NAKAMURA, K. & FISHER, E. 2009. Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS. *J Neurol Sci*, 282, 106-11.
- RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L. 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia*, 1, 500-500.
- SCALTRITI, M. & BASELGA, J. 2006. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*, 12, 5268-72.
- SCHWAB, N., SCHNEIDER-HOHENDORF, T., HOYT, T., GROSS, C. C., MEUTH, S. G., KLOTZ, L., FOLEY, J. F. & WIENDL, H. 2018. Anti-JCV serology during natalizumab treatment: Review and meta-analysis of 17 independent patient cohorts analyzing anti-John Cunningham polyoma virus sero-conversion rates under natalizumab treatment and differences between technical and biological sero-converters. *Mult Scler*, 24, 563-573.

- SCOLDING, N., FRANKLIN, R., STEVENS, S., HELDIN, C. H., COMPSTON, A. & NEWCOMBE, J. 1998. Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain*, 121 ( Pt 12), 2221-8.
- SIMONS, M. & NAVE, K. A. 2015. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, a020479.
- SRIRAM, S. & STEINER, I. 2005. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 58, 939-45.
- STROMNES, I. M. & GOVERMAN, J. M. 2006a. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 1, 1810-9.
- STROMNES, I. M. & GOVERMAN, J. M. 2006b. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1, 1952-1960.
- THOMSON, C. E., MCCULLOCH, M., SORENSON, A., BARNETT, S. C., SEED, B. V., GRIFFITHS, I. R. & MCLAUGHLIN, M. 2008. Myelinated, synapsing cultures of murine spinal cord--validation as an in vitro model of the central nervous system. *Eur J Neurosci*, 28, 1518-35.
- VARTANIAN, T., GOODEARL, A., VIEHÖVER, A. & FISCHBACH, G. 1997. Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of HER4 and Schwann cells through HER2 and HER3. *J Cell Biol*, 137, 211-20.
- WANG, K. C., KIM, J. A., SIVASANKARAN, R., SEGAL, R. & HE, Z. 2002a. p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 420, 74-8.
- WANG, K. C., KOPRIVICA, V., KIM, J. A., SIVASANKARAN, R., GUO, Y., NEVE, R. L. & HE, Z. 2002b. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 417, 941-4.
- WINTER, M., BAKSMEIER, C., STECKEL, J., BARMAN, S., MALVIYA, M., HARRER-KUSTER, M., HARTUNG, H. P. & GOEBELS, N. 2016. Dose-dependent inhibition of demyelination and microglia activation by IVIG. *Ann Clin Transl Neurol*, 3, 828-843.
- YAMASHITA, T. & TOHYAMA, M. 2003. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci*, 6, 461-7.
- YAN, H. & CHAO, M. V. 1991. Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 12099-12104.
- YARDEN, Y. & SLIWKOWSKI, M. X. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 127-37.

## 6 Anhang

## 6.1 Auswertung Vorversuche (Mann-Whitney-U-Test)

**Auswertung: Länge der myelinisierten Axone**

Gruppenvergleich	Mittlerer Rang	U-Wert	Z-Wert	Signifikanz (p)
<i>solvent control</i> 10 µg/ml	10,40	49.000	-0,076	0,940
<i>solvent control</i> 30 µg/ml	10,60			
<b>IgG-Kontrolle</b> 10 µg/ml	11,50	40.000	-0,756	0,450
<b>IgG-Kontrolle</b> 30 µg/ml	9,5			

**Tabelle 23: Vergleich der Kontrollgruppen bezogen auf den Myelinisierungsgrad**

Darstellung der Gruppenvergleiche bezogen auf die Länge der myelinisierten Axone. Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests mit Bestimmung des mittleren Ranges, des U- sowie Z-Wertes und der statistischen Signifikanz. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind fett markiert.

IgG: Immunglobulin G, ml: Milliliter, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, µg: Mikrogramm.

**Auswertung: Gesamtlänge der Axone**

Gruppenvergleich	Mittlerer Rang	U-Wert	Z-Wert	Signifikanz (p)
<i>solvent control</i> 10 µg/ml	12,20	33.000	-1,285	0,199
<i>solvent control</i> 30 µg/ml	8,80			
<b>IgG-Kontrolle</b> 10 µg/ml	7,70	22.000	-2,117	<b>0,034</b>
<b>IgG-Kontrolle</b> 30 µg/ml	13,30			

**Tabelle 24: Vergleich der Kontrollgruppen bezogen auf die Gesamtlänge der Axone**

Darstellung der Gruppenvergleiche bezogen auf die Gesamtlänge der Axone. Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests mit Bestimmung des mittleren Ranges, des U- sowie Z-Wertes und der statistischen Signifikanz. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind fett markiert.

IgG: Immunglobulin G, ml: Milliliter, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, µg: Mikrogramm.

## 6.2 Auswertung anti-LINGO-1 Experiment (Mann-Whitney-U-Test)

**Auswertung: Axonaler Myelinisierungsgrad**

Gruppenvergleich	Mittlerer Rang	U-Wert	Z-Wert	Signifikanz (p)
<i>solvent control</i>	34,47	577,00	-0,01	0,990
<b>IgG-Kontrolle</b> <b>30 µg/ml</b>	34,53			
<i>solvent control</i>	17,50	0,00	-7,09	<b>&lt; 0,001</b>
<b>T3 30 ng/ml</b>	51,50			
<i>solvent control</i>	30,71	449,00	-1,58	0,114
<b>1A7 10 µg/ml</b>	38,29			
<i>solvent control</i>	35,24	553,00	-0,31	0,759
<b>1A7 30 µg/ml</b>	33,76			
<i>solvent control</i>	29,76	417,00	-1,97	<b>0,048</b>
<b>Li03 10 µg/ml</b>	39,24			
<i>solvent control</i>	33,59	547,00	-0,38	0,704
<b>Li03 30 µg/ml</b>	35,41			
<i>solvent control</i>	27,47	339,00	-2,93	<b>0,003</b>
<b>Li81 10 µg/ml</b>	41,53			
<i>solvent control</i>	29,88	421,00	-1,93	0,054
<b>Li81 30 µg/ml</b>	39,12			
<b>1A7 10 µg/ml</b>	38,00	459,00	-1,46	0,144
<b>1A7 30 µg/ml</b>	31,00			
<b>Li03 10 µg/ml</b>	37,76	467,00	-1,36	0,173
<b>Li03 30 µg/ml</b>	31,24			
<b>Li81 10 µg/ml</b>	37,62	472,00	-1,30	0,194
<b>Li81 30 µg/ml</b>	31,38			

**Tabelle 25: Gruppenvergleich des Myelinisierungsgrades (anti-LINGO-1 Experiment)**

Darstellung der Gruppenvergleiche bezogen auf den axonalen Myelinisierungsgrad. Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests mit Bestimmung des mittleren Ranges, des U- sowie Z-Wertes und der statistischen Signifikanz. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind fett markiert.

IgG: Immunglobulin G, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

## Auswertung: Gesamtlänge der Axone

Gruppenvergleich	Mittlerer Rang	U-Wert	Z-Wert	Signifikanz (p)
<i>solvent control</i>	33,18	533,00	-0,55	0,0581
<b>IgG-Kontrolle</b> <b>30 µg/ml</b>	35,82			
<i>solvent control</i>	29,56	410,00	-2,06	<b>0,039</b>
<b>T3 30 ng/ml</b>	39,44			
<i>solvent control</i>	32,09	496,00	-1,01	0,315
<b>1A7 10 µg/ml</b>	36,91			
<i>solvent control</i>	35,65	539,00	-0,48	0,632
<b>1A7 30 µg/ml</b>	33,35			
<i>solvent control</i>	30,62	446,00	-1,62	0,105
<b>Li03 10 µg/ml</b>	38,38			
<i>solvent control</i>	34,44	576,00	-0,02	0,980
<b>Li03 30 µg/ml</b>	34,56			
<i>solvent control</i>	27,56	342,00	-2,89	<b>0,004</b>
<b>Li81 10 µg/ml</b>	41,44			
<i>solvent control</i>	30,79	452,00	-1,55	0,122
<b>Li81 30 µg/ml</b>	38,21			
<b>1A7 10 µg/ml</b>	38,21	452,00	-1,55	0,122
<b>1A7 30 µg/ml</b>	30,79			
<b>Li03 10 µg/ml</b>	38,47	443,00	-1,656	0,098
<b>Li03 30 µg/ml</b>	30,53			
<b>Li81 10 µg/ml</b>	38,00	459,00	-1,460	0,144
<b>Li81 30 µg/ml</b>	31,00			

**Tabelle 26: Gruppenvergleich der Gesamtlänge der Axone (anti-LINGO-1 Experiment)**

Darstellung der Gruppenvergleiche bezogen auf die Gesamtlänge der Axone. Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests mit Bestimmung des mittleren Ranges, des U- sowie Z-Wertes und der statistischen Signifikanz. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind fett markiert.

IgG: Immunglobulin G, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

## Auswertung: Gesamtzellzahl

Gruppenvergleich	Mittlerer Rang	U-Wert	Z-Wert	Signifikanz (p)
<i>solvent control</i>	34,88	565,00	-0,16	0,873
<b>IgG-Kontrolle</b> <b>30 µg/ml</b>	34,12			
<i>solvent control</i>	39,65	403,00	-2,15	<b>0,032</b>
<b>T3 30 ng/ml</b>	29,35			
<i>solvent control</i>	34,71	571,00	-0,09	0,932
<b>1A7 10 µg/ml</b>	34,29			
<i>solvent control</i>	34,79	568,00	-0,12	0,902
<b>1A7 30 µg/ml</b>	34,21			
<i>solvent control</i>	34,97	562,00	-0,20	0,844
<b>Li03 10 µg/ml</b>	34,03			
<i>solvent control</i>	35,06	559,00	-0,23	0,816
<b>Li03 30 µg/ml</b>	33,94			
<i>solvent control</i>	35,56	542,00	-0,44	0,659
<b>Li81 10 µg/ml</b>	33,44			
<i>solvent control</i>	35,62	540,00	-0,47	0,641
<b>Li81 30 µg/ml</b>	33,38			
<b>1A7 10 µg/ml</b>	33,68	550,00	-0,343	0,731
<b>1A7 30 µg/ml</b>	35,32			
<b>Li03 10 µg/ml</b>	34,62	574,00	-0,049	0,961
<b>Li03 30 µg/ml</b>	34,38			
<b>Li81 10 µg/ml</b>	34,03	562,00	-0,196	0,844
<b>Li81 30 µg/ml</b>	34,97			

**Tabelle 27: Gruppenvergleich der Gesamtzellzahl (anti-LINGO-1 Experiment)**

Darstellung der Gruppenvergleiche bezogen auf die Gesamtzellzahl. Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests mit Bestimmung des mittleren Ranges, des U- sowie Z-Wertes und der statistischen Signifikanz. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind fett markiert. IgG: Immunglobulin G, Li03: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp, Li81: Opicinumab, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, *solvent control*: Lösemittelkontrolle, T3: Triiodthyronin, µg: Mikrogramm, 1A7: anti-LINGO-1 Antikörpersubtyp.

## Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Prof. Dr. Goebels dafür danken, dass er mir zum einen dieses interessante Thema bereitgestellt und zum anderen die Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Neuroscience: Neurodegeneration and Regeneration“ der Firma F. Hoffmann-La Roche ins Leben gerufen hat. In diesem Zusammenhang geht ein besonderer Dank an Herrn Eduard Urich und Herrn Per-Ola Freskgard (AG-Leiter, F. Hoffmann-La Roche), welche mir aufgrund ihrer langjährigen Erfahrungen viel beigebracht und mir einen Besuch des Labors in Basel ermöglicht haben. Zudem möchte ich mich bei Juliane Hönig (Senior Research Associate, F. Hoffmann-La Roche) bedanken, welche mir als Ansprechpartnerin stets eine große Unterstützung war.

Ein besonderer Dank geht außerdem an die gesamte AG Goebels für die tolle Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich meinen Kolleginnen Christine Baksmeier und Julia Steckel danken. Sie haben mich von Beginn an mit größter Geduld und Engagement sowie mit ihrem fundierten Fachwissen unterstützt. Außerdem möchte ich Klaudia Lepka für ihre AG-übergreifende Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots danken.

Meiner Partnerin Carina Rücken sowie meinem Vater Klaus Brauweiler gebühren ebenfalls ein ganz besonderer Dank dafür, dass sie mich bei allen Schritten begleitet und stets an mich geglaubt haben.