

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

**Analyse von residenten Zellen sowie
Immunzellen im zentralen Nervensystem:
Optimierung der Isolation und
Durchflusszytometrie bei experimenteller
autoimmuner Enzephalomyelitis**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Antonia Charlotte Henes

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Tobias Ruck

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Jörg Distler

Widmung

Auflistung eigener Publikationen

Christina B. Schroeter*, **Antonia Henes***, Anna Vogelsang, Alexander M. Herrmann, Stefanie Lichtenberg, Derya Cengiz, Vera Dobelmann, Niklas Huntemann, Chirstopher Nelke, Susann Eichler, Philipp Albrecht, Sven G. Meuth*, Tobias Ruck. **Simultaneous Isolation of Principal Central Nervous System-Resident Cell Types from Adult Autoimmune Encephalomyelitis Mice.**

J Vis Exp. 2023 Oct 6: (200).

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Henes, A., *et al.*, **Simultaneous Isolation of Principal Central Nervous System-Resident Cell Types from Adult Autoimmune Encephalomyelitis Mice.**

J Vis Exp. 2023 Oct 6: (200).

Zusammenfassung (Deutsch)

Die Multiple Sklerose (MS) stellt eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) dar, bedingt durch Demyelinisierungsprozesse, axonale Schäden, Gliose und Neurodegeneration. Die zugrundeliegende Pathophysiologie der MS ist bis heute noch nicht umfassend aufgeklärt. Gegenwärtige Therapiestrategien adressieren in erster Linie die initiale Neuroinflammation, zeigen jedoch in späteren Krankheitsstadien oft eine eingeschränkte Wirksamkeit. Daher herrscht weiterhin ein dringender Bedarf an der Identifikation spezifischer, therapeutisch wirksamer (molekularer) Ziele. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Optimierung und Erweiterung eines bestehenden Protokolls zur simultanen Isolation aller relevanten ZNS-residenten Zelltypen, einschließlich Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Neuronen, aus Mäusen mit Experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) sowie naiven Mäusen. Dafür wurde das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) bei C57BL/6J-Mäusen im Alter von 10-12 Wochen verwendet, welches wichtige pathophysiologische Merkmale der MS nachbildet. Die EAE-Induktion erfolgte durch die Injektion des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Peptid₃₅₋₅₅ (MOG₃₅₋₅₅), welches einen selbstlimitierenden, monophasischen Krankheitsverlauf reproduziert. Die Isolation der ZNS-residenten Zelltypen erfolgte durch sequentielle, magnetische Zellseparation. Nachfolgende Durchflusszytometrie-Analysen bestätigten die Generierung reiner und viabler Einzelzellsuspensionen mit einer durchschnittlichen Reinheit und Viabilität von etwa 85%. Darüber hinaus ermöglichte die Etablierung eines neuen durchflusszytometrischen Panels die gleichzeitige Analyse sowohl peripherer als auch zentraler Immunzelltypen aus demselben ZNS-Replikat. Dieses optimierte Zellisolutionsprotokoll stellt somit einen signifikanten Fortschritt in der Analyse der Rolle der ZNS-residenten Zellen in der MS-Pathogenese dar. Zudem erlaubt es eine detailliertere Untersuchung der Interaktionen zwischen ZNS-residenten Zellen und infiltrierenden Immunzellen sowie deren zeitlicher und funktioneller Dynamik. Diese Forschungsarbeit leistet somit einen relevanten Beitrag zur Identifizierung pathophysiologisch und therapeutisch relevanter Zielstrukturen und kann so die Weiterentwicklung präklinischer und klinischer MS-Forschung unterstützen.

Zusammenfassung (Englisch)

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system (CNS) caused by demyelination, axonal damage, gliosis and neurodegeneration. The underlying pathophysiology of MS is still not fully understood. Current therapeutic strategies primarily address the initial neuroinflammation, but often show limited efficacy in later stages of the disease. Therefore, there is still an urgent need to identify specific therapeutically effective (molecular) targets. This dissertation deals with the optimization and expansion of an existing protocol for the simultaneous isolation of all relevant CNS-resident cell types, including oligodendrocytes, microglia, astrocytes and neurons, from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and naïve mice. The animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6J mice aged 10-12 weeks was used for this purpose, which simulates essential pathophysiological features of MS. EAE was induced by injection of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide₃₅₋₅₅ (MOG₃₅₋₅₅), which triggers a self-limiting, monophasic disease course. CNS-resident cell types were isolated by sequential magnetic cell separation. Subsequent flow cytometry analyses confirmed the isolation of highly pure and viable single-cell suspensions with an average purity and viability of about 85%. In addition, the development of a new flow cytometric panel allowed the simultaneous analysis of both peripheral and central immune cell types from the same CNS replicate. This optimized cell isolation protocol thus represents a significant advance in the analysis of the role of CNS-resident cells in MS pathogenesis. It additionally allows a more detailed investigation of the interactions between CNS-resident cells and infiltrating immune cells, as well as their temporal and functional dynamics. This research is a significant contribution to the identification of pathophysiological and therapeutically relevant target structures and thus may support the further development of preclinical and clinical MS research.

Abkürzungsverzeichnis

- ABDK** engl. Adult Brain Dissociation Kit
- ACSA-2** Astrozyten-Oberflächenantigen-2
- APC** Allophycocyanin
- APZ** Antigen-präsentierende Zelle
- ATP1B2** ATPase-Untereinheit beta-2
- BHS** Blut-Hirn-Schranke
- BLS** Blut-Liquor-Schranke
- BoCs** engl. Brain-on-a-Chip-systems
- BSA** Rinderalbuminserum, engl. bovine serum albumin
- BTK** Bruton-Tyrosin-Kinase
- BV** engl. brilliant violet
- CD** Unterscheidungsmerkmal, engl. cluster of differentiation
- CD133** engl. promin-like protein 1
- CFA** Komplettes Freund-Adjuvans, engl. complete freund's adjuvant
- CX3CR1** CX3C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 1
- Cy** Cyanin
- DMTs** Krankheitsmodifizierende Therapien, engl. disease-modifying therapies
- DNase** Desoxyribonuklease
- DRS** engl. Debris Removal Solution
- EAE** Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
- EBV** Epstein-Barr-Virus
- EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
- eYFP** engl. enhanced yellow fluorescent protein
- FABP7** engl. fatty acid-binding protein 7
- FACS** Umgangssprachlich für Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting
- FcR** Fc-Rezeptor
- FCS** fetales Kälberserum, engl. fetal calf serum
- FELASA** Federation of European Laboratory Animal Science Association

Foxp3 engl. forkhead box P3
FSC-H engl. forwardscatter-height
FSC-W engl. forwardscatter-width
FVD engl. fixable viability dye
GalC Galactocerebrosid
GFAP saures Gliafaserprotein
GFP Grün fluoreszierendes Protein
GLAST Glutamat-Aspartat-Transporter
IFA Inkomplettes Freund-Adjuvans, engl. incomplete freund's adjuvant
IFN Interferon
IL Interleukin
LANUV Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
MACS Magnetisch-aktivierte Zellsortierung, engl. magnetic-activated cell sorting
MBP Myelinbasisprotein
MHCII engl. major histocompatibility complex class II
MS Multiple Sklerose
NG2 Nerven/Glia-Antigen-2
NK-Zellen Natürliche Killerzellen
O1 Oligodendrozytenmarker 1
O4 Oligodendrozytenmarker 4
OPCs Oligodendrozytenvorläuferzellen
P2RY12 P2Y-Purinozeptor 12
PB engl. pacific blue
PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC7 PE-Cyanin-7-Farbstoff
PE Phycoerythrin
PTx Pertussis-Toxin
RBCRS engl. Red Blood Cell Removal Solution
RNA Ribonukleinsäure
RRMS schubförmig-remittierende Multiple Sklerose

RT Raumtemperatur

SEM Standardfehler des Mittelwertes

SSC engl. sidescatter

Tmem119 Transmembranprotein 119

Tregs Regulatorische T-Lymphozyten

Vol% Volumenprozent

ZETT Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche
Tierschutzaufgaben

ZNS Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.2	Aktuelle Therapieoptionen der MS.....	3
1.3	Die Rolle der ZNS-residenten Zellen in der MS-Pathogenese	4
1.4	Methoden zur Isolation ZNS-residenter Zellen.....	8
1.5	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	10
1.6	Ziele der Forschungsarbeit.....	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien.....	14
2.1.2	Kits	14
2.1.3	Antikörper für Durchflusszytometrie-Analysen	15
2.1.4	Puffer	15
2.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.6	Geräte und Instrumente.....	17
2.1.7	Software	17
2.1.8	Versuchstiere und Tierversuchsgenehmigung	18
2.2	Methoden	20
2.2.1	EAE-Induktion	20
2.2.2	ZNS-Präparation	23
2.2.3	ZNS-Dissoziation.....	24
2.2.4	Entfernung von Debris und Zelltrümmern	25
2.2.5	Depletion von Erythrozyten	26
2.2.6	Magnetische Zellseparation von Oligodendrozyten und Mikroglia aus EAE- und naiven Mäusen.....	27
2.2.7	Sorting-Strategie für Mikroglia aus EAE-Mäusen.....	30
2.2.8	Magnetische Zellseparation von Neuronen und Astrozyten aus EAE- und naiven Mäusen.....	32

2.2.9	Durchflusszytometrie ZNS-residenter Zellen	35
2.2.9.1	Reinheitspanel (extrazelluläres Färbeprotokoll)	35
2.2.9.2	Reinheitspanel (intrazelluläres Färbeprotokoll mit NeuN).....	36
2.2.10	Immunzellpanel (extrazelluläres Färbeprotokoll).....	38
2.2.11	Geräte- und Softwarekonfiguration	39
2.2.12	Statistische Analysen	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Etablierung des EAE-Modells.....	40
3.2	Etablierung der simultanen Isolation von ZNS-residenten Zellen aus EAE und naïven Mäusen.....	44
3.2.1	Optimierte Zellisolation durch ein verbessertes Fehlermanagement und alternative Ansätze	49
3.2.2	Erfolgreiche Implementierung optimierter Methoden: Ergebnisse der Zellisolation nach <i>Troubleshooting</i>	53
3.3	Etablierung durchflusszytometrischer Analysen der periphereren Immunzellen.....	61
4	Diskussion	68
4.1	EAE als Forschungsmodell für die Multiple Sklerose: Relevanz und Limitationen.....	68
4.2	Methodische Vorgehensweise.....	71
4.2.1	Optimierung der Zellisolation durch Pooling von ZNS-Gewebe	71
4.2.2	Methodenvergleich zur Isolation von Primärzellen aus dem murinen ZNS.	72
4.2.3	Strategien zur zelltypspezifischen Isolation im ZNS: Markerprofile im Vergleich	75
4.2.3.1	Isolation von Oligodendrozyten via O4.....	75
4.2.3.2	Isolation von Mikroglia via CD11b und CD45	76
4.2.3.3	Isolation von Astrozyten via ACSA-2.....	78
4.2.3.4	Isolation von Neuronen via Negativselektion.....	79
4.3	Charakterisierung der Immunzellverteilung im ZNS: Relevanz und Implikationen des Immunzellpanels	81

4.4	Potenzielle Erweiterungen und Limitationen des Immunzellpanels: Chancen und methodische Herausforderungen.....	83
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	85
6	Literatur – und Quellenverzeichnis	87
7	Danksagung.....	102

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Dynamische Funktionen von Mikroglia und Astrozyten im ZNS: Physiologie versus Neuroinflammation.	6
Abb. 2 Workflow für die simultane Isolation von Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Neuronen aus EAE- und naiven Mäusen mittels MACS und FACS.	28
Abb. 3 Inzidenzen und EAE-Verläufe der ersten drei Immunisierungen während der Etablierungsphase.	41
Abb. 4 Ptx-Titrationsversuch zur Verifizierung der optimalen Ptx-Dosis und des EAE-Verlaufs.	43
Abb. 5 <i>Gating</i> -Strategie zur Selektion von Mikroglia aus isolierten CD11b ⁺ -Zellpopulationen aus EAE- und naiven Mäusen.	46
Abb. 6 Repräsentative Reinheitsanalysen isolierter ZNS-residenter Zellentypen aus adulten Mäusen.	48
Abb. 7 Erfolgreiche Ansätze und typische Fehlerquellen bei der Gradienten-Bildung.	52
Abb. 8 Durchflusszytometrische Analysen von Oligodendrozyten, die aus adulten Mäusen isoliert wurden.	54
Abb. 9 Durchflusszytometrische Analysen von Astrozyten, die aus adulten Mäusen isoliert wurden.	55
Abb. 10 Durchflusszytometrische Analysen von Neuronen, die aus adulten Mäusen isoliert wurden.	56
Abb. 11 Durchflusszytometrie-Analyse von aus adulten Mäusen gewonnenen Neuronen nach NeuN-Markierung.	57
Abb. 12 Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen der Einzelzellsuspensionen vor und nach Optimierung des Zellisolationsprotokolls.	58
Abb. 13 Immunzellpanel zur durchflusszytometrische Analyse peripherer Immunzellen aus einer ZNS-Zellsuspension von naiven Mäusen.	63
Abb. 14 Immunzellpanel zur durchflusszytometrische Analyse peripherer Immunzellen aus einer ZNS-Zellsuspension von EAE-Mäusen.	64

Abb. 15 Verteilung der peripheren Immunzell-Populationen in Bezug auf die
Gesamtheit der CD45⁺-Zellen im ZNS während des EAE-Verlaufs sowie
bei naïven Mäusen.....66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Reagenzien und Chemikalien	14
Tabelle 2. Kits	14
Tabelle 3. Antikörper für Durchflusszytometrie-Analysen	15
Tabelle 4. Puffer.....	16
Tabelle 5. Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 6. Geräte und Instrumente	17
Tabelle 7. Software	18
Tabelle 8. Klinischer EAE-Score zur täglichen Evaluation der Versuchstiere.....	23
Tabelle 9. Simultane Isolation von Oligodendrozyten und Mikroglia aus EAE- und naïven Mäusen via MACS.....	30
Tabelle 10. Simultane Isolation von Astrozyten und Neuronen aus EAE- und naïven Mäusen via MACS.....	34
Tabelle 11. Durchflusszytometrisches Immunzellpanel (extrazelluläres Färbeprotokoll).....	61

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Ätiologie, trotz zahlreicher Forschungsprojekte und stetig wachsendem Erkenntnisgewinn auf diesem Gebiet bis heute nicht vollständig geklärt ist ¹⁻⁴. Charakteristika des Krankheitsverlaufs sind Demyelinisierung, axonale Schädigung, Gliose und Neurodegeneration ⁵.

Das klinische Bild multifokaler ZNS-Läsionen kann erheblich variieren und verschiedene neurologische Funktionsbereiche wie das sensorische, motorische, visuelle und autonome Nervensystem betreffen. Zu den initialen Symptomen zählen Parästhesien, kognitive Störungen, Schmerzen, Lähmungen, sowie Blasen- und Mastdarmstörungen ^{5,6}.

Darüber hinaus ist die Erkrankung durch verschiedene Verlaufsformen gekennzeichnet, darunter die schubförmig-remittierende MS (RRMS) sowie die primär bzw. sekundär-progrediente disseminierte Enzephalomyelitis ^{5,7,8}.

Die MS stellt in Deutschland die häufigste Ursache chronischer Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar ^{9,10}. Weltweit sind etwa 2,8 Millionen Menschen von MS betroffen ¹¹. In der Mehrzahl der Fälle wird die Diagnose zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr gestellt, wobei Frauen deutlich häufiger betroffen sind als Männer ⁵. Daraus resultieren gravierende Beeinträchtigungen für die individuelle Lebensgestaltung der Betroffenen sowie sozioökonomische Konsequenzen, die der weiteren Grundlagenforschung auf diesem Gebiet höchste Relevanz beimessen.

Nach aktuellem Wissensstand wird ein initialer Zusammenbruch der Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen des ZNS in peripheren Immunorganen (z.B. Thymus, Lymphknoten, Darm und Lunge) angenommen ⁹. Bislang besteht jedoch kein Konsens über spezifische Antigene, die diese immunvermittelte

Reaktion auslösen¹². Einige Studien mit synthetischen Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-(MOG)-Peptiden konnten eine erhöhte MOG-bindende Immunglobulin-G-(IgG)-Konzentration im Serum von MS-Patient:innen nachweisen^{13,14}. Demgegenüber ergaben andere Forschungsarbeiten mit rekombinanten MOG-Domänen keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollgruppen¹⁵. Dennoch wird ein molekulares Mimikry als zugrundeliegender Mechanismus der induzierten Autoreaktivität diskutiert¹⁶.

Nach der peripheren Aktivierung der autoreaktiven T-Lymphozyten, infiltrieren diese das ZNS durch die im Frühstadium der MS geschädigte Blut-Hirn-Schranke (BHS)⁵. Im ZNS erfolgt daraufhin eine Reaktivierung der T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ). Die Zerstörung der Myelinscheiden und die Schädigung der Oligodendrozyten werden durch autoreaktive T-Zellen vermittelt, die eine TH-1- und TH-17-Antwort imitieren, begleitet von der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine¹⁷. Dabei scheinen insbesondere *Cluster of Differentiation* (CD) 4-positive und CD8⁺-T-Lymphozyten an den zellulären Demyelinisierungsprozessen beteiligt zu sein⁵. Darüber hinaus konnte eine Beteiligung weiterer Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowie residenter ZNS-Zellen, wie beispielsweise Monozyten, B-Zellen und aktivierte Mikroglia, nachgewiesen werden^{5,8}.

Im Verlauf der Entzündungsreaktion kommt es zu einer zunehmenden Schädigung der BHS und Blut-Liquor-Schranke (BLS), was eine verstärkte Infiltration von Immunzellen zur Folge hat⁵. Neben einem chronischen Entzündungszustand und der fortschreitenden Demyelinisierung führt dies zu einem zunehmenden neuro-axonalen Untergang, der mit einer daraus resultierenden Gewebe-Atrophie einhergeht^{7,18}.

Zu den relevanten epidemiologischen Faktoren, die sowohl die Krankheitsentstehung als auch den Verlauf beeinflussen, zählen genetische Prädisposition, Umweltfaktoren und eine zurückliegende Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV)^{7,19,20}. Prospektive Kohortenstudien deuten darauf hin, dass eine EBV-Infektion nahezu eine notwendige Voraussetzung für die MS-Entwicklung darstellt, auch wenn diese nicht als alleinige Ursache betrachtet

werden kann ^{21,22}. Zwillingsstudien zeigten, dass gesunde eineiige Zwillinge mit 23% ein deutlich höheres Krankheitsrisiko im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen mit 3% aufweisen, wenn einer der Zwillinge erkrankt ist ²³. Auch die ethnische Zugehörigkeit und die geografische Entfernung zum Äquator beeinflussen die Krankheitsinzidenz ^{4,24}. Zu den besonders relevanten Umweltfaktoren zählen unter anderem das Rauchen von Tabak, ein niedriger Vitamin-D-Spiegel sowie eine unzureichende Sonnenexposition ²⁵.

1.2 Aktuelle Therapieoptionen der MS

Die Behandlung der MS hat sich in den letzten Jahren erheblich weiterentwickelt. Insbesondere die Einführung hochwirksamer krankheitsmodifizierender Therapien (DMTs), die durch Immunmodulation, Immunsuppression oder auch Sequestrierung von Immunzellen wirken, hat zu signifikanten Fortschritten geführt ²⁶.

Zu dieser neuen und zunehmend eingesetzten Medikamentengruppe zählen orale Substanzen wie Teriflunomid, Dimethylfumarat, Fingolimod oder Cladribin sowie intravenös verabreichte Substanzen wie Natalizumab, Alemtuzumab und Ocrelizumab ²⁷. Während der Einsatz von Fingolimod und Natalizumab einen Eingriff in spezifische Immunzellensignalwege ermöglicht ^{7,26}, wirken Alemtuzumab, Ofatumumab und Ocrelizumab über eine gezielte Depletion pathogener Immunzellsubtypen ²⁸.

Trotz der erzielten höheren Wirksamkeit sind mit dem Einsatz dieser DMTs auch erhöhte Risiken für Nebenwirkungen gegeben. Beispielsweise besteht bei Natalizumab das Risiko einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie ²⁷. Bereits länger eingesetzte Therapeutika wie Glatirameracetat oder Interferone (IFN) zeigen pleiotrope, modulierende Effekte auf das Immunsystem ^{7,29}. Diese Substanzgruppen zielen überwiegend auf die initiale Entzündungsphase ab, zeigen sich aber häufig langfristig als unzureichend wirksam ⁵. Die langfristige Behinderung der Patient:innen wird in erster Linie durch die chronische

neurodegenerative Komponente der Erkrankung bedingt ³⁰, weshalb die Entwicklung neuroprotektiver und -regenerativer Substanzen von besonderer Bedeutung ist. Es besteht nach wie vor ein Mangel an therapeutisch wirksamen Substanzen, die sowohl die Remyelinisierung als auch den axonalen Schaden adäquat adressieren und somit potenziell einen kurativen Therapieansatz darstellen können ⁵.

Autologe Stammzelltherapien zeigen derzeit insbesondere bei therapieresistenter RRMS und stark entzündlichen Verlaufsformen vielversprechende Ergebnisse ^{21,31,32}. Für späte, überwiegend progressive Krankheitsverläufe der MS werden diese nicht empfohlen ²¹. Darüber hinaus deuten aktuelle Studienergebnisse darauf hin, dass Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitoren (BTK-Inhibitoren), insbesondere Tolebrutinib, bei Patient:innen mit nicht-rezidivierender sekundär progredienter MS eine Reduktion der Behinderungsprogression bewirken könnten ^{21,33}. Demgegenüber verfehlten andere BTK-Inhibitoren in Phase-III-Studien bei RRMS den primären Endpunkt der Schubreduktion ³³. Dies deutet auf eine erhöhte Wirksamkeit dieser neuen Substanzklasse bei chronisch-aktiven Krankheitsprozessen hin ^{21,34}. Der Wirkmechanismus der BTK-Inhibitoren beruht auf der Modulation der Reifung und Aktivität von B-Zellen, Makrophagen und Mikroglia, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese der progredienten Verlaufsform der MS spielen ³⁵.

Weiterhin sind die Wirkmechanismen der verschiedenen Therapiestrategien nur unvollständig verstanden. Deren besseres Verständnis könnte zur Optimierung der Patientenauswahl, der Therapiesteuerung sowie zur Vermeidung von Nebenwirkungen beitragen.

1.3 Die Rolle der ZNS-residenten Zellen in der MS-Pathogenese

Die Untersuchung der spezifischen Funktionen der im ZNS ansässigen Zelltypen im Kontext der MS-Pathogenese ist von zentraler Bedeutung, um die zugrundeliegenden Krankheitsmechanismen dieser Erkrankung umfassend zu verstehen. Während Immunzellen aus dem peripheren Blutkreislauf eine Schlüsselrolle bei der Initiation und Verstärkung der Entzündungsreaktion

spielen, wächst das Verständnis für die Bedeutung der ZNS-residenten glialen Zellen – insbesondere Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten – in der Pathogenese der MS. Diese Zellen fungieren nicht nur als strukturelle und funktionelle Komponenten des ZNS, sondern können auch aktiv an der Immunmodulation und den Reparaturprozessen beteiligt sein ^{36–38}.

Mikroglia sind spezialisierte Immunzellen im ZNS und spielen eine entscheidende Rolle in der Immunüberwachung sowie in der Kontrolle von zentralen Entzündungsreaktionen. Aufgrund ihres stark variierenden und dynamischen Phänotyps, welcher sich in Reaktion auf ihre Mikroumgebung und pathologischen Stimuli ändern kann, sind sie an vielfältigen zellulären Prozessen beteiligt ³³. Neben einer potenziellen Verstärkung neuroinflammatorischer Prozesse weist dieser Zelltyp auch neuroprotektive Eigenschaften auf ^{36,39,40}. Ihre Rolle in der MS-Pathologie kann daher in den verschiedenen Krankheitsstadien erheblich variieren.

Im aktivierten Zustand können sie durch ihre Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies neurotoxische Effekte hervorrufen (**Abbildung 1**) ⁴¹. Die Expression spezifischer Oberflächenmarker, wie CD11b und CD45, ist von besonderer Bedeutung für ihre Funktion und ihren Aktivierungszustand ^{42–46}.

Es konnten bereits aktivierte Mikroglia in der makroskopisch unauffälligen weißen Substanz als sogenannte Präläsionen der MS nachgewiesen werden ⁴⁷. Darüber hinaus wurde auch in fortgeschrittenen Stadien der MS eine anhaltende Aktivierung der Mikroglia festgestellt, die mit neuronaler Dysfunktion und einer Krankheitsprogression in Verbindung gebracht wird ⁴⁸.

Diese Erkenntnisse machen Mikroglia zu einem interessanten therapeutischen Ziel in der MS-Therapie.

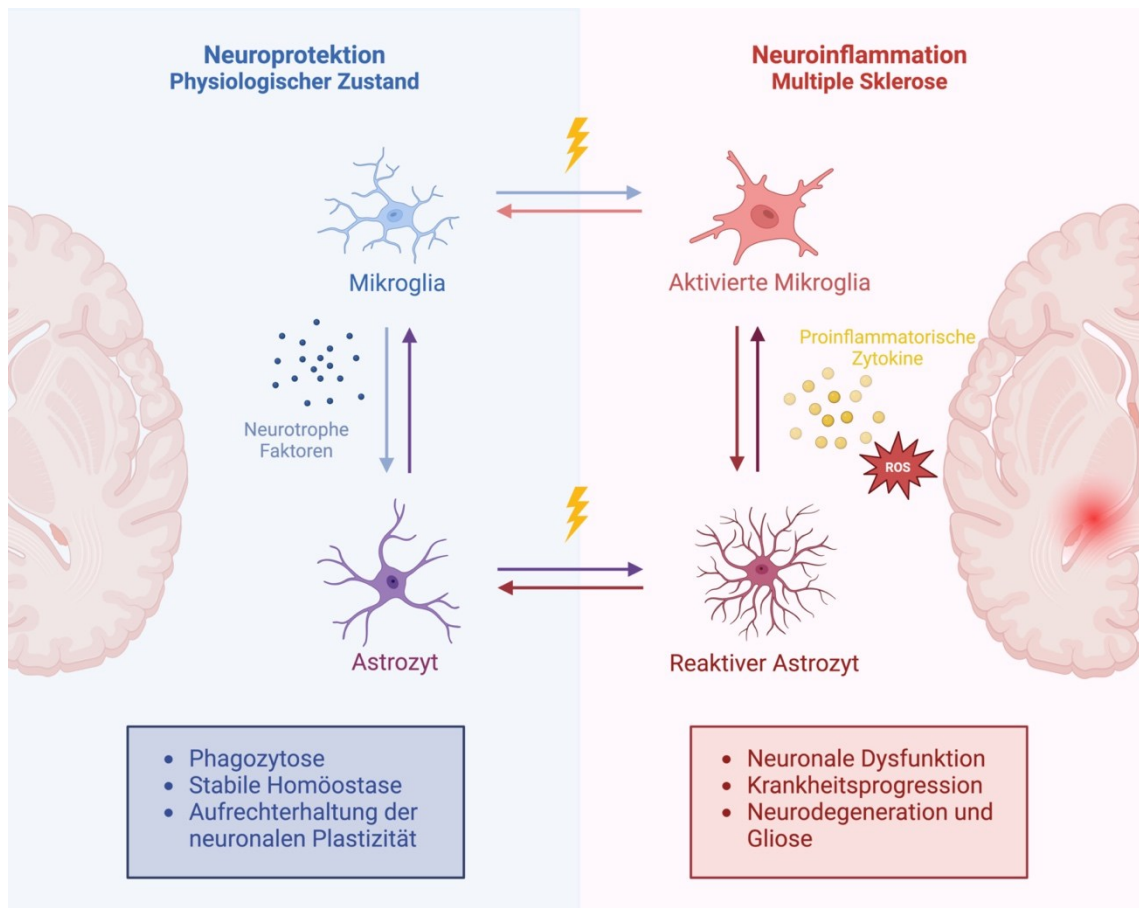


Abb. 1 Dynamische Funktionen von Mikroglia und Astrozyten im ZNS: Physiologie versus Neuroinflammation. Die Abbildung wurde mit bioRender erstellt ⁴⁹. Einzelne Elemente wurden modifiziert, um spezifische Aspekte dieser Arbeit darzustellen. Abkürzungen: MS = Multiple Sklerose; ROS = Reaktive Sauerstoffspezies; ZNS = Zentrales Nervensystem. Unter physiologischen Bedingungen unterstützen Mikroglia und Astrozyten die neuronale Plastizität, fördern die Synapsen-Stabilität und tragen zur Homöostase im ZNS bei. Bei neuroinflammatorischen Prozessen wie der MS hingegen wechseln diese Zellen in einen aktivierten Zustand. Es folgt unter anderem eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die in Kombination zu einer neuronalen Dysfunktion und Apoptose führen. Dieser „Switch“ zwischen den beiden Zuständen dieser Zelltypen ist entscheidend für das Verständnis der Neurodegeneration und Krankheitsprogression bei MS.

Bei den Astrozyten handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Gliazellen, die sich je nach ZNS-Lokus in ihrer Morphologie, Physiologie und Funktion unterscheiden ^{50,51}. Im gesunden ZNS übernehmen sie eine neuroprotektive Rolle und wirken homöostatisch stabilisierend (**Abbildung 1**) ⁵². Unter akuten oder chronisch-entzündlichen Zuständen können Astrozyten jedoch in einen reaktiven Zustand übergehen ^{38,52,53}. Neben der Bildung von glialen Narben, die das entzündete Gewebe isolieren und schützen, sind diese auch an der Produktion proinflammatorischer Enzyme beteiligt und spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung axonaler Schädigung in der MS.

Darüber hinaus fungieren Astrozyten, neben ihrer Funktion im angeborenen Immunsystem, als Produzenten zytotoxischer Faktoren und können durch die Bildung glialer Narben die Remyelinisierung und axonale Regeneration hemmen^{51,52}. Es wird angenommen, dass die chronische Entzündung in den fortgeschrittenen Stadien der MS unter anderem durch die synergistische Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten initiiert wird (**Abbildung 1**)^{53,54}.

Die neuroprotektiven und regenerativen Fähigkeiten von Mikroglia und Astrozyten im physiologischen Kontext werden durch die chronische Entzündungsreaktion im ZNS jedoch stark beeinträchtigt^{38,39}. Aufgrund dieser ambivalenten Wirkungsweise stellen Astrozyten ein komplexes therapeutisches *target* dar. Weitere Untersuchungen ihrer biochemischen und molekularen Funktion im Verlauf der MS sind daher unerlässlich.

Oligodendrozyten sind Myelin-produzierende Zellen des ZNS, die für die Isolierung von Axonen und die damit verbundene schnelle Weiterleitung von Nervenimpulsen verantwortlich sind⁵⁵⁻⁵⁷. Im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse, wie der MS, werden diese Zelltypen geschädigt, was zu einer Demyelinisierung von Nervenfasern und in der Folge zu neuronaler Dysfunktion führt^{37,58}.

Obwohl das adulte ZNS das Potenzial zur Remyelinisierung und Regeneration dieser Zellpopulation aufweist, verläuft dieser Prozess in den meisten Fällen unzureichend in Bezug auf funktionelle Defizite^{12,59}. Die Untersuchung zellulärer Vorgänge im Kontext remyelinisierender Reparaturprozesse ist daher von großem Interesse.

Zudem wurden einige Oligodendrozyten-Subtypen identifiziert, die eine erhöhte Expression von Genen zeigen, die mit der Antigenpräsentation im Rahmen der MS-Pathogenese assoziiert sind⁶⁰. Dies deutet daraufhin, dass Oligodendrozyten nicht nur als passive Zielstrukturen, sondern auch als aktive Immunmodulatoren in der MS fungieren könnten.

Weitere experimentelle Studien wiesen auf eine mögliche Aktivierung von Entzündungs- und Autoimmunprozessen durch die Apoptose von Oligodendrozyten und Neuronen im Rahmen der MS hin⁶¹. Diese Prozesse könnten zusammen mit der Immunzellinfiltration, mitochondrialer Dysfunktion

und synaptischer Toxizität seitens der Neurone eine Rolle bei der Progression der MS und der Neurodegeneration spielen ^{62,63}.

Daher können sowohl Oligodendrozyten als auch Neurone als relevante therapeutische Zielstrukturen bezeichnet werden.

1.4 Methoden zur Isolation ZNS-residenter Zellen

Um die molekularen und zellulären Zusammenhänge bei Autoimmunerkrankungen wie der MS besser zu verstehen, sind innovative und reproduzierbare Protokolle zur Zellisolation unerlässlich. Die Isolation von ZNS-residenten Zellen bildet die Grundlage für die Untersuchung der zellulären Physiologie und ermöglicht gleichzeitig wesentliche Analysen der Immunphänotypen.

Zu den gängigen Verfahren der Zellisolation zählen unter anderem die magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS), die Durchflusszytometrie (FACS), Zellkultivierung, Dichtegradienten-Zentrifugation sowie die Differentialadhäsion. Derzeit sind MACS und FACS die effizientesten und am häufigsten eingesetzten Methoden zur Isolation vitaler Einzelzellpopulationen aus dem murinen ZNS ^{64,65}. Beide Verfahren ermöglichen die Generierung reiner Zellpopulationen und gewährleisten eine intakte zelluläre Integrität ^{64,66}.

Das MACS-Verfahren basiert auf der Verwendung von magnetischen MicroBeads, die spezifisch die Oberflächenantigene der ZNS-residenten Zelltypen markieren. Die markierten Zellen werden daraufhin durch eine Säule in einem Magnetfeld geleitet; die magnetisch markierten Zellen verbleiben in der Säule, während die unmarkierten Zellen passieren. Nach der Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld können die Zielzellen eluiert und für weitere Analysen verwendet werden.

Das Astrozyten-Oberflächenantigen-2 (ACSA-2) eignet sich als Oberflächenmarker für die Isolierung von Astrozyten aus dem postnatalen sowie aus dem adulten Mausgehirn ^{67,68}. Die Isolation von Mikroglia via MACS erfolgt hauptsächlich durch die Verwendung von CD11b-MicroBeads ^{42,43,46}. Im Rahmen

der magnetischen Separation von Oligodendrozyten findet in der Regel der Oligodendrozytenmarker 4 (O4) Anwendung^{69,70}. Die O4-Expression setzt während der Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) zu reifen Oligodendrozyten ein und persistiert darüber hinaus⁷¹.

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Zelltypen erfolgt die Isolation von Neuronen mittels MACS in Form einer Negativselektion, da es keine spezifischen MicroBeads für ein Neuronen-spezifisches Oberflächenantigen gibt. Diese Negativselektion wird durch Biotinylierung und Depletion aller nicht-neuronalen Zellen erzielt^{72,73}. Die Neuronen befinden sich also im Durchfluss der Säule, während alle anderen Zelltypen magnetisch markiert und im Magnetfeld retiniert werden.

Zusätzlich zur MACS-Methode stellt die fluoreszenz-aktivierte Sortierung von Zellen ein ebenso zuverlässiges und effektives Verfahren zur Isolation von ZNS-residenten Zellen dar. Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine Zellsortierung basierend auf der Zellgröße und -granularität, intrazellulären Markern und der Bindungsaffinität spezifischer Fluoreszenzantikörper^{74 75}.

Zur genaueren Definition von Subpopulationen einzelner Zelltypen können mehrere Oberflächenmarker in der durchflusszytometrischen Analyse verwendet werden.

Die Isolation von ZNS-residenten Zellen wurde bereits in zahlreichen Forschungsprojekten unter Verwendung von MACS und FACS beschrieben und gilt als ein etabliertes Standardverfahren^{64,72}. In Bezug auf weitere *Downstream*-Analysen und biochemische Charakterisierungen der isolierten Zellen erweist sich die Präzision des MACS- und FACS-Verfahren als von hoher Relevanz⁷⁴.

Eine einfache und kostengünstige Methode zur Isolation von Mikroglia aus murinen Gehirnen ist die *Flask-Tapping*-Methode⁷⁶. Diese erfordert eine vorherige Kultivierung der ZNS-residenten Zellen in Zellkulturflaschen.

Zunächst werden die Zellsuspensionen mechanisch und enzymatisch prozessiert, bevor sie *in vitro* in einem auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmten

Medium kultiviert werden. Die Mikroglia können dann durch *Tapping* (physikalisches Schütteln) der Zellkulturflasche von anderen ZNS-residenten Zellen separiert werden, wobei die isolierten Mikroglia durch einfaches Sammeln des Mediums gewonnen werden ⁷⁶.

Zudem existieren weitere Zellisoliationsprotokolle, die die differenzielle Adhäsion in Kombination mit Zellkultivierung nutzen, um einzelne ZNS-residente Zelltypen zu isolieren; so können beispielhaft Oligodendrozyten aus gemischten Gliazellkulturen nach diesem Prinzip isoliert werden ⁷⁷.

Die Dichtegradienten-Zentrifugation wird in vielen Studien als eine weitere Methode zur Isolation von vitalen Mikroglia und Astrozyten aus dem murinen ZNS beschrieben ⁷⁸. Im Rahmen der Zentrifugation sortieren sich die Zelltypen entsprechend ihrer Zelldichte entlang eines Gradienten, wobei überschüssiges Myelin erfasst und entfernt werden kann. Mikroglia, die eine geringere Dichte aufweisen, sammeln sich dabei in einem oberen Band des Zentrifugenröhrchens. Astrozyten besitzen dagegen eine hohe Zelldichte und sind in einem unteren Band zu finden ⁷⁸.

Ein ähnliches Prinzip liegt der mikrofluidischen Zentrifugationstechnik zugrunde, bei der die Dichtegradienten-Zentrifugation mit einer immuno-magnetischen Separation kombiniert wird. Dieses Verfahren ermöglicht unter anderem die Isolation viabler Neuronen aus einer Mischkultur ZNS-residenter Zellen durch Negativselektion ⁷³.

1.5 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine induzierbare, entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des ZNS und gehört zu den am häufigsten verwendeten Tiermodellen für die MS ⁷⁹⁻⁸⁴.

Abhängig vom genetischen Hintergrund der Versuchstiere sowie dem verwendeten Antigen kann ein variabler Krankheitsverlauf induziert werden ⁸⁰. In der Regel werden Mäuse und Ratten als Versuchstiere eingesetzt. Durch die Nachahmung wichtiger Krankheitsaspekte der MS eignet sich die EAE zur

Untersuchung pathophysiologischer Merkmale wie Demyelinisierung, Inflammation und Neurodegeneration^{83,84}. Zudem ermöglicht sie die Bewertung der molekularen und klinischen Wirksamkeit von Therapiestrategien, auch wenn diese nicht uneingeschränkt übertragbar sind.

In C57Bl/6J-Mäusen kann die EAE durch die Injektion des MOG₃₅₋₅₅-Peptides ausgelöst werden⁸⁰. Der daraus resultierende, selbstlimitierende, monophasische Krankheitsverlauf dauert etwa 30 Tage. Innerhalb von 10 Tagen nach der Immunisierung entwickelt sich eine aufsteigende Lähmung, beginnend an der Schwanzspitze, wobei das Krankheitsmaximum etwa am 16. Tag erreicht wird⁹. Ab dem 20. Tag setzt die Remissionsphase ein, gefolgt von einer Regenerationsphase um den Tag 30⁹. Im Vordergrund der Entzündungsreaktion und der daraus resultierenden Schädigung des ZNS stehen proinflammatorische, autoreaktive T-Lymphozyten, die sich gegen Antigene der Myelinscheiden im ZNS richten.

Die pathophysiologische Signalkaskade beginnt mit der peripheren (extrazerebralen) Aktivierung und Proliferation autoreaktiver T-Lymphozyten, gefolgt von deren Überwindung der BHS und einer lokalen Reaktivierung sowie Rekrutierung von weiteren Entzündungszellen, wie B-Lymphozyten, Makrophagen und Mikroglia^{8,85}. Im weiteren Verlauf kommt es zur Demyelinisierung von Nervenstrukturen und neuronalen Schäden.

Aufgrund der hinreichenden Ähnlichkeit zwischen den Immun- und Nervensystemen von Maus und Mensch, eignet sich dieses Tiermodell, um von neuroimmunologischen und neuroinflammatorischen Prozessen der Maus auf mögliche Pathomechanismen im menschlichen Organismus zu schließen^{8,86}, auch wenn nicht alle Aspekte abgebildet werden können.

Viele der derzeit bei MS-Patient:innen eingesetzten therapeutischen Substanzen, wie Glatirameracetat, IFN- β oder Natalizumab, wurden auf der Grundlage von EAE-Experimenten entwickelt^{7,8}. Zudem konnten mithilfe dieses

Tiermodells in den letzten Jahren pathogenetisch veränderte Expressionsmuster von T-Zelltypen, Mikroglia und Astrozyten nachgewiesen werden ^{85,87}.

1.6 Ziele der Forschungsarbeit

Die Identifizierung molekularer, biochemischer und funktionell relevanter *targets* der MS, die potenzielle Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Therapiestrategien darstellen können, ist nach wie vor von großem wissenschaftlichem Interesse. Zudem mangelt es an Biomarkern, welche den Krankheitsverlauf prognostizieren oder überwachen können ⁸⁸. Insbesondere im Hinblick auf die im Verlauf zunehmende Neurodegeneration bei MS besteht noch ein erheblicher Forschungsbedarf.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Krankheitsmodell der EAE verwendet, welches eine Vielzahl molekularer sowie klinischer Merkmale mit der MS teilt ⁸⁵.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Etablierung und Erweiterung eines bestehenden Zellisolutionsprotokolls von Schroeter *et al.* (2021) ⁶⁶, welches eine simultane Isolation aller wichtigen ZNS-residenten Zelltypen aus einem ZNS-Replikat erlaubt. Der Schwerpunkt liegt dabei auf einer verbesserten Präzision der Zellisolationstechnik, um die Durchführung von Multi-*Omic*s-Analysen der verschiedenen ZNS-residenten Zelltypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der EAE zu ermöglichen und somit eine dynamische Untersuchung des Krankheitsverlaufes zu realisieren.

Im Fokus des ersten Forschungsschwerpunkts dieser Arbeit steht dabei die Optimierung der simultanen Isolation von Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Neuronen aus EAE- und naiven Mäusen. Die Isolation der einzelnen Zelltypen erfolgt dabei mittels MACS, wobei zusätzlich durchflusszytometrische Analysen der Einzelzellsuspensionen zur Qualitätskontrolle durchgeführt werden.

Im Rahmen des zweiten Forschungsschwerpunkts erfolgt die Beschreibung der Etablierung eines neuen FACS-Panels für die Analyse der peripheren

Immunzellen. Das Ziel besteht dabei in der Erlangung eines ganzheitlichen Überblicks über die komplexen Immunreaktionen, die im Rahmen der EAE auftreten. Die Erweiterung des Zellisoliationsprotokolls um dieses Immunzellpanel erlaubt sowohl die Analyse von Wechselwirkungen zwischen peripheren und zentralen Immunzellen als auch den Vergleich ihrer Aktivierungszustände und die Untersuchung ihrer Interaktionen mit den ZNS-residenten Zellen. Des Weiteren soll die additive durchflusszytometrische Analyse eine dynamische Untersuchung der Zellmigration sowie der zeitlichen Abstimmung der Immunregulation bei der EAE ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, die methodischen Grundlagen für die Untersuchung neuroinflammatorischer Signalwege und zellulärer Signalkaskaden im Kontext der MS bedeutend weiterzuentwickeln. Die detaillierte Betrachtung dieser Mechanismen soll dabei sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* ermöglicht werden. Durch eine optimierte Isolation muriner Primärzellen aus dem ZNS, können zelluläre Pathomechanismen und Interaktionen zwischen ZNS-residenten Zellen präzise und dynamisch erfasst werden.

Letztlich verfolgt diese Arbeit das Ziel, ein methodisches Fundament für die gezielte Identifikation therapeutisch wirksamer Angriffspunkte der MS zu schaffen. Langfristig soll somit ein entscheidender Beitrag zu der Grundlagenforschung im Bereich der MS geleistet werden, mit dem Potenzial, zukünftige präklinische und klinische Studien zu unterstützen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Anti-O4 MicroBeads, human, mouse, rat	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
CD11b MicroBeads, human, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
FcR Blocking Reagent, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
Inkomplettes Freund-Adjuvans	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	AbbVie, North Chicago, IL, USA
MOG₃₅₋₅₅-Peptid	Charité, Berlin, Deutschland
Mycobacterium tuberculosis Stamm H37 Ra	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
Pertussis Toxin in Glycerol	Hooke Laboratories Inc., Lawrence, MA, USA
Tryphanblau-Lösung, 0.4%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 1. Reagenzien und Chemikalien

2.1.2 Kits

Produkt	Hersteller
Adult Brain Dissociation Kit, mouse and rat	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
Anti-ACSA-2 MicroBead Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
Neuron Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland

Tabelle 2. Kits

2.1.3 Antikörper für Durchflusszytometrie-Analysen

Produkt	Hersteller
ACSA-2-Antikörper, anti-mouse, PE-Vio 615 (clone REA-969)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
Anti-mouse CD16/32-Antikörper	BioLegend, London, UK
Brilliant Violet 510 anti-mouse CD45 Antikörper (clone 30-F11)	BioLegend, London, UK
DNase I, rekombinant, Rnase-frei	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 506	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
eBioscience Foxp3/Transcription factor staining buffer set	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Falcon Rundboden-Polystyrol-Teströhrchen mit Zellsieb-Schnappdeckel (5 mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fetales Kälberserum	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FITC Rat anti-CD 11b (clone M1/70)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
O4-Antikörper, anti-human/mouse/rat, APC, (clone REA-576)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
pluriStrainer Mini 100 µm	pluriSelect Life Science UG, Leipzig, Sachsen, Deutschland
Rekombinanter Alexa Fluor 647 anti-NeuN-Antikörper (clone EPR12763)	Abcam, Cambridge, UK
UltraPure 0.5 M EDTA, pH 8.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 3. Antikörper für Durchflusszytometrie-Analysen

2.1.4 Puffer

Produkt	Hersteller
AstroMACS Separation buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
D-PBS mit Calcium, Magnesium, Glucose und Pyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

D-PBS ohne Calcium und Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
UltraPure 0.5 M EDTA, pH 8.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 4. Puffer

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6 Well Zellkulturplatte, Nunclon Delta Oberfläche	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark
70 µm Zellsieb	Corning, MA, USA
96 Well Zellkulturplatte steril, U-Buttom, mit Deckel	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria
BD Plastipak™ 1 mL Spritze mit abgesetzter BD Mircrolance™ 3 Nadel	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Discofix® C Dreiwegehahn	Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon (15 mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Falcon (50 mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Feather® Einmalskalpell Safeshield™ No. 10	Feather Safety Razor Co.; LTD., Osaka, Japan
GentleMACS C Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
Injekt® 2 mL Luer-Ansatz, zentrisch	Braun, Melsungen, Deutschland
Injekt® 20 mL Luer-Ansatz, zentrisch	Braun, Melsungen, Deutschland
LS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Corning Incorporated, NY, USA

Pipettenspitzen (10 - 1000 µL)	Sarstedt AG & Co. KG Nürnberg, Deutschland
SANITEX Glas- und Metallspritze, Tuberkulin, Luer-Lock -Spitze 1.0 mL	Sanitex, Switzerland
Sterican® Injektionskanülen (20G, 23G, 26G)	Braun, Melsungen, Deutschland

Tabelle 5. Verbrauchsmaterialien

2.1.6 Geräte und Instrumente

Produkt	Hersteller
BD FACS Aria III Cell Sorter	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
BRAND Neubauer-Zählkammer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CytoFLEX-S (V4-B2-YG4-R3)	Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA
GentleMACS Octo Dissociator with Heaters	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland
Stainless Steel Brain Matrix, 1mm	Ted Pella, Redding, CA, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Sigma 4-16KS	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Harz, Deutschland

Tabelle 6. Geräte und Instrumente

2.1.7 Software

Produkt	Hersteller
Adobe Illustrator 2025	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
BioRender 2024	BioRender, Toronto, ON, Kanada
FACS DIVA v8.0.2	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA

GraphPad Prism 10.3.0	GraphPad Software, Boston, MA, USA
Kaluza Analysis Software V2.1.2	Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA

Tabelle 7. Software

2.1.8 Versuchstiere und Tierversuchsgenehmigung

Alle EAE-Experimente wurden mit weiblichen C5BL/6J- Mäusen im Alter von 10-12 Wochen durchgeführt. Die Tiere wurden von *Janvier Labs (CS 4105 Le Genest, Saint Berthevin, Cedex 53941, Frankreich)* bezogen und in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) Gebäude 22.22, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf).

Bei dem C5BL/6J- Mausstamm handelt es sich um einen Wildtyp ohne belasteten Phänotyp. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, da diese, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen wie der EAE, eine höhere Krankheitsinzidenz im Vergleich zu männlichen Tieren zeigen⁸⁰. Zudem wurde die Variabilität innerhalb der Versuchsdurchgänge dadurch möglichst geringgehalten.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden im Vorfeld von Seiten des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt (Aktenzeichen des Tierversuchsantrags: 81-02.04.2022.A291). Die Teilnahme am Versuchstierkudkurs der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)* wurde erfolgreich absolviert, einschließlich des Erhalts des FELASA-Zertifikats A+D (Heinrich-Heine-Universität, 24.06.2022). Die Einhaltung des Deutschen und des EU-Tierschutzgesetzes wurde darüber hinaus zu jedem Zeitpunkt der Versuche sichergestellt.

Die Versuchstiergruppe für die EAE-Induktion umfasste 35 C5BL/6J-Mäuse, welche mit einer naïven Kontrollgruppe von 30 C5BL/6J-Mäusen verglichen wurden. Die Abweichung der Gruppengröße ergab sich durch die 80-90%-ige Erkrankungsrate nach der Immunisierung. Die Zuteilung der Mäuse in die

Versuchsgruppen erfolgte randomisiert. Hinsichtlich Alter und Gewicht waren beide Versuchsgruppen ausgeglichen. Alle Mäuse wurden in einzeln belüfteten Käfigen untergebracht. Die Temperatur im Haltungsraum betrug $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit $50\% \pm 5\%$ und der Tag-Nacht-Rhythmus 12h/12h. Das Hygienemonitoring richtete sich dabei nach den etablierten Standards der ZETT der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde darüber hinaus stets auf die Einhaltung der 3 R's: *Replacement*, *Reduction* und *Refinement* geachtet: Während der Erkrankungsphase wurden Futter und Wasser durch Diät-*Gelpacks* auf dem Käfigboden supplementiert, um zu jeder Zeit eine optimale Versorgung der Versuchstiere zu gewährleisten. Die *Gelpacks* kombinierten eine Flüssigkeitszufuhr mit einer ausgewogenen Futterform und erleichterten durch ihre weiche Konsistenz die Nahrungsaufnahme bei erkrankten Tieren. Außerdem waren die *Gelpacks* durch ihre Lokalisation am Käfigboden für die erkrankten Mäuse deutlich leichter erreichbar. Sofern erforderlich, bestand die Möglichkeit der Ergänzung von Hydrogelen, um eine ausreichende Hydratation der Tiere sicher zu stellen. Weitere *Refinement*-Maßnahmen wurden in Abhängigkeit der individuell erhobenen Belastung der Versuchstiere getroffen.

Die Anzahl der Versuchstiere wurde so gering wie möglich gehalten, jedoch so gewählt, dass biologisch-relevante Effekte zuverlässig erfasst werden konnten. Gleichzeitig war es essenziell, ausreichend hohe Zellzahlen aller parallel isolierten Zelltypen zu gewährleisten, um nachfolgende Analysen und Aufarbeitungsmethoden erfolgreich durchführen zu können.

2.2 Methoden

Im folgenden Methodenteil wird das finale Protokoll beschrieben, welches im Zuge der Etablierungsschritte angepasst und weiterentwickelt wurde. Wichtige Schritte und Anpassungen, die zu dieser finalen Version führten, werden im Ergebnisteil detaillierter erläutert.

2.2.1 EAE-Induktion

Die EAE-Induktion der Versuchstiere erfolgte in einer Induktionskammer unter tiefer Isofluran-Narkose. Dazu wurde den Tieren ein Sauerstoff-Isoflurangemisch mit einer Konzentration von 3-4 Volumenprozent (Vol%) und einer Flussrate von 0,6-1 L/Minute zugeführt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde Isofluran in einer Konzentration von 1,5-2 Vol% bei einem Sauerstofffluss von 1 L/Minute verabreicht. Um eine Austrocknung der Augen während der Narkose zu vermeiden, wurde eine Augensalbe appliziert.

Die Immunisierung der Versuchstiere erfolgte durch eine subkutane Injektion eines Gemischs aus dem MOG₃₅₋₅₅ Peptid (200 µg; Charité Berlin) und komplettem Freund-Adjuvans (CFA), wobei jeweils 100 µL der Emulsion in beide Flanken injiziert wurden. Die Injektion des MOG₃₅₋₅₅ Peptids löst eine von T-Zellen dominierte Autoimmunreaktion gegenüber dem auf Oligodendrozyten exprimierten MOG-Antigen aus^{87,89}. Da das MOG₃₅₋₅₅ Peptid allein nicht ausreichend immunogen ist, um eine Erkrankung zu induzieren, ist der Einsatz eines Adjuvans wie CFA notwendig⁸⁰. Durch die Verwendung von CFA kann eine gesteigerte Aktivierung mononukleärer Phagozyten sowie eine erhöhte Sekretion induzierter Zytokine beobachtet werden⁸⁰. Dies begünstigt eine verlängerte Persistenz der Antigene und einen effizienteren Transport derselben zum lymphatischen System⁸⁰. Neben der Funktion einer Immunverstärkung und Erhöhung der Krankheitsinzidenz, induziert CFA im Gegensatz zu anderen Adjuvantien auch eine Dominanz der TH-1- und TH-17-Zytokinen, darunter IFN-γ und Interleukin (IL)-17⁹⁰⁻⁹². Diese Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Auslösung von reproduzierbaren Modellerkrankungen des Immunsystems, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen wie der EAE. Im

Vergleich dazu führen alternative Adjuvantien wie bspw. *TiterMax* zu einer geringeren T-Zell-Proliferation und IFN-Produktion, welche in Veränderungen der Krankheitsinzidenz und des Verlaufes resultieren können^{93,94}. Die Verwendung von CFA, das aufgrund seiner weiten Verbreitung zur Induktion von EAE etabliert ist, ermöglicht zudem einen internationalen Vergleich der in dieser Studie gewonnenen experimentellen Ergebnisse. Der CFA-Stock wurde durch die Zugabe von 100 mg *Mycobacterium tuberculosis* zu 10 mL Inkompletten Freund-Adjuvans (IFA) hergestellt.

Zwei Stunden nach der Immunisierung erfolgte eine intraperitoneale Injektion von Pertussis-Toxin (PTx; 100 ng /Versuchstier, gelöst in sterilem 1x PBS, jeweils 100 µL/Injektion; Hooke Laboratories Inc., Lawrence, MA, USA). Diese PTx-Injektion wurde am zweiten Tag nach der Immunisierung wiederholt. Die PTx-Injektion hat in erster Linie das Ziel, die Effektivität der Immunisierung zu steigern und die folgende Autoimmunreaktion kontrolliert auszulösen. Dies geschieht in erster Linie in Form einer Permeabilitätssteigerung der BHS für autoreaktive T-Lymphozyten. Die Potenz des PTx kann zwischen unterschiedlichen Lots der Firma Hooke Laboratories, Inc. stark variieren, weshalb Hooke Laboratories die Potenz jedes Lots im Vorfeld testet (auf der Herstellerseite einsehbar https://hookelabs.com/protocols/eaeAI_C57BL6.html). Somit wurde die Dosis des PTx je nach Potenz des Lots angepasst, indem das Dosisäquivalent zu 100 ng PTx des Lots 1001 bestimmt wurde⁹.

Zusätzlich wurde ein Ptx-Titrationsversuch durchgeführt. Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass bereits ein Wechsel des Tierstalls erheblichen Einfluss auf die Reaktion von Versuchstieren auf experimentelle Bedingungen haben kann, was sich direkt auf die Reproduzierbarkeit und Robustheit von Tierversuchen auswirkt^{95,96}. Da sich das EAE-Protokoll der vorliegenden Arbeit an den Experimenten von Huntemann *et al.* (2022) orientiert, welche in Münster etabliert wurden, war die Durchführung eines Titrationsversuchs erforderlich. Ziel war es, potenzielle Störfaktoren bei der EAE-Induktion sowie die optimale Ptx-Dosierung für die Bedingungen des hiesigen Tierstalls zu identifizieren. Im Experiment wurden jeweils zehn C57BL/6J-Mäuse pro Versuchsgruppe mit

murinem MOG₃₅₋₅₅ Peptid, CFA und ansteigenden Ptx-Konzentrationen (100 ng, 150 ng, 200 ng und 300 ng) immunisiert.

Jedes Versuchstier wurde nach Beginn der EAE-Induktion täglich gewogen und klinisch untersucht. Der EAE-Verlauf, das Gewicht und die daraus resultierende Belastung der Tiere wurden anhand eines etablierten Punktesystems täglich evaluiert und dokumentiert. Der Beobachtungszeitraum umfasste dabei 20-30 Tage. Die klinische Beurteilung der Versuchstiere erfolgte anhand eines EAE-Scores von 0 (keine klinischen Symptome) bis 10 (Tod), welcher die neurologischen Defizite wie eine Schwanzparese, Paraparese, Paraplegie und Tetraplegie stufenweise erfasst (**Tabelle 8**). Dieser Score diente der standardisierten Beurteilung des Krankheitsverlaufes. Ein klinischer Score >7, ein Gewichtsverlust von mehr als 20% des ursprünglichen Körpergewichtes, eine Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme oder ein stark beeinträchtigter Allgemeinzustand galten als Ausschlusskriterien für die weitere Teilnahme an den Experimenten. Zudem wurden Verhaltensauffälligkeiten oder lokale Infektionszeichen täglich evaluiert und hinsichtlich ihrer Belastung bewertet. Dabei wurde die Belastungsstärke als gering (1-9), mäßig (10-19) oder stark (ab 20) eingestuft. Bei starker Belastung wurden die betroffenen Tiere umgehend aus dem Versuch ausgeschlossen.

EAE-Score	Klinische Symptome
0	Keine klinischen Anzeichen von EAE
1	Partielle Schwanzparese
2	Vollständige Schwanzparese
3	Mäßige Schwäche der hinteren Gliedmaßen
4	Vollständige Schwäche der hinteren Gliedmaßen und ataktischer Gang
5	Leichte Paraparese
6	Paraparese
7	Paraplegie

8	Tetraparese
9	Tetraplegie
10	Tod

Tabelle 8. Klinischer EAE-Score zur täglichen Evaluation der Versuchstiere. Jeder Maus wurde im Rahmen täglicher Untersuchungen ein klinischer Score zugeteilt, um sowohl die individuelle Belastung als auch den Krankheitsverlauf beurteilen zu können. Die Tabelle zeigt die verschiedenen Schweregrade klinischer Symptome der EAE, wobei 0 keine klinischen Anzeichen und 10 den Tod des Tieres darstellt.

2.2.2 ZNS-Präparation

Alle im Folgenden beschriebenen Reagenzmengen und -volumina beziehen sich auf eine einzelne ZNS-Zellsuspension, die ein adultes Mausgehirn und Rückenmark umfasst und ein Gewicht von 20 bis 500 mg aufweisen kann. Bei der parallelen Aufarbeitung mehrerer Tiere ist demnach eine entsprechende Hochskalierung aller hier beschriebenen Volumina erforderlich.

Im Rahmen der Experimente wurde sichergestellt, dass alle Puffer stets auf Eis gelagert wurden und nur nach einer ausreichenden Vorkühlung zum Einsatz kamen.

Die Entnahme von Gehirn und Rückenmark erfolgte nach Euthanasie der Versuchstiere durch tiefe Injektionsnarkose mittels Ketamin/ Xylazin. Dabei wurde die Tötung durch eine kardiale Blutentnahme mit darauffolgender transkardialer Perfusion durchgeführt. Die Tiere wurden in Rückenlage positioniert und mittels Kanülen an den Gliedmaßen fixiert. Vor Beginn der Präparation wurde die Vorderseite der Tiere mit 75% Ethanol desinfiziert, um aseptische Bedingungen zu gewährleisten. Im Anschluss wurden Thorax und Abdomen entlang der Mittellinie mittels Längsschnitts eröffnet. Die Rippen wurden zusätzlich schräg seitlich eingeschnitten, um den Brustkorb nach oben klappen zu können und einen freien Zugang zum Herzen zu erhalten. Es erfolgte eine Fixierung des Brustkorbs mit Kanülen. Für die transkardiale Perfusion mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) wurde der rechte Vorhof inzidiert und 20 mL PBS in den linken Ventrikel appliziert. Diese Perfusion wurde insgesamt zweimal hintereinander durchgeführt, um verbliebene Erythrozyten aus dem Kapillarbett und größeren Blutgefäßen weitestgehend zu entfernen.

Im Anschluss wurde die Schädelkalotte der Tiere freigelegt, indem die Kopfhaut in Form eines Längsschnittes mit einer Schere eingeschnitten und anschließend mit einer Pinzette nach kaudal geschoben wurde. Es erfolgte ein Längsschnitt entlang der Sagittalnaht des murinen Schädels. Anschließend wurde die Schädelkalotte entlang der Inzisionslinie mit der Spitze einer Pinzette aufgebrochen. Um das Gehirn vollständig freizulegen, wurden residuelle Fragmente der Schädelkalotte mit einer Pinzette entfernt.

Das präparierte Mausgehirn wurde mit einem Löffel in eine Gehirnmatrix überführt und mithilfe einer Rasierklinge in 1 mm dicke sagittale Schnitte geteilt. Im Anschluss wurde die Wirbelsäule der Versuchstiere knapp oberhalb des Beckenkamms mit einer Schere durchtrennt. Unter Verwendung einer 20 mL-Spritze mit einer 20G-Nadel, welche in den knöchernen Wirbelkanal eingeführt wurde, konnte das Rückenmark durch eine kräftige Injektion von PBS von kaudal nach kranial herausgespült werden. Im Anschluss wurde das Rückenmark mit einem Skalpell in 0.5 cm lange Abschnitte zerteilt.

Jede ZNS-Zellsuspension, bestehend aus Gehirn und dazugehörigem Rückenmark, wurde jeweils in ein separates Well einer 6-Well-Platte überführt. Diese Wells wurden zuvor mit etwa 3 mL vorgekühltem D-PBS mit Supplementen (Calcium, Magnesium, Glucose, Pyruvat) befüllt. Während des gesamten Präparationsprozesses wurden alle 6-Well-Platten auf Eis gelagert, um die Probenintegrität zu gewährleisten.

2.2.3 ZNS-Dissoziation

Für die ZNS-Dissoziation wurde das *Adult Brain Dissociation Kit* (ABDK) von Miltenyi verwendet. Zu Beginn wurden die beiden Enzymmische für die enzymatische Prozessierung des ZNS-Gewebes vorbereitet. Enzym-Mix 1 bestand aus der Kombination von 50 µL Enzym P mit 1.900 µL Puffer Z pro ZNS-Replikat. Enzym-Mix 2 wurde aus 10 µL Enzym A und 20 µL Puffer Y pro ZNS-Replikat hergestellt. Der erste Enzym-Mix wurde in ein *C-tube* überführt und das zuvor präparierte ZNS-Gewebe hinzugegeben. Anschließend wurde auch

Enzym-Mix 2 hinzugefügt und das *C-tube* fest verschlossen. Für jedes präparierte ZNS-Gewebe wurde dabei ein separates *C-tube* verwendet.

Neben der enzymatischen Dissoziation, erfolgte eine mechanische Prozessierung des Gewebes durch das 37C_ABDK_01 Programm den *GentleMACS Octo Dissociator with Heaters*. Die daraus resultierenden ZNS-Homogenate wurde dann bei 300 x g und 4 °C für 1 Minute zentrifugiert und anschließend jeweils auf ein mit 2 mL D-PBS mit Supplementen befeuchtetes 70-µm-Sieb in ein 50 mL-Falcon gegeben. Die leeren *C-tubes* wurden mit 10 mL D-PBS mit Supplementen befüllt, um durch leichtes Schütteln verbliebende Zellreste aus dem *C-tube* zu lösen. Diese 10 mL D-PBS wurden im Anschluss ebenfalls über das zugehörige Zellsieb appliziert.

Alle Zellsuspensionen wurden daraufhin erneut bei 300 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Es folgte eine vorsichtige Aspiration des gesamten Überstands.

2.2.4 Entfernung von Debris und Zelltrümmern

Die Dissoziation des ZNS-Gewebes führt häufig zu einer Freisetzung von Myelin und Zellfragmenten, welche die nachfolgenden Untersuchungen der Zellsuspensionen und deren Reinheit beeinträchtigen können. Durch die Verwendung der *Debris-Removal-Solution* (DRS), konnte eine effiziente Entfernung dieser Bestandteile aus der ZNS-Zellsuspension gewährleistet werden.

Zu diesem Zweck wurde das aus Schritt 2.2.3. resultierende Zellpellet in 3.100 µL D-PBS mit Supplementen resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt des Protokolls wurden jeweils zwei ZNS-Zellsuspensionen, die aus einer gemeinsamen Versuchsgruppe stammten, in einem 15 mL-Falcon gepoolt. In jedes 15 mL-Falcon wurden dann 1.800 µL der DRS aus dem ABDK gegeben. Durch wiederholtes Invertieren des Falcons erfolgte eine Durchmischung der beiden Phasen. Im Anschluss wurde dieses Gemisch vorsichtig mit 4 mL D-PBS mit

Supplementen überschichtet, sodass ein deutlicher Gradient zu sehen war. Dieser wurde dann bei 3000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde die Bremsfunktion während der Zentrifugation ausgeschaltet, mit dem Ziel einer zuverlässigeren Trennung der drei resultierenden Phasen (von unten nach oben: untere Zellsuspension inklusive Zielzellen - Myelin - Überstand mit Rückständen einer geringeren Dichte) und einer exakteren Eliminierung von Myelin.

Die beiden oberen Phasen des Gradienten wurden anschließend vollständig aspiriert und verworfen, sodass lediglich die untere Schicht mit der Zellsuspension im Falcon zurückblieb. Das Falcon wurde dann mit 14 mL D-PBS mit Supplementen aufgefüllt und verschlossen. Durch kräftiges Schütteln wurde das Zellpellet vom Boden des *tubes* gelöst. Die Probe wurde daraufhin erneut bei 1000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde die Bremsfunktion wieder aktiviert. Hiernach erfolgte eine vorsichtige Aspiration des kompletten Überstandes.

Für den Fall, dass die Gradienten-Schichtung nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde ein alternatives Vorgehen entwickelt, das eine Fortsetzung der Zellisolation auch bei einem misslungenen Gradienten ermöglicht. In solchen Fällen wurden die beiden oberen Phasen nicht aspiriert; stattdessen wurde das 15 mL-Falcon mit vorgekühltem D-PBS bis zur 15 mL-Markierung aufgefüllt. Die Probe wurde kräftig invertiert und erneut bei 1000 g und 4 °C für 10 Minuten mit voller Beschleunigung und ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand aspiriert, und die Resuspension des Zellpellets in 3.100 µL D-PBS mit Supplementen konnte fortgesetzt werden. Alle darauffolgenden Schritte wurden gemäß dem Standard-Protokoll durchgeführt.

2.2.5 Depletion von Erythrozyten

Für die Depletion von roten Blutkörperchen aus der ZNS-Zellsuspension wurden 100 µL der *Red Blood Cell Removal Stock Solution 10x* (RBCRS) aus dem ABDK mittels einer 1:10 Verdünnung in 900 µL ddH₂O pro ZNS-Zellsuspension gelöst.

Jedes Zellpellet, das aus zwei zuvor gepoolten ZNS-Zellsuspensionen gewonnen wurde, wurde in 1 mL dieser verdünnten Lösung resuspendiert und bei 4 °C für 10 Minuten inkubiert.

In dieser Zeit wurde ein PB-Puffer (1:20 Verdünnung) hergestellt, bestehend aus 475 mL 1x PBS ohne Zusätze (pH 7,2) + 25 mL 0,5% Rinderserumalbumin (BSA). Nach Vollendung der 10-minütigen Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 10 mL des PB-Puffers pro Probe gestoppt und alle Proben bei 300 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vollständig aspiriert.

Alle Zellpellets wurden daraufhin in jeweils 160 µL PB-Puffer aufgenommen und die Proben derselben Versuchsgruppe wurden gepoolt.

Zur Bestimmung der Zellzahlen mittels Zählkammer wurden die Zellsuspensionen in einem Verhältnis von 1:50 mit PB-Puffer verdünnt. Darauf folgte eine weitere 1:10 Verdünnung in 0,4%-iger Tryphanblau-Lösung und die Auszählung der Zellen unter einem Lichtmikroskop.

2.2.6 Magnetische Zellseparation von Oligodendrozyten und Mikroglia aus EAE- und naiven Mäusen

Die Isolation der einzelnen Zelltypen erfolgte mittels magnetischer MicroBeads, die spezifisch an die jeweiligen Oberflächenantigene der ZNS-residenten Zelltypen binden. Die Zellsuspensionen wurden anschließend über eine in einem magnetischen Feld integrierte Säule gegeben, um die gewünschten Zellpopulationen von den unmarkierten Zellen zu trennen. Nach der Entnahme der einzelnen Säulen aus dem Magnetfeld, konnten die magnetisch markierten Zellen in Form einer Positivelektion in ein separates Falcon eluiert werden. Sowohl Oligodendrozyten als auch Mikroglia wurden mittels Positivselektion gewonnen (**Abbildung 2**).

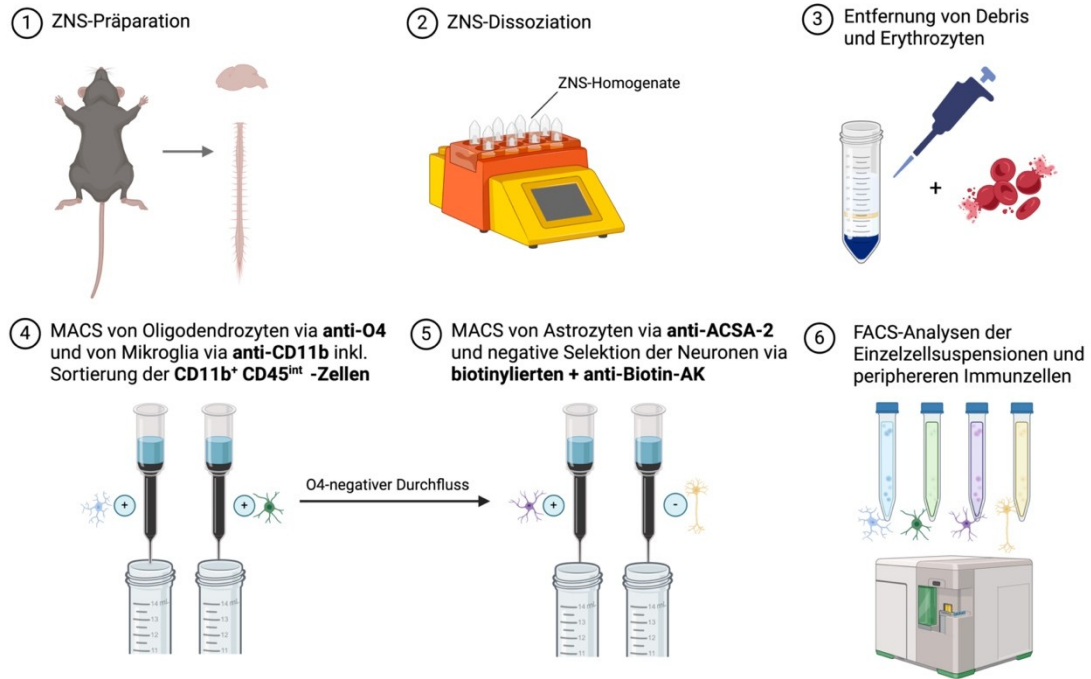


Abb. 2 Workflow für die simultane Isolation von Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Neuronen aus EAE- und naiven Mäusen mittels MACS und FACS. Die Abbildung wurde mit einer Vorlage von bioRender erstellt ⁹⁷. Abkürzungen: ACSA-2 = Astrozyten-Oberflächenantigen-2; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; EAE = Experimentelle autoimmun Enzephalomyelitis; FACS = Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting; int= intermediate; MACS= Magnetisch-aktivierte Zellsortierung; O4 = Oligodendrozytenmarker 4; ZNS = Zentrales Nervensystem. Die initialen Arbeitsschritte des Protokolls sind für EAE- und naive Mäuse identisch. Sofern ein EAE-Replikat verwendet wird, ist eine vorherige EAE-Induktion erforderlich. In Kürze umfasst das Protokoll die Präparation und Dissoziation des Gehirns und des Rückenmarks der Maus, gefolgt von der Entfernung von Zell-Debris und Erythrozyten. Im Anschluss erfolgt eine Aufteilung der resultierenden, aufgereinigten ZNS-Zellsuspension in zwei Falcons, um eine parallele Isolation von Oligodendrozyten und Mikroglia mittels MACS zu ermöglichen. Mikroglia werden dabei mithilfe von anti-CD11b-MicroBeads isoliert, während die Isolation der Oligodendrozyten unter Verwendung von anti-O4-MicroBeads erfolgt (Positivselektion). Im Anschluss an die Isolation von CD11b-positiven Zellen erfolgt bei EAE-Mäusen eine fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von CD45^{int}CD11b^{high}-Zellen, um weitere CD11b⁺-Immunzellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder Monozyten zu eliminieren, von denen bekannt ist, dass sie ebenfalls an den Neuroinflammations-Prozessen während des EAE-Verlaufes beteiligt sind. Aus dem Negativ-Durchfluss der Oligodendrozyten werden Astrozyten mittels anti-ACSA-2-MicroBeads (Positivselektion) und Neuronen via anti-Biotin-MicroBeads und Depletion aller nicht-neuronalen Zellen (Negativselektion) isoliert. Nach der Isolation der verschiedenen ZNS-residenten Zelltypen können im nächsten Schritt FACS-basierte Reinheitsanalysen und weitere funktionelle *Readouts* der Einzelzellsuspensionen durchgeführt werden. Zusätzlich wird eine durchflusszytometrische Analyse der peripheren Immunzellen aus derselben ZNS-Zellsuspension vorgenommen.

Für die Isolation von Oligodendrozyten wurden anti-O4-MicroBeads verwendet, wohingegen anti-CD11b-MicroBeads für die Isolation von Mikroglia genutzt wurden. Im Rahmen der Isolation von Oligodendrozyten wurde die Zellsuspension darüber hinaus mit einem Fc-Rezeptor (FcR)- Blockungsreagenz behandelt, um die Spezifität der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung mittels MicroBeads zu erhöhen.

Die Darstellung der Arbeitsschritte erfolgt in einer Zeile, sofern diese parallel durchgeführt wurden.

	Mikroglia	Oligodendrozyten
	Positive Selektion	Positive Selektion
	Startvolumen: 90 µL PB-Puffer pro 1×10^7 Zellen.	Startvolumen: 80 µL PB-Puffer pro 1×10^7 Zellen.
1. Blockierung	10 Minuten Inkubationszeit auf Eis.	Hinzugabe von 10 µL FcR-Blockierungsreagenz pro 1×10^7 Zellen und Inkubation für 10 Minuten bei 2–8 °C.
2. Magnetische Zellmarkierung	Hinzugabe von 10 µL anti-CD11b-MicroBeads pro 1×10^7 Zellen mit anschließender Resuspension der Zelllösung.	Hinzugabe von 10 µL anti-O4-MicroBeads pro 1×10^7 Zellen mit anschließender Resuspension der Zelllösung.
	Inkubation für 15 Minuten im Dunkeln bei 2–8 °C.	
3. Waschen und Vorbereitung der magnetischen Säulen	Hinzugabe von 2 mL PB-Puffer pro 1×10^7 Zellen. Zentrifugation bei 300 g und 4 °C für 10 Minuten.	
	Platzierung einer LS-Säule pro 4×10^7 Zellen in dem <i>QuadroMACS Separator</i> mit anschließendem Befeuchten der Säulen mit jeweils 3 mL PB-Puffer pro Säule. Verwurf des Durchflusses.	
4. Magnetische Separation – Negative Fraktion	Aspiration des Überstandes der zentrifugierten Zellsuspensionen. Resuspension des Zellpellets in 500 µL PB-Puffer pro 1×10^7 Zellen. Verteilung der Zelllösung auf die jeweiligen Säulen und Waschung jeder Säule dreimal mit 3 mL PB-Puffer. Sammlung des gesamten Durchflusses mit unmarkierten Zellen in	

	einem 15 mL Falcon pro Säule. Diese Negativfraktion enthält CD11b-negative bzw. O4-negative Zelltypen.
	Verwendung des Negativdurchflusses der Oligodendrozyten für die darauffolgende Isolation von Astrozyten und Neuronen. Verwurf des Negativdurchflusses der Mikroglia.
5. Magnetische Separation – Positive Fraktion	Entfernung aller Säulen aus dem Magnetfeld mit anschließender Platzierung auf jeweils einem 15 mL-Falcon. Spülung jeder Säule mit 5 mL PB-Puffer unter Druck und Verwendung eines Stempels, um die zuvor markierten Zellen zu eluieren. Dieser Positivdurchfluss enthält die magnetisch gelabelten Zellen: CD11b-positiv bzw. O4-positiv.
6. Zählung der Zellen	Zählung der Gesamtzahl der isolierten Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop. Zu diesem Zweck, Verdünnung der Zellsuspension 1:50 mit PB-Puffer, gefolgt von einer weiteren Verdünnung von 1:10 in 0.4% Tryphanblau-Lösung.

Tabelle 9. Simultane Isolation von Oligodendrozyten und Mikroglia aus EAE- und naiven Mäusen via MACS. Arbeitsschritte, die gleichzeitig durchgeführt wurden, sind in einer Zeile dargestellt. Abkürzungen: CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; EAE = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; FcR = Fc-Rezeptor; MACS = magnetisch-aktivierte Zellsortierung; O4 = Oligodendrozytenmarker 4.

2.2.7 Sorting-Strategie für Mikroglia aus EAE-Mäusen

Im Rahmen der Isolation von Mikroglia aus EAE-Tieren wurde neben dem MACS-basierten Zellisolationsprotokoll eine weitere Sortierung der Mikroglia als CD11b⁺CD45^{int}-Zellen mittels FACS durchgeführt. Dadurch konnte eine Trennung von anderen CD11b⁺-Zelltypen, wie Makrophagen, Monozyten, natürlichen Killerzellen oder Granulozyten, von der zuvor isolierten CD11b⁺-Mikroglia-Population gewährleistet werden.

Zu diesem Zweck wurde eine *Gating*-Strategie für die Sortierung von CD11b⁺CD45^{intermediate}-Zellen angepasst und optimiert. Um eine Vergleichbarkeit der Einzelzellsuspensionen bei den nachfolgenden Analysen zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine Sortierung von CD11b⁺CD45^{intermediate}-Zellen

bei den naiven Mäusen durchgeführt. Grundsätzlich kann dieser additive Schritt bei der Aufarbeitung eines naiven Replikats übersprungen werden.

Der Mastermix wurde durch Zugabe der FACS-Antikörper CD11b FITC (Fluorescein; Klon M1/70, 1:50) und CD45 APC/Cy7 (Allophycocyanin/ Cyanin 7; Klon 30-F11, 1:200) in PBS hergestellt.

Zunächst folgte eine Zentrifugation der Mikroglia-Zellsuspension bei 300 g und 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde daraufhin vollständig aspiriert. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 µL pro 5×10^6 Zellen des zuvor angesetzten Mastermixes resuspendiert und bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µL PBS gestoppt, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation bei 300 g und 4 °C für 10 Minuten. Nach der Aspiration des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 x PBS mit 10 µg/mL Desoxyribonuklease (DNase) aufgenommen, um eine Endkonzentration von 1×10^7 Zellen pro mL zu erreichen. Anschließend wurde die Zellsuspension bis zum Beginn des *Sorting*-Vorganges bei 4 °C gelagert.

Um mit der Zellsortierungen beginnen zu können, wurde die Probe über ein 100 µm-Sieb in ein neues FACS-Röhrchen überführt. Das Sieb wurde zuvor mit 1 mL 1x PBS mit 10 µg/mL DNase gespült. Anschließend wurde das FACS-Röhrchen in den Sorter BD FACS Aria III (Software FACS DIVA v8.0.2) eingesetzt. Die Flussrate wurde unter Verwendung einer 100 µm-Düse auf 1000 Ereignisse pro Sekunde eingestellt. Mikroglia wurden anhand ihrer Oberflächenmarker-Expression als CD45^{intermediate} und CD11b^{high} klassifiziert und sortiert^{42–46}. Die gewünschte Zielzellpopulation der CD45^{intermediate}, CD11b^{high} Zellen wurde in ein neues 15 mL-Falcon überführt, welches bereits mit 1x PBS bei RT präpariert wurde.

2.2.8 Magnetische Zellseparation von Neuronen und Astrozyten aus EAE- und naiven Mäusen

Der Negativdurchfluss der Oligodendrozyten aus **Abschnitt 2.2.5** wurde anschließend zur Isolation von Neuronen und Astrozyten verwendet. Die vorgeschaltete Isolation von Oligodendrozyten aus der ZNS-Zellsuspension minimierte eine Kontamination durch O4⁺-Zellen. Die Astrozyten wurden durch eine Positivselektion mit anti-ACSA-2-MicroBeads isoliert, während die Neuronen mittels einer Negativselektion, durch Biotinylierung und Depletion aller nicht-neuronalen Zellen, gewonnen wurden.

Für die parallele Isolation von Astrozyten und Neuronen wurde die O4-negative Zellsuspension zunächst bei 300 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig aspiriert und das Zellpellet in jeweils 80 µL PB-Puffer pro zuvor gepoolter ZNS-Zellsuspension resuspendiert.

Im Anschluss wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierfür erfolgte eine 1:50 Verdünnung mit PB-Puffer, gefolgt von einer weiteren 1:10 Verdünnung in 0.4% Trypanblau. Der unverdünnte O4-negative Durchfluss wurde daraufhin für die simultane Isolation von Astrozyten und Neuronen auf zwei Falcon-Röhrchen aufgeteilt.

Die Darstellung der folgenden Arbeitsschritte erfolgt in einer Zeile, sofern diese parallel durchgeführt wurden:

	Astrozyten	Neurone
	Positive Selektion	Negative Selektion
1. Blockierung	Startvolumen: 80 µL <i>AstroMACS Separation buffer</i> pro 1×10^7 Zellen.	Startvolumen: 80 µL PB-Puffer pro 1×10^7 Zellen.
	Hinzugabe von 10 µL FcR-Blockierungsreagenz pro 1×10^7 Zellen und	10 Minuten Inkubationszeit auf Eis.

	Inkubation für 10 Minuten bei 2–8 °C.	
2. Magnetische Markierung von Astrozyten und Biotinylierung von nicht-neuronalen Zellen	Hinzugabe von 10 µL anti-ACSA-2-MicroBeads pro 1×10^7 Zellen mit anschließender Resuspension der Zelllösung. Inkubation für 15 Minuten im Dunkeln bei 2–8 °C.	Hinzugabe von 20 µL Biotin-Antikörper-Cocktail pro 1×10^7 Zellen mit anschließender Resuspension der Zelllösung. Inkubation für 5 Minuten im Dunkeln bei 2-8°C.
		Hinzugabe von 1 mL PB-Puffer pro 1×10^7 Zellen und Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 5 Minuten. Aspiration des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 80 µL PB-Puffer pro 1×10^7 Zellen.
3. Waschen der Astrozyten und magnetische Markierung von biotinylierten Zellen	Hinzugabe von 1 mL <i>AstroMACS Separation buffer</i> pro 1×10^7 Zellen und Zentrifugation bei 300 g und 4 °C für 10 Minuten. Aspiration des Überstandes.	Hinzugabe von 20 µL anti-Biotin MicroBeads pro 1×10^7 Zellen mit anschließender Resuspension. Inkubation für 10 Minuten bei 2-8 °C.
	Platzierung einer LS-Säule pro 4×10^7 Zellen in den <i>QuadroMACS Separator</i> .	
	Befeuchtung aller Säulen mit jeweils 3 mL <i>AstroMACS Separation buffer</i> . Verwurf des Durchflusses.	Befeuchtung aller Säulen mit jeweils 3 mL PB-Puffer. Verwurf des Durchflusses.
	Resuspension von bis zu 1×10^7 Zellen in 500 µL	Hinzugabe von PB-Puffer zur Zellsuspension bis zu

4. Magnetische Separation – Negative Fraktion	<i>AstroMACS Separation buffer.</i>	einem Volumen von 500 μL pro 1×10^7 Zellen.
	Verteilung der Zellsuspension auf die entsprechende Anzahl an Säulen pro Zelltyp. Sammlung des Durchflusses jeweils in einem 15 mL-Falcon pro Säule.	
	Waschung jeder Säule jeweils dreimal mit 3 mL <i>AstroMACS Separation buffer.</i> Dieser Negativ-Durchfluss enthält nicht ziel-spezifische Zellen (ACSA-2-negative Zellen).	Waschung jeder Säule jeweils zweimal mit 1 mL PB-Puffer. Dieser Negativ-Durchfluss enthält die Neurone (Biotin-negative Zellen).
5. Magnetische Separation – Positive Fraktion	Entfernung aller Säulen aus dem Magnetfeld und anschließende Platzierung auf jeweils ein 15 mL-Falcon.	
	Spülung jeder Säule mit 5 mL <i>AstroMACS Separation buffer</i> unter Druck und Verwendung eines Stempels. Dieser Positiv-Durchfluss enthält die zuvor markierten ACSA-2-positiven Zellen.	Spülung jeder Säule mit 5 mL PB-Puffer mit Druck und unter Verwendung eines Stempels. Diese Zellsuspension enthält die nicht-neuronalen bzw. Biotin-positiven Zelltypen.
6. Zählung der Zellen	Zählung der Gesamtzahl an isolierten Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop. Zu diesem Zweck, Verdünnung der Zellsuspension 1:50 mit PB-Puffer, gefolgt von einer weiteren Verdünnung von 1:10 in 0.4% Trypanblau-Lösung.	

Tabelle 10. Simultane Isolation von Astrozyten und Neuronen aus EAE- und naiven Mäusen via MACS. Arbeitsschritte, die gleichzeitig durchgeführt wurden, sind in einer Zeile dargestellt. Abkürzungen: Anti-ACSA-2 = Astrozyten-Zelloberflächen-Antigen-2; EAE = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; FcR = Fc-Rezeptor; MACS = magnetisch-aktivierte Zellsortierung.

2.2.9 Durchflusszytometrie ZNS-residenter Zellen

Die durchflusszytometrischen Analysen der vier isolierten Zellpopulationen dienten primär der Qualitätskontrolle hinsichtlich der Reinheit und Viabilität der isolierten Einzelzellsuspensionen.

Zunächst wurde ein *Forward-* und *Sidescatter-Gating* (FSC/SSC-Gating) durchgeführt, um die Zellen nach Größe und Granularität zu sortieren. Zusätzlich wurde mittels *FSC-Height* (FSC-H) gegen *FSC-Width* (FSC-W) ein Einzelzell-Gating der Zellsuspensionen vorgenommen, um Zellaggregate oder Zelldopplungen zu identifizieren und von den weiteren FACS-Analysen auszuschließen.

Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde der fixierbare Viabilitätsfarbstoff eFluor 506 in einer 1:10.000-Konzentration verwendet. Der Farbstoff dringt in tote Zellen ein, die dadurch stark fluoreszieren und sich von lebenden Zellen abgrenzen lassen. Eine Kombination des Viabilitäts-Farbstoffes eFluor 506 mit Fixierpuffern war möglich, da der Farbstoff auch nach der Fixierung stabil bleibt. Diese Eigenschaft war insbesondere für die nachfolgende intrazelluläre Färbung des Kernmarkers NeuN (RNA-Bindungsprotein Fox-1-Homolog 3) relevant, bei der die Zellen fixiert und permeabilisiert wurden, um Zugang zu intrazellulären Strukturen zu ermöglichen.

Für jeden ZNS-Zelltyp wurde zudem ein spezifisches *Gating* basierend auf den Oberflächenmarkern vorgenommen, die zuvor mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper markiert wurden.

2.2.9.1 Reinheitspanel (extrazelluläres Färbeprotokoll)

Im ersten Teil des Reinheitspanels wurde ein extrazelluläres Färbeprotokoll angewandt, wobei pro Färbung 1×10^5 Zellen in 50 μ L PBS gelöst wurden. Für die Herstellung des Mastermixes wurde PBS mit 2% fetalem Kälberserum (FCS) und 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) als Medium verwendet. Dieses wurde mit folgenden Fluorophor-konjugierten monoklonalen Antikörpern ergänzt: CD11b FITC (Klon 1/70, 1:100), ACSA-2 PE-

Vio615 (Klon REA-969, 1:200), O4 APC (Klon REA-576, 1:400), und CD45 BV510 (Klon 30-F11, 1:150). Zusätzlich wurde ein anti-CD16/32- Antikörper mit einer Konzentration von 1 µg pro 1×10^6 Zellen zur Blockade des Fc-Rezeptors hinzugefügt, um Hintergrundsignale zu minimieren und die Spezifität der Antikörper-Markierung zu erhöhen.

Im ersten Schritt wurde eine Zentrifugation der isolierten Zellfraktion bei 540 g und 4 °C für 5 Minuten durchgeführt. Als Standard für Protokolle der Durchflusszytometrie-Färbungen wurden 540 g verwendet, um unspezifische Bindungen in weiteren Färbe- und Waschschritten zu minimieren. Im Anschluss wurde der Überstand sorgfältig abgesaugt und das Zellpellet in 100 µL des Mastermixes aufgenommen. Die Probe wurde daraufhin im Dunkeln und bei RT für 15 Minuten inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend mit 500 µL PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA gewaschen und erneut bei 540 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand aspiriert und das Zellpellet in 70 µL PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA aufgenommen. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde die Probe erneut gevortext, um das Zellpellet vollständig zu lösen.

2.2.9.2 Reinheitspanel (intrazelluläres Färbeprotokoll mit NeuN)

Im zweiten Teil des Reinheitspanels wurde ein intrazelluläres Färbeprotokoll mit dem Neuronen-spezifischen Kernmarker NeuN durchgeführt. Der anti-NeuN-Antikörper stellt eine wichtige Ergänzung zur Färbung viabler Neurone dar und dient der Validierung der zuvor isolierten Neuronen-Population ⁷².

Der Mastermix für die intrazelluläre Färbung wurde erneut aus PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA hergestellt, in dem folgende Fluorophor-konjugierte monoklonale Antikörper verdünnt wurden: CD11b FITC (Klon M1/70, 1:100), ACSA-2 PE-Vio615 (Klon REA-969, 1:200) und CD45 BV510 (Klon 30-F11, 1:150).

Für die intrazelluläre Färbung von NeuN wurden 1×10^5 Zellen des Negativdurchflusses der Neurone in ein FACS-Röhrchen mit 1 mL PBS mit 2 % FCS und 2 mM EDTA überführt. Die Zellsuspension wurden daraufhin bei 540 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 100 µL des Mastermixes aufgenommen. Die Probe wurde im Dunkeln bei RT für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 µL PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA gewaschen und erneut bei 540 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert.

Während der Zentrifugation wurde die Fixierungs-/Permeabilisierungslösung mit dem *Forkhead box P3 (Foxp3)/ Transcription Factor Staining Buffer Set* vorbereitet. Das Ziel dieser Vorgehensweise bestand darin, die Zellen zu fixieren und zugleich zu permeabilisieren, sodass eine Färbung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren, wie Foxp3 oder NeuN, mittels Antikörper möglich war. Im nächsten Schritt wurden 50 µL des konzentrierten Fixierungs-/Permeabilisierungskonzentrats zu 150 µL des Fixierungs-/Permeabilisierungsverdünnungsmittels hinzugegeben, um eine Endverdünnung von 1:4 zu erreichen. Nach Beendigung des Zentrifugationsprozesses und der Aspiration des Überstandes wurde das Zellpellet in eine Lösung von 100 µL der Fixierungs-/Permeabilisierungslösung aufgenommen. Es folgte eine Inkubation der Probe bei 4 °C für 30 Minuten.

In der Zwischenzeit wurde ein Permeabilisierungs-/Waschpuffer vorbereitet, wobei 100 µL des Permeabilisierungspuffers zu 900 µL ddH₂O hinzugegeben wurden, um eine Endverdünnung von 1:10 zu erreichen. Im Anschluss wurden die zuvor inkubierten Zellen jeweils mit 100 µL des hergestellten Permeabilisierungs-/Waschpuffers gewaschen und bei 540 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Zusätzlich wurde ein weiterer Mastermix in dem Permeabilisierungs-/Waschpuffer hergestellt, der ausschließlich aus NeuN (NeuN AF647, Klon EPR12763, 1:200) und 1 µg anti-CD16/32 pro 1×10^6 Zellen bestand. Im Anschluss an das Absaugen der zentrifugierten Proben wurden die

fixierten Zellen in 50 µL des zweiten Mastermixes resuspendiert und bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert.

Daraufhin folgte eine Waschung der Zellen mit 100 µL des Permeabilisierungs-/Waschpuffers und eine erneute Zentrifugation bei 540 g und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 70 µL PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA für die anschließende Analyse im Durchflusszytometer aufgenommen.

2.2.10 Immunzellpanel (extrazelluläres Färbeprotokoll)

Die simultane Untersuchung von ZNS-residenten Zellen und peripher immigrierter Immunzellen aus demselben ZNS-Homogenat konnte durch die Erweiterung der durchflusszytometrischen Analysen um ein spezifisches Immunzellpanel realisiert werden. Hierfür wurde der Negativ-Durchfluss der Astrozyten mit dem Positiv-Durchfluss der Neuronen in einem Falcon zusammengeführt. Die Analyse dieser Zellsuspension erfolgte unter der Annahme, dass diese relevanten Immunzell-Populationen der Peripherie enthält, die im Rahmen der Neuroinflammation das ZNS infiltrieren.

Pro Färbung wurden 1×10^5 Zellen verwendet, die in einem Volumen von 50 µL PBS gelöst wurden. Der Mastermix wurde erneut aus PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA hergestellt und enthielt folgende Fluorophor-konjugierten monoklonale Antikörper, die darin verdünnt wurden: CD11b FITC (Klon M1/70, 1:50), CD19-PE/Cy7 (Klon 6D5, 1:100), CD25-APC (Klon PC61, 1:100), CD8a-AF700 (Klon 53-67, 1:100), CD45 APC/Cy7 (Klon 30-F11, 1:200), CD4-BV421 (Klon RM4-5, 1:100). und FVD506 (Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff eFluor 506, 1:10.000). Des Weiteren wurde ein anti-CD16/32-Antikörper mit einer Konzentration von 1 µg pro 1×10^6 Zellen zur Blockade des FcR hinzugefügt.

Zunächst erfolgte eine Zentrifugation der reinen Zellsuspension bei 540 g und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wurde daraufhin aspiriert und das Zellpellet in

100 μ L des Mastermixes aufgenommen. Es folgte eine Inkubationszeit der Probe für 15 Minuten bei RT im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 μ L PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 540 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das Zellpellet in 70 μ L PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA aufgenommen. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde die Probe erneut gevortext, um das Zellpellet vollständig zu lösen.

2.2.11 Geräte- und Softwarekonfiguration

Die Durchflusszytometrie-Analysen wurden mit einem CytoFLEX-S (*Acquisition Software CytExpert V2.4.0.28*) in Kombination mit der Kaluza-Software V2.1.2 durchgeführt. Nach der Einstellung des Zellgates (FSC-A/SSC-A) wurden FSC-H und FSC-W zur Unterscheidung von Dubletten verwendet. Die Signale des mt-Keima-Konstrukts wurden in den Detektorkanälen Violet 610 (Anregungslaser 405 nm; 610/20-Bandpassfilter) und ECD (Anregungslaser 561; 610/20-Bandpassfilter) gemessen.

2.2.12 Statistische Analysen

Die deskriptiven statistischen Analysen und Visualisierungen wurden mithilfe von *GraphPad Prism* (Version 10.3.0) durchgeführt. Die experimentellen Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Erstellung der Abbildungen erfolgte unter Verwendung von *Adobe Illustrator* (Version 2025), *BioRender* (<https://www.biorender.com>) sowie *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com>).

3 Ergebnisse

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Etablierung und Optimierung eines bestehenden Zellisolationsprotokolls an einem neuen Standort, um eine zeitlich-dynamische Isolation von ZNS-residenten Zelltypen im Verlauf der EAE zu ermöglichen. Dies bildet die Grundlage für nachfolgende Multi-Omics-Analysen. Langfristig soll diese Arbeit zur Identifikation potentieller, molekularer Unterschiede sowie variierender Zellprofile und –signaturen der ZNS-residenten Zellen im EAE-Modell beitragen.

3.1 Etablierung des EAE-Modells

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein monophasisches selbstlimitierendes EAE-Modell implementiert, um die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen zu untersuchen. Die Etablierung experimenteller Modelle an einem neuen Standort erfordert häufig Anpassungen, um reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse zu erzielen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der initialen Versuche sowie die unternommenen Optimierungen beschrieben, die zu einer erfolgreichen Durchführung des Modells führten.

Die Immunisierung der Versuchstiere erfolgte wie zuvor beschrieben durch eine subkutane Injektion eines Gemischs aus dem MOG₃₅₋₅₅ Peptid und CFA, gefolgt von einer intraperitonealen Ptx-Injektion. In den darauffolgenden Tagen wurden alle Versuchstiere anhand eines etablierten Punktesystems täglich evaluiert und klinisch beurteilt. Die initiale Inzidenz der ersten drei Immunisierungen lag durchschnittlich bei $22,22 \pm 11,28\%$ (**Abbildung 3**), begleitet von verzögerten und milden Krankheitsverläufen.

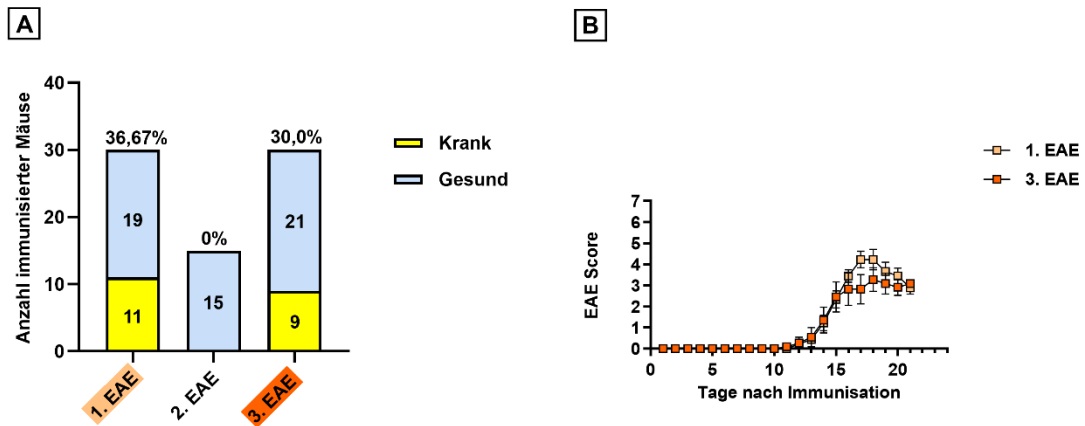


Abb. 3 Inzidenzen und EAE-Verläufe der ersten drei Immunisierungen während der Etablierungsphase. Abkürzungen: EAE = Experimentelle Autoimmune-Enzephalomyelitis. Die Abbildung zeigt die Inzidenzen sowie die zugehörigen klinischen EAE-Verläufe der Versuchstiere während der ersten drei Immunisierungsdurchgänge. Als erkrankt wurden Versuchstiere definiert, die einen klinischen EAE-Score >0 erreichten. In die Analyse der Krankheitsverläufe wurden ausschließlich phänotypisch erkrankte Tiere eingeschlossen. Die klinischen EAE-Scores wurden täglich evaluiert und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die experimentellen Daten zeigen insgesamt niedrige Inzidenzraten sowie milde und verzögerte Krankheitsverläufe (n=3).

Zur Optimierung der niedrigen Inzidenzrate sowie der variierenden EAE-Verläufe wurden die folgenden Maßnahmen umgesetzt:

- Neuanfertigung der Immunisierungsreagenzien: Herstellung von MOG₃₅₋₅₅ Peptid, CFA und Ptx sowie Lagerung aller Substanzen auf Eis während der Gesamtdauer der Experimente, um die Stabilität der Reagenzien zu gewährleisten.
- Wechsel des Herstellers der 2 mL-Spritze: Austausch des Herstellers der Spritze mit zentrischem Luer Lock sowie verlängertes und intensiveres Durchmischen des MOG₃₅₋₅₅ Peptids mit CFA über einen Dreiwegehahn, um das Mischverhältnis beider Substanzen zu verbessern und das Totvolumens zu minimieren.
- Optimierung der Emulsionsapplikation: Maximale Zeitspanne von einer Stunde zwischen Durchmischung der MOG₃₅₋₅₅ /CFA-Emulsion und der Applikation an die Versuchstiere, aufgrund der im Verlauf zunehmenden Viskosität und somit erschwerten Injektion der Emulsion. Der finale Lösungsansatz mit Ptx und PBS wurde hingegen erst unmittelbar vor der Applikation, unter ausschließlicher Verwendung von sterilem PBS hergestellt, da Ptx bei RT instabil ist.

- Optimierung der Umweltbedingungen: Regelmäßige Kontrolle der Raumtemperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, der relativen Luftfeuchtigkeit von $50\% \pm 5\%$ und des Tag-Nacht-Rhythmus von 12h/12h im Tierhaltungsraum, da insbesondere während der Sommermonate niedrigere Inzidenzraten bei Immunisierungen beobachtet wurden.
- Stressreduktion: Akklimatisierung der Tiere mindestens 1 Woche vor Immunisierungsstart, um den Transportstress zu minimieren und somit eine zuverlässige Immunreaktion auf die applizierten Substanzen zu gewährleisten.
- Evaluation des Gesundheitsstaus: Vor Experimentbeginn wurden alle Mäuse hinsichtlich möglicher Erkrankungen oder eines schlechten Ernährungszustands mit einem Gewichtsgrenzwert von etwa 18 g beurteilt, um potentielle Einschränkungen des Immunsystems auszuschließen.
- Standardisierung der Protokolle: EAE-Induktionen sowie tägliche klinische Kontrollen der Versuchstiere stets zur gleichen Tageszeit, um tageszeitliche Fluktuationen der EAE-Scores auszuschließen.
- Ptx-Titrationsversuch: Durchführung eines Ptx-Titrationsversuchs, um Umweltfaktoren bzw. den Wechsel des Tierstalls als potentiellen Störfaktor auszuschließen und die optimale Ptx-Konzentration von 100 ng (Chargennummer 1001) sowie den zuvor beschriebenen monophasischen EAE-Verlauf zu bestätigen (**Abbildung 4A**).

Durch die beschriebenen Modifikationen und gezielten Anpassungen konnte die Inzidenz in den nachfolgenden EAE-Versuchen von durchschnittlich $22,22 \pm 11,28\%$ (n=3) auf $84,26\% \pm 4,08\%$ (n=5) gesteigert werden. Infolgedessen konnte zudem eine ausreichende Anzahl erkrankter Tiere für die geplanten Zellisoliationsversuche gewährleistet werden.

Ergänzend wurde ein Ptx-Titrationsversuch durchgeführt. Dabei zeigte die Immunisierung mit murinem MOG₃₅₋₅₅, CFA und ansteigenden Ptx-Dosen (100 ng, 150 ng, 200 ng, 300 ng), dass die Ptx-Dosis von 100 ng die optimale Induktion des EAE-Verlaufs ermöglichte. Bei dieser Dosierung traten klinische Symptome

erstmalig etwa am 10. Tag nach der Immunisierung auf, begleitet von einem ausreichend stark ausgeprägten Krankheitsverlauf, der sein Maximum etwa am Tag 16 erreichte (**Abbildung 4B**). Als *Cut-Off* für einen signifikant ausgeprägten EAE-Verlauf wurde ein Score von 3 festgelegt (**Tabelle 8**). Infolgedessen konnte hiermit der typische Verlauf der MOG₃₅₋₅₅ mit hoher Inzidenz nachgestellt werden.

Die Mäuse erfüllten bei dieser Dosierung keine der in **Abschnitt 2.2.1** genannten Ausschlusskriterien, die ein Ausscheiden aus dem Experiment erforderlich gemacht hätten. Entsprechend wurde die Ptx-Dosis von 100 ng folglich für alle nachfolgenden Experimente als Standard festgelegt.

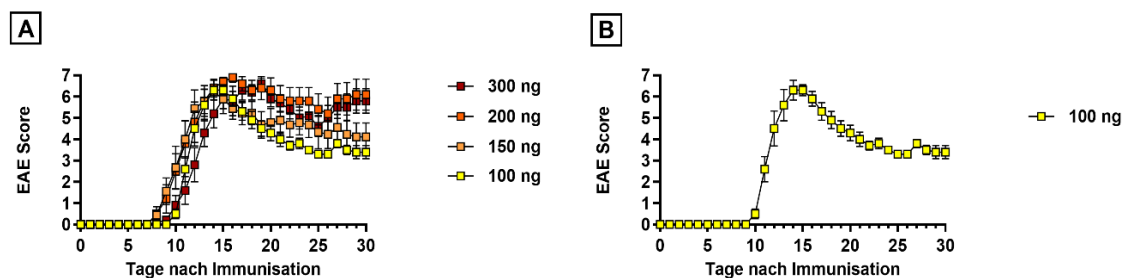


Abb. 4 Ptx-Titrationsversuch zur Verifizierung der optimalen Ptx-Dosis und des EAE-Verlaufs. Abkürzungen: CFA = Komplettes Freund-Adjuvans; EAE = Experimentelle Autoimmune-Enzephalomyelitis; MOG₃₅₋₅₅ = Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein₃₅₋₅₅; ng = Nanogramm; Ptx = Pertussistoxin. **(A)** Immunisierung von jeweils 10 C57BL/6J-Mäusen pro Versuchsgruppe mit murinem MOG₃₅₋₅₅-Peptid, CFA sowie einer aufsteigenden Ptx-Konzentration (100 ng, 150 ng, 200 ng und 300 ng). Der klinische Verlauf der EAE wurde täglich über einen Zeitraum von 30 Tagen evaluiert. **(B)** Bestimmung der optimalen Ptx-Dosis von 100 ng. Bei dieser Dosis wurde ein ausreichend ausgeprägter Krankheitsverlauf beobachtet, mit dem Auftreten klinischer Symptome etwa am 10. Tag nach der Immunisierung. Es mussten keine Tiere aufgrund der Ausschlusskriterien aus den Experimenten exkludiert werden. Daher wurde 100 ng Ptx als Standarddosis für alle folgenden Immunisierungen festgelegt. Die klinischen EAE-Scores wurden täglich evaluiert und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2 Etablierung der simultanen Isolation von ZNS-residenten Zellen aus EAE und naïven Mäusen

Das in dieser Arbeit vorgestellte, finale Protokoll ermöglicht die parallele Isolation von Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Neuronen aus einem einzigen ZNS-Replikat der Maus (**Abbildung 2**). Um Mechanismen der Neuroinflammation und Neurodegeneration zu untersuchen, wurde das Protokoll sowohl bei naïven als auch bei EAE-Mäusen eingesetzt.

Die präzise Isolation der ZNS-residenten Zelltypen stellt eine entscheidende Voraussetzung für die anschließend angestrebten Multi-*Omic*s-Analysen dar. Im Rahmen der initialen Versuche traten jedoch wiederholt Herausforderungen im Hinblick auf die Reinheiten und Zusammensetzung der isolierten Einzelzellsuspensionen auf. Im Folgenden werden die Beobachtungen aus den ersten Isolationsansätzen sowie die daraus resultierenden Optimierungsschritte beschrieben, die zur Verbesserung der Reinheit der Zellisolation führten.

Die Isolation der Oligodendrozyten erfolgte mittels anti-O4-MicroBeads, während Mikroglia unter Verwendung von anti-CD11b-MicroBeads isoliert wurden (**Tabelle 9**). Um eine Kontamination mit O4-positiven Zellen zu vermeiden, wurden Astrozyten und Neuronen aus dem Negativ-Durchfluss der Oligodendrozyten isoliert (**Tabelle 10**). Die Astrozyten wurden mithilfe von anti-ACSA-2-MicroBeads separiert, während die Neuronen durch eine Negativselektion isoliert wurden. Bei Letzterer wurden alle nicht-neuronalen Zellen, einschließlich Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten, Endothelzellen und Fibroblasten (außer Erythrozyten) magnetisch depletiert (**Tabelle 10**).

Bei EAE-Mäusen war es zudem erforderlich, die Mikroglia-Population von anderen CD11b⁺-Zellen zu trennen, darunter Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen, die im Rahmen der Neuroinflammation das ZNS infiltrieren. Nach der Auswahl von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W), wurden Mikroglia zu diesem Zweck

bei der Sortierung mittels Durchflusszytometrie als CD45^{intermediate} und CD11b^{high} definiert (**Abbildung 5**).

Im Rahmen dieser Analyse betrug der Anteil der Mikroglia an den viablen Einzelzellen bei naïven Mäusen etwa 91% (96% der CD11b-positiven Population), während bei EAE-Tieren ein Anteil von 47% aller lebenden Einzelzellen (55% der gesamten CD11b⁺-Population) in den phänotypischen Analysen zur Mikroglia-Population gehörten (**Abbildung 5**).

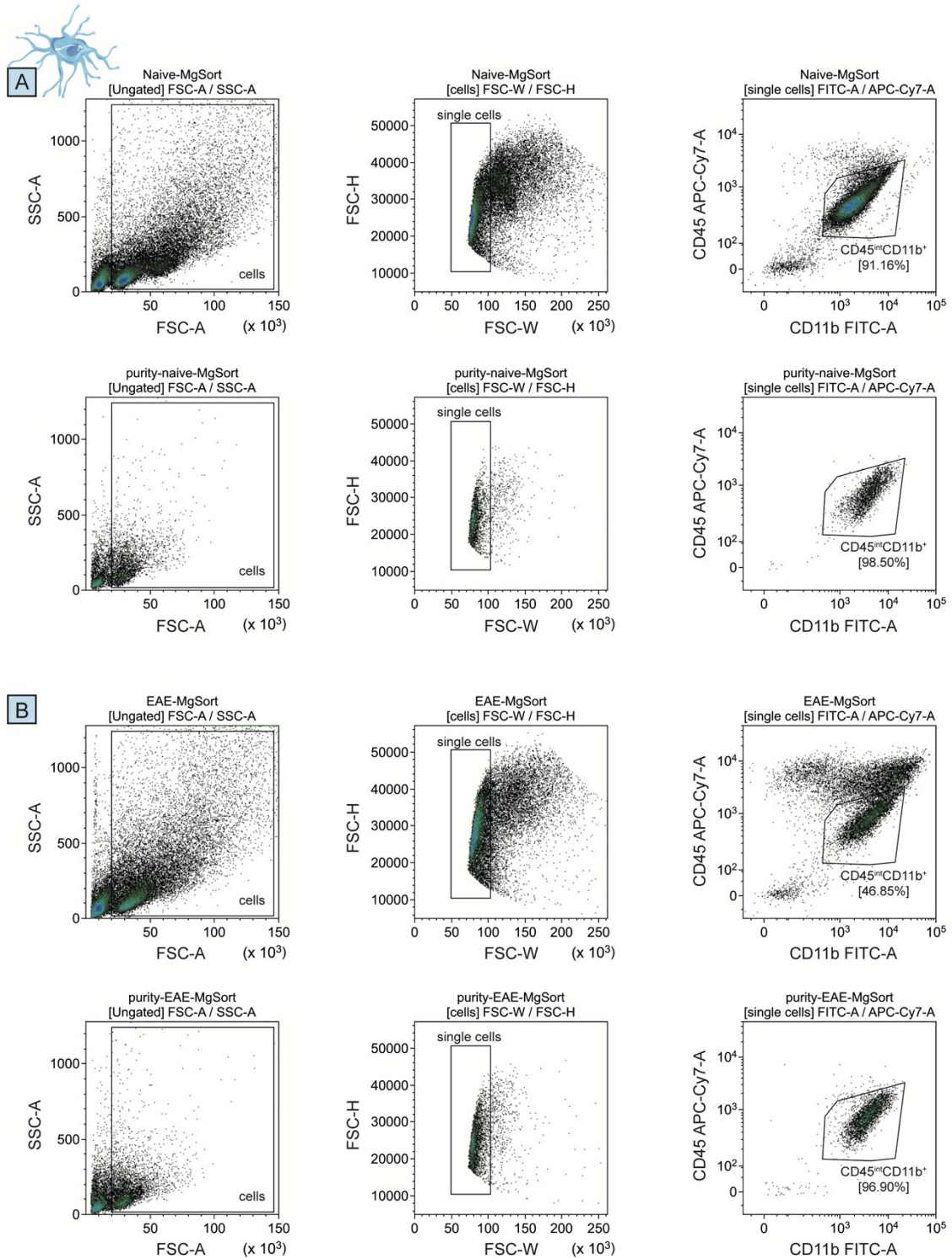


Abb. 5 Gating-Strategie zur Selektion von Mikroglia aus isolierten CD11b⁺- Zellpopulationen aus EAE- und naiven Mäusen. Abbildung modifiziert nach Schroeter, Henes *et al.* ⁷². Abkürzungen: APC = Allophycocyanin; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; EAE = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; FACS = Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting; FITC-A = Fluoresceinisothiocyanat; FSC-A = Forwardscatter Area; FSC-H = Forwardscatter Height; FSC-W = Forwardscatter Width; Mg = Mikroglia; int= intermediate; PC7 = PE-Cyanin-7-Farbstoff; Sort = Sortierung; SSC-A = Sidescatter Area. **(A)** Gating-Strategie bei naiven Mäusen. **(B)** Gating-Strategie bei EAE-Mäusen. Die obere Reihe jedes FACS-Panels zeigt Punktdiagramme vor der Zellsortierung. Nach der Auswahl von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W), wurden CD45^{int}CD11b^{high}- Zellen als Mikroglia-Population sortiert. Im Rahmen dieser Analyse betrug der Anteil der Mikroglia an den viablen Einzelzellen bei naiven Mäusen etwa 91,16% (96% der CD11b⁺-Population),

während bei EAE-Tieren ein Anteil von 46,85% aller lebenden Einzelzellen (55% der gesamten CD11b⁺-Population) CD45^{int}CD11b^{high} war. Die hier dargestellten experimentellen Daten wurden in Zusammenarbeit mit Stefanie Lichtenberg erhoben.

Zur Überprüfung der Qualität der isolierten Einzelzellsuspensionen wurden sowohl vor als auch nach der magnetischen Separation der Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen FACS-Analysen durchgeführt (**Abbildung 6**). Dabei wurden zelltyp-spezifische Oberflächen- und Kernmarker sowie Viabilitäts-Färbungen zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen verwendet.

Im Rahmen dieser durchflusszytometrischen Reinheitsanalysen wurden nach der Selektion vitaler Zellen (SSC-A/FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/FSC-W) zunächst eine Separation von verbliebenen Mikroglia und Lymphozyten in der ZNS-Zellsuspension vorgenommen. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Oligodendrozyten innerhalb der ZNS-Zellpopulation anhand ihrer O4-Expression, wohingegen Astrozyten anhand ihrer ACSA-2-Expression identifiziert wurden. Neurone wurden im Anschluss an die Biotinylierung und Depletion aller nicht-neuronalen Zellen durch ihre fehlende O4- bzw. ACSA-2-Expression klassifiziert (**Abbildung 6**).

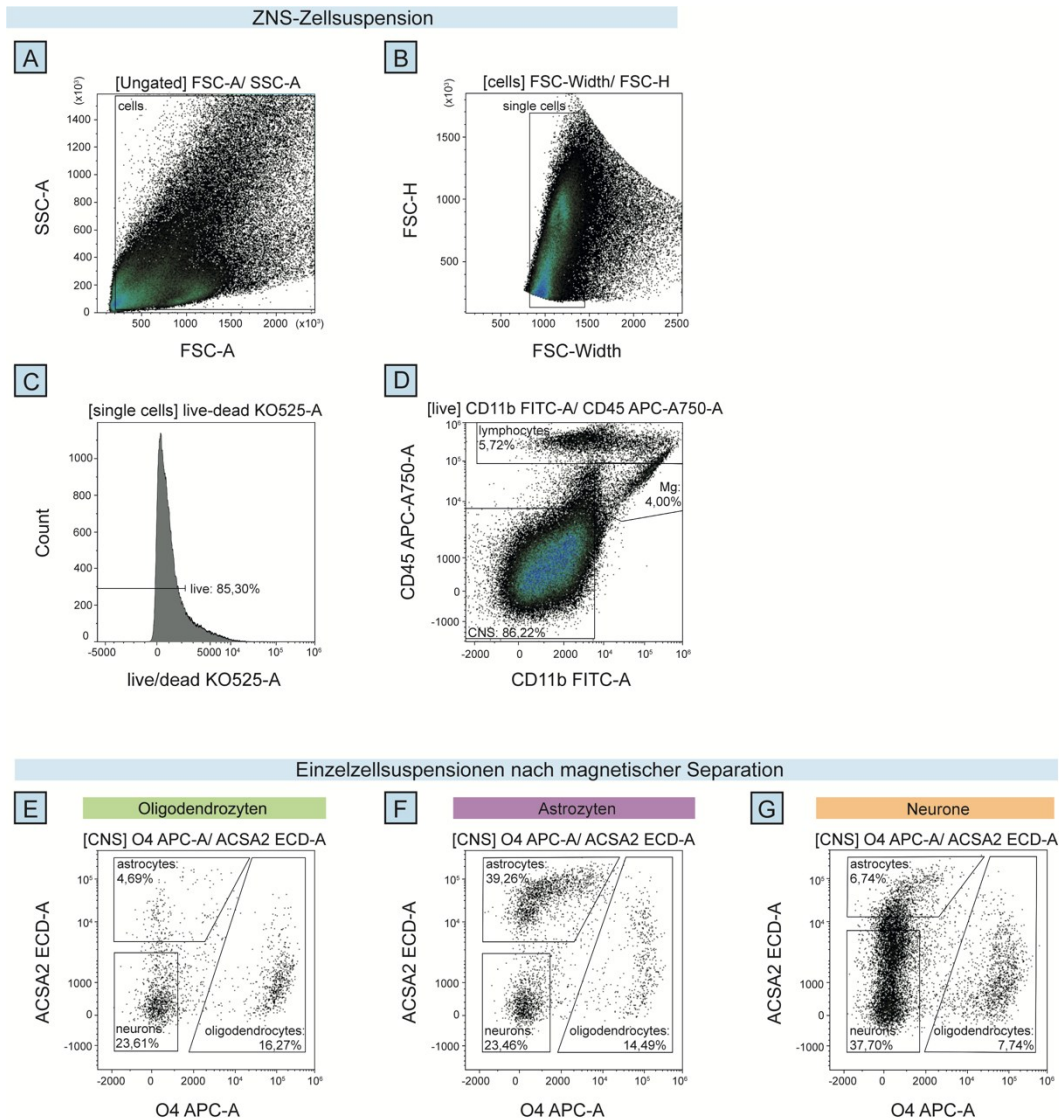


Abb. 6 Repräsentative Reinheitsanalysen isolierter ZNS-residenter Zellentypen aus adulten Mäusen. Abkürzungen: ACSA- 2= Astrozyten-Oberflächenantigen-2; APC = Allophycocyanin; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; ECD = energy-coupled dye; FACS = Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting; FITC-A= Fluoresceinisothiocyanat; FSC-A = Forwardscatter Area; FSC-H = Forwardscatter Height; FSC-W = Forwardscatter Width; Mg = Mikroglia; O4 = Oligodendrozytenmarker 4; SSC-A = Sidescatter Area; ZNS = Zentrales Nervensystem. Repräsentative Reinheitsanalysen von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen, die aus adulten Mäusen isoliert wurden. Die Isolation erfolgte mittels magnetischer Zellsortierung unter Verwendung von anti-O4-MicroBeads, anti-ACSA-2-MicroBeads sowie durch Biotinylierung und anschließende Depletion aller nicht-neuronalen Zellen. Die beiden oberen Reihen des FACS-Panels zeigen Analysen der gesamten ZNS-Zellsuspension vor Beginn der magnetischen Separation, aus der alle nachfolgenden Einzelzellsuspensionen isoliert wurden (A-D). Nach der Auswahl von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W) wurden verbliebene Mikroglia und Lymphozyten in der Zellsuspension identifiziert. Im Anschluss an die magnetische Separation der spezifischen ZNS-residenten Zelltypen wurde die Reinheit der Einzelzellsuspensionen analysiert (E-G). Oligodendrozyten wurden anhand ihrer O4-Expression (E), Astrozyten durch ihre ACSA-2-Expression charakterisiert (F). Neurone wurden im Anschluss an die Biotinylierung und Depletion aller nicht-neuronalen Zellen durch ihre fehlende O4- bzw. ACSA-2-Expression klassifiziert (G).

In den phänotypischen Analysen der Einzelzellsuspensionen der initialen Versuche mittels Durchflusszytometrie wurden Kontaminationen durch andere

Zelltypen (**Abbildung 6 E-G**) sowie Verunreinigungen der Einzelzellsuspensionen mit Myelin und Zelltrümmern (**Abbildung 6 A+B**) nachgewiesen. Dies betraf die Isolation von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen. Im Unterschied zur Isolation der Mikroglia beinhalteten die Isolationsschritte dieser Zelltypen keinen zusätzlichen durchflusszytometrischen *Sorting*-Prozess.

Die durchschnittliche Reinheit der isolierten Oligodendrozyten betrug in den ersten drei Aufarbeitungen $55,66\% \pm 20,71\%$, bei einer Viabilität von $88,72\% \pm 5,00\%$. Die Reinheit der isolierten Mikroglia belief sich auf durchschnittlich $86,75\% \pm 1,75\%$, bei einer Viabilität von $69,50\% \pm 0,50\%$. Astrozyten wurden mit einer durchschnittlichen Reinheit von $43,01\% \pm 7,06\%$, begleitet von einer Viabilität von $84,22\% \pm 2,57\%$ isoliert. Ergänzend dazu wiesen die isolierten Neurone eine durchschnittliche Reinheit von $47,90\% \pm 25,56\%$ auf, bei einer Viabilität von $84,93\% \pm 3,97\%$.

Die Isolation von Mikroglia beinhaltete sowohl bei EAE- als auch naiven Mäusen einen zusätzlichen *Sorting*-Prozess, ohne dass es zu Verlusten der Reinheit kam (**Abbildung 5**).

3.2.1 Optimierte Zellisolation durch ein verbessertes Fehlermanagement und alternative Ansätze

Aufgrund der anfänglich geringen Reinheit der Einzelzellsuspensionen und der Herausforderungen durch Zell- und Myelin-Kontaminationen bei der Zellisolation wurden folgende Maßnahmen ergriffen, um die Präzision der Experimente zu erhöhen:

- Verwendung neuer Reagenzien und Kits: Alle alten Materialien wurden verworfen, um potentielle Kontaminationen vollständig auszuschließen.
- Neuproduktion von Puffern: Für jedes Experiment wurden alle Pufferlösungen neu angesetzt, um eine konstante Qualität zu gewährleisten.

- Permanente Kühlung der Reagenzien: Sämtliche Reagenzien, Puffer, Zellsuspensionen und Falcons wurden während der Experimente kontinuierlich auf Eis gelagert bzw. vorgekühlt, um eine Stabilität der Reagenzien zu gewährleisten.
- Standardisierte Gerätschaften: Es wurden ausschließlich identische Gerätschaften, wie beispielsweise dieselbe Zentrifuge, verwendet, um die Variabilität zwischen den Experimenten zu minimieren.
- Entwicklung einer alternativen Methode zur Entfernung von Myelin und Zelltrümmern: Es erfolgte die Entwicklung einer alternativen Methode, um Myelin und Zelltrümmer bei fehlerhaften Gradienten zu entfernen, um langfristig die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Versuche zu steigern (siehe unten).
- Minimierung der Versuchsdauer: Die Zeit zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde so kurz wie möglich gehalten, um funktionelle Beeinträchtigungen der Zellen zu vermeiden. Unterbrechungen zwischen den einzelnen Protokollabschnitten wurden vermieden. Die Dauer der Isolation von Oligodendrozyten und Mikroglia wurde von insgesamt etwa 6 Stunden auf etwa 4 Stunden minimiert, für die Isolation von Neuronen und Astrozyten wurden etwa 5 Stunden benötigt.

Die Resultate der oben aufgeführten Optimierungen sind in dem **Abschnitt 3.2.2** einzusehen.

Wie oben beschrieben betrifft ein entscheidender Schritt des Zellisolationsprotokolls die Entfernung von Myelin und Zelltrümmern mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Für die Gewinnung reiner Einzelzellsuspensionen war die vollständige Entfernung von Myelin-Residuen und Zelltrümmern erforderlich. Hierzu wurde die mit einer Trümmerentfernungslösung vermischte Zellsuspension zunächst mit PBS überschichtet, um einen sichtbaren Dichtegradienten zu erzeugen (**Abbildung 7**). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei $3000 \times g$ unter Ausschaltung der Bremsfunktion, wodurch eine zuverlässige Trennung der drei resultierenden Phasen ermöglicht wurde (von unten nach oben: untere Zellsuspension inklusive

Zielzellen - Myelin - Überstand mit Rückständen einer geringeren Dichte; **siehe Abbildung 7**). Die umfassende Entfernung von residualen Zelltrümmern und Myelin wurde durch die vollständige Aspiration der beiden oberen Phasen erreicht.

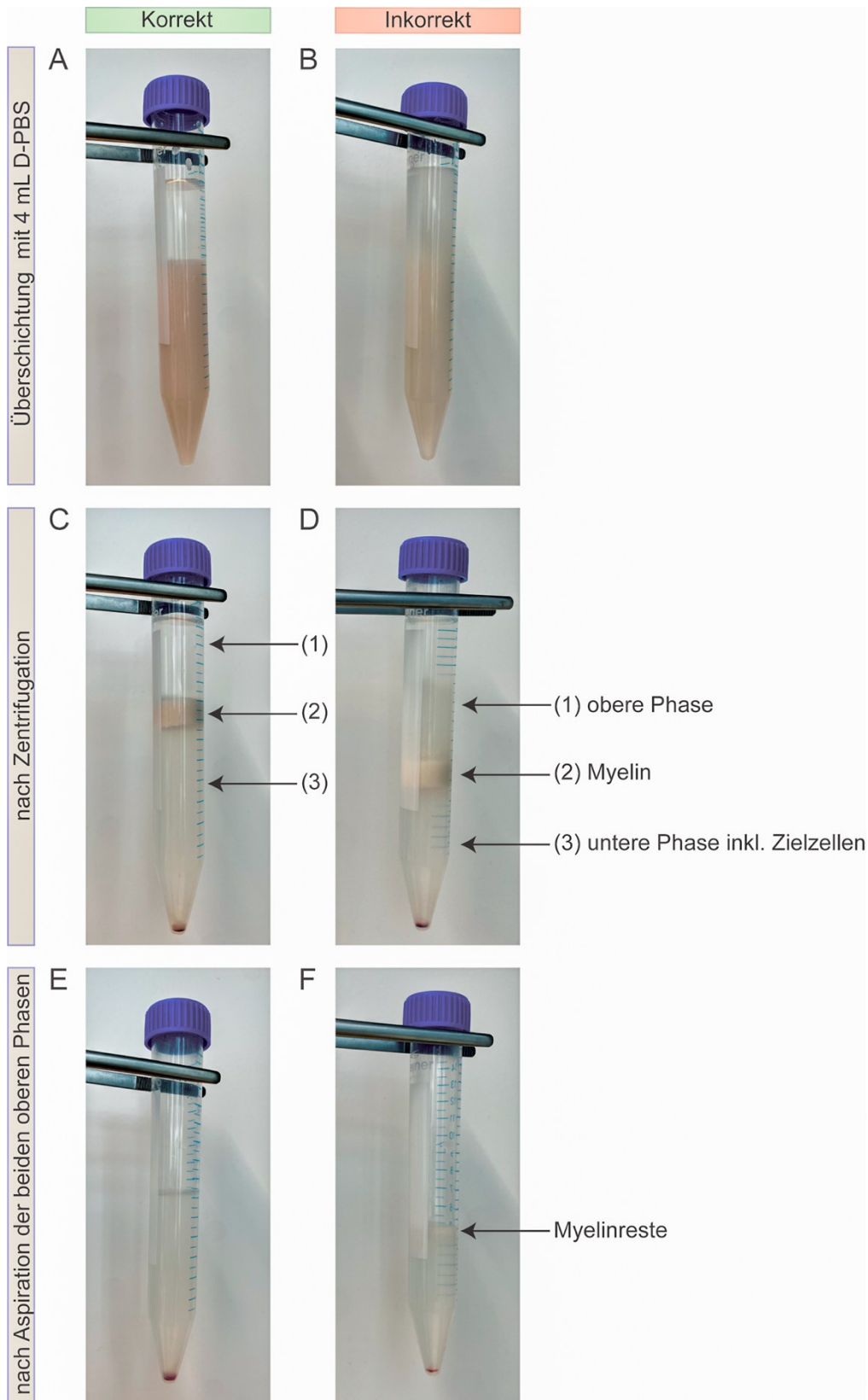


Abb. 7 Erfolgreiche Ansätze und typische Fehlerquellen bei der Gradienten-Bildung. Abbildung modifiziert nach Schroeter, Henes *et al.* ⁷². Abkürzungen: PBS = phosphatgepufferte Kochsalzlösung; ZNS = Zentralnervensystem. (A) Positivbeispiel des Gradienten nach Überschichtung mit 4 ml PBS. Die obere Phase, bestehend aus 4 ml PBS, ist deutlich von der unteren Phase, bestehend aus der ZNS-Zellsuspension mit der Trümmerentfernungslösung, abgrenzbar. (B) Negativbeispiel des Gradienten nach Überschichtung mit 4 ml PBS. Im Gradienten ist keine klare Trennung zwischen dem PBS und der darunter liegenden Zellsuspension zu erkennen. Ein Teil des PBS ist in die Zellsuspension diffundiert. (C) Positivbeispiel für

den Gradienten nach der Zentrifugation. Drei separate Phasen sind deutlich zu unterscheiden. In der oberen (1) und unteren Phase (3) des Gradienten sind keine Myelin-Reste sichtbar. Die mittlere Phase enthält das gesamte Myelin (2). Das Zellpellet ist am Boden des 15-ml-Falcon sichtbar. (D) Negativbeispiel für den Gradienten nach der Zentrifugation. Es ist keine genaue Trennung zwischen den drei Phasen möglich. In der oberen (1) und unteren Phase (3) des Gradienten sind einige Myelin-Rückstände sichtbar. (E) Positivbeispiel für den Gradienten nach Aspiration der beiden oberen Phasen. Die resultierende Probe enthält nur das Zellpellet und einen klaren Überstand darüber. Es bleiben keine Myelin-Rückstände zurück. (F) Negativbeispiel für den Gradienten nach Aspiration der beiden oberen Phasen. Die Probe enthält noch einige Myelinreste (schwarzer Pfeil).

Eine mangelhafte Reinheit der Einzelzellsuspensionen war häufig auf eine unzureichende Schichtung des Gradienten zurückzuführen, weshalb die in **Abschnitt 2.2.4** beschriebene alternative Vorgehensweise für den Fall eines fehlerhaften Gradienten entwickelt wurde.

Das Ziel dieser alternativen Methode war es, die Zell-Viabilität zu bewahren und gleichzeitig einen erneuten Versuch zu unternehmen, Myelin- und Zelltrümmer effektiv aus der Zellsuspension zu entfernen. Diese entwickelte alternative Vorgehensweise ermöglichte trotz initial fehlerhafter Gradienten-Schichtung eine effektive Entfernung von Myelin und Zelltrümmern. Zudem erhöhte diese Modifikation die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Experimente erheblich.

3.2.2 Erfolgreiche Implementierung optimierter Methoden: Ergebnisse der Zellisolation nach *Troubleshooting*

Nach der Implementierung der in **Abschnitt 3.2.1** aufgeführten gezielten Modifikationen und Optimierungen des Zellisolutionsprotokolls, konnten in den darauffolgenden Experimenten signifikant verbesserte Reinheiten der Einzelzellsuspensionen nachgewiesen werden. Die **Abbildungen 8-11** veranschaulichen die detaillierten *FACS-Panels*, die zur Analyse, der mittels MACS isolierten Einzelzellsuspensionen von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen verwendet wurden.

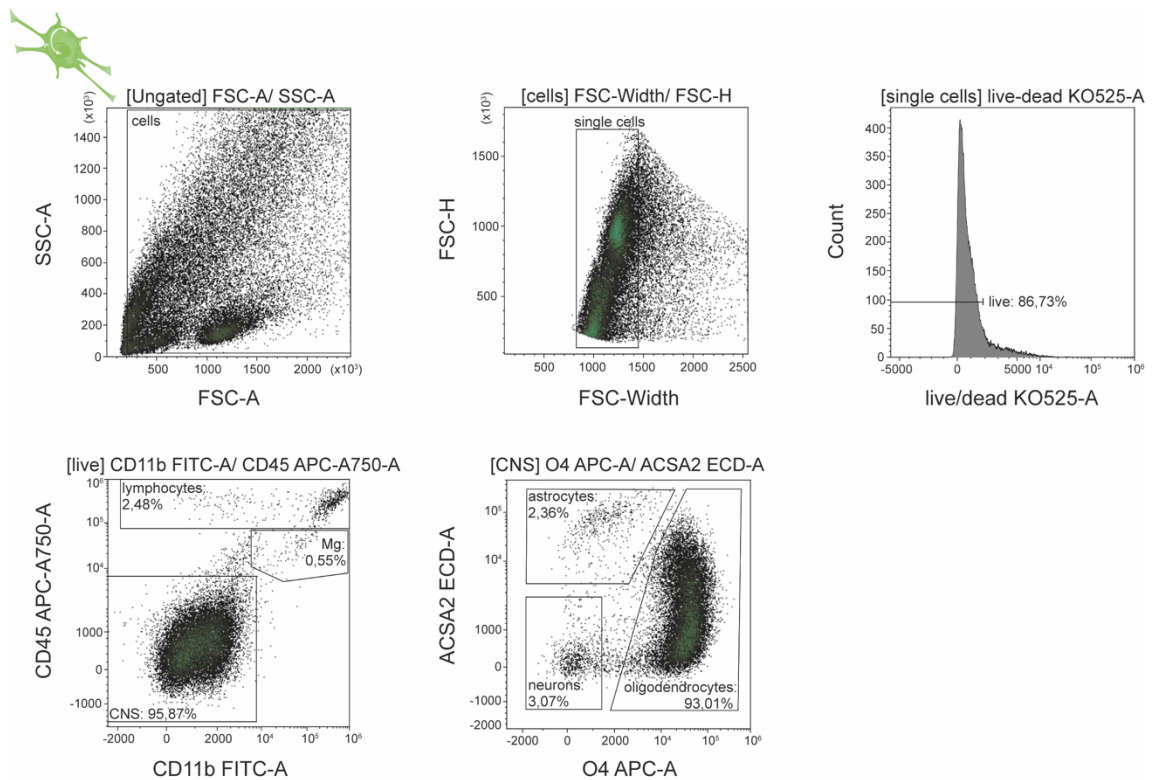


Abb. 8 Durchflusszytometrische Analysen von Oligodendrozyten, die aus adulten Mäusen isoliert wurden. Abkürzungen: ACSA- 2= Astrozyten-Oberflächenantigen-2; APC = Allophycocyanin; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; ECD = energy-coupled dye; FACS = Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting; FITC-A= Fluoresceinisothiocyanat; FSC-A = Forwardscatter Area; FSC-H = Forwardscatter Height; FSC-W = Forwardscatter Width; MACS = Magnetisch-aktivierte Zellsortierung; Mg = Mikroglia; O4 = Oligodendrozytenmarker 4; SSC-A = Sidescatter Area; ZNS = Zentrales Nervensystem. Repräsentative Reinheitsanalyse von Oligodendrozyten, die aus adulten Mäusen unter Verwendung von anti-O4-MicroBeads mittels MACS isoliert wurden. Die obere Reihe des FACS-Panels zeigt Punktdiagramme vor der Zellsortierung. Nach der Auswahl von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W) wurden verbliebene Mikroglia und Lymphozyten in der Zellsuspension identifiziert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Oligodendrozyten innerhalb der ZNS-Zellpopulation anhand ihrer O4-Expression.

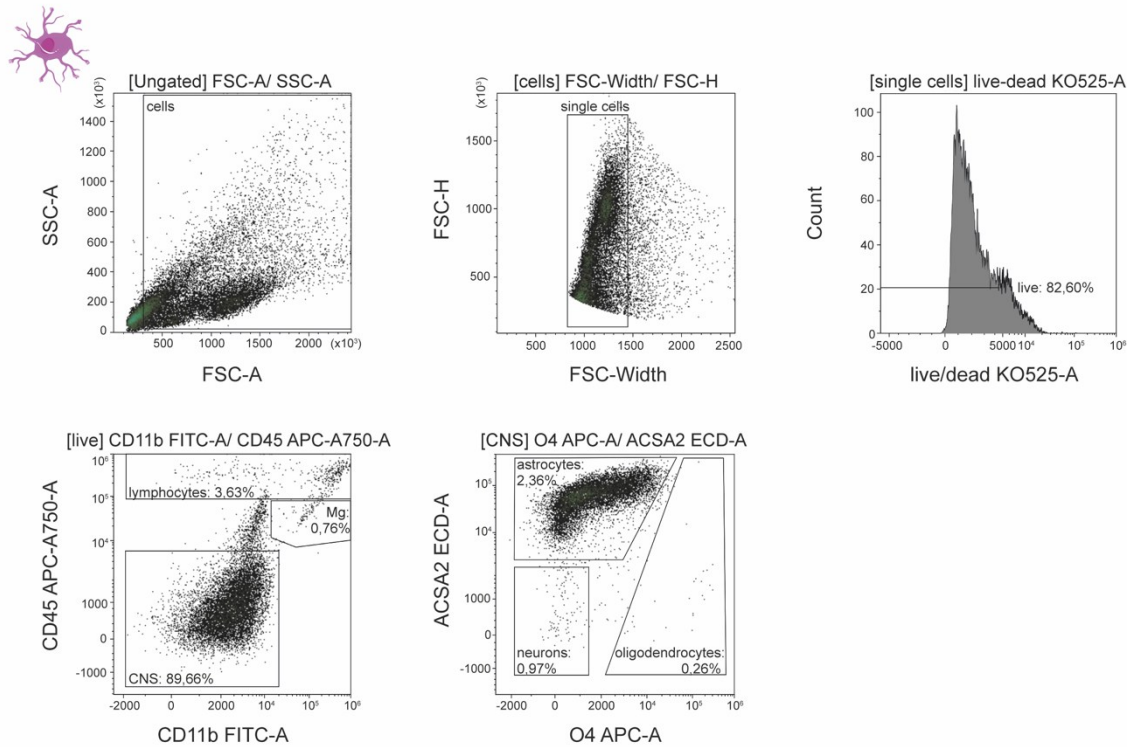


Abb. 9 Durchflusszytometrische Analysen von Astrozyten, die aus adulten Mäusen isoliert wurden.
 Abkürzungen: ACSA-2 = Astrozyten-Oberflächenantigen-2; APC = Allophycocyanin; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; ECD = energy-coupled dye; FACS = Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting; FITC-A = Fluoresceinisothiocyanat; FSC-A = Forwardscatter Area; FSC-H = Forwardscatter Height; FSC-W = Forwardscatter Width; MACS = Magnetisch-aktivierte Zellsortierung; Mg = Mikroglia; O4 = Oligodendrozytenmarker 4; SSC-A = Sidescatter Area; ZNS = Zentrales Nervensystem. Repräsentative Reinheitsanalyse von Astrozyten nach Isolation aus dem Negativdurchfluss von Oligodendrozyten aus adulten Mäusen mittels anti-ACSA-2-MicroBeads. Die obere Reihe des FACS-Panels zeigt Punktdiagramme vor der Zellsortierung. Nach der Auswahl von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W) wurden verbliebene Mikroglia und Lymphozyten in der Zellsuspension identifiziert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Astrozyten innerhalb der ZNS-Zellpopulation anhand ihrer ACSA-2-Expression.

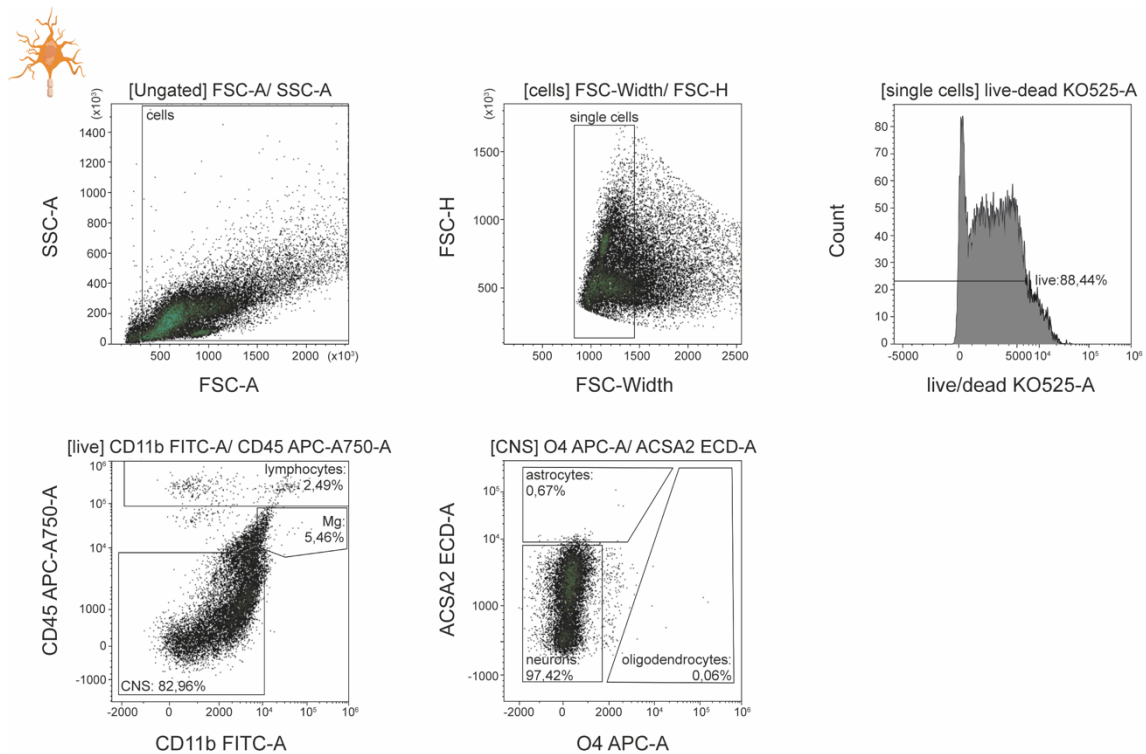


Abb. 10 Durchflusszytometrische Analysen von Neuronen, die aus adulten Mäusen isoliert wurden. Abkürzungen: ACSA-2 = Astrozyten-Oberflächenantigen-2; APC = Allophycocyanin; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; ECD = energy-coupled dye; FACS = Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting; FITC-A = Fluoresceinisothiocyanat; FSC-A = Forwardscatter Area; FSC-H= Forwardscatter Height; FSC-W= Forwardscatter Width; MACS = Magnetisch-aktivierte Zellsortierung; Mg = Mikroglia; O4 = Oligodendrozytenmarker 4; SSC-A = Sidescatter Area; ZNS= Zentrales Nervensystem. Repräsentative Reinheitsanalyse von Neuronen nach Isolation aus dem Negativ-Durchfluss von Oligodendrozyten aus adulten Mäusen. Die Isolation der Neurone erfolgte durch die Depletion aller nicht-neuronalen Zellen mit biotinylierten Antikörpern und anti-Biotin-MicroBeads. Nach der Auswahl von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W) wurden verbliebene Mikroglia und Lymphozyten in der Zellsuspension identifiziert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Neurone innerhalb der ZNS-Zellpopulation anhand ihrer fehlenden O4- bzw. ACSA-2-Expression.

Neurone wurden durch ihre fehlende O4- bzw. ACSA-2-Expression definiert (**Abbildung 10**). Darüber hinaus wurde eine nachfolgende intrazelluläre Färbung mit einem NeuN-Antikörper als Neuronen-spezifischer Kernmarker ergänzend zum extrazellulären Färbeprotokoll durchgeführt, um eine zusätzliche Reinheitskontrolle der neuronalen Zellsuspension zu ermöglichen (**Abbildung 11**). Zur Bestimmung des Schwellenwertes, ab wann die NeuN-Färbung als positiv zu bewerten ist, wurden *Fluorescence Minus One*-Kontrollen eingesetzt.

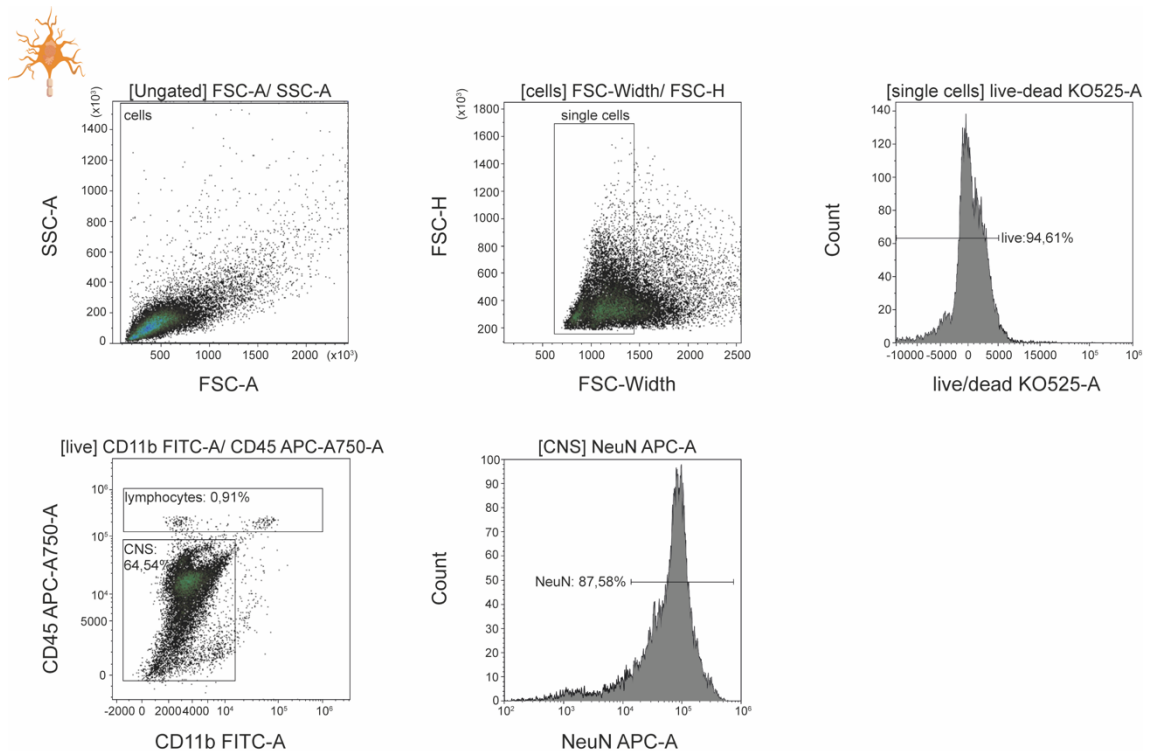


Abb. 11 Durchflusszytometrie-Analyse von aus adulten Mäusen gewonnenen Neuronen nach NeuN-Markierung. Abkürzungen: APC = Allophycocyanin; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; FACS = Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting; FITC-A= Fluoresceinisothiocyanat; FSC-A = Forwardscatter Area; FSC-H = Forwardscatter Height; FSC-W = Forwardscatter Width; MACS = Magnetisch-aktivierte Zellsortierung; Mg = Mikroglia; O4 = Oligodendrozytenmarker 4; NeuN = RNA-Bindungsprotein Fox-1-Homolog 3; SSC-A = Sidescatter Area; ZNS = Zentrales Nervensystem. Exemplarische Reinheitsanalyse von Neuronen, die mittels Depletion aller nicht-neuronalen Zellen durch Markierung mit biotinylierten Antikörpern und anti-Biotin-MicroBeads aus adulten Mäusen isoliert wurden. NeuN wurde als Neuronen-spezifischer Kernmarker ergänzend zum extrazellulären Färbeprotokoll eingesetzt, um eine zusätzliche Reinheitskontrolle der neuronalen Zellsuspension zu ermöglichen. Nach der Auswahl von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W) wurden verbliebene Lymphozyten in der Zellsuspension identifiziert und von der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen. Innerhalb der neuronalen Zellsuspension zeigten 87,58 % der isolierten Neuronen eine NeuN-positive Färbung.

In Folge gelang es, durchschnittliche Reinheiten der Einzelzellsuspensionen von $91,16\% \pm 2\%$ für Mikroglia, $90,5\% \pm 2,12\%$ für Oligodendrozyten, $83,91\% \pm 2,15\%$ für Astrozyten und $89,58\% \pm 2,5\%$ für Neurone bei naiven Replikaten zu erzielen (**Abbildung 12**). Korrespondierend dazu konnten in den EAE-Mäusen durchschnittliche Reinheiten von $87,97\% \pm 2,45\%$ für Oligodendrozyten, $92,16\% \pm 0,95\%$ für Mikroglia, $83,74\% \pm 1,15\%$ für Astrozyten und $76,68\% \pm 4,84\%$ für Neurone erreicht werden (**Abbildung 12**).

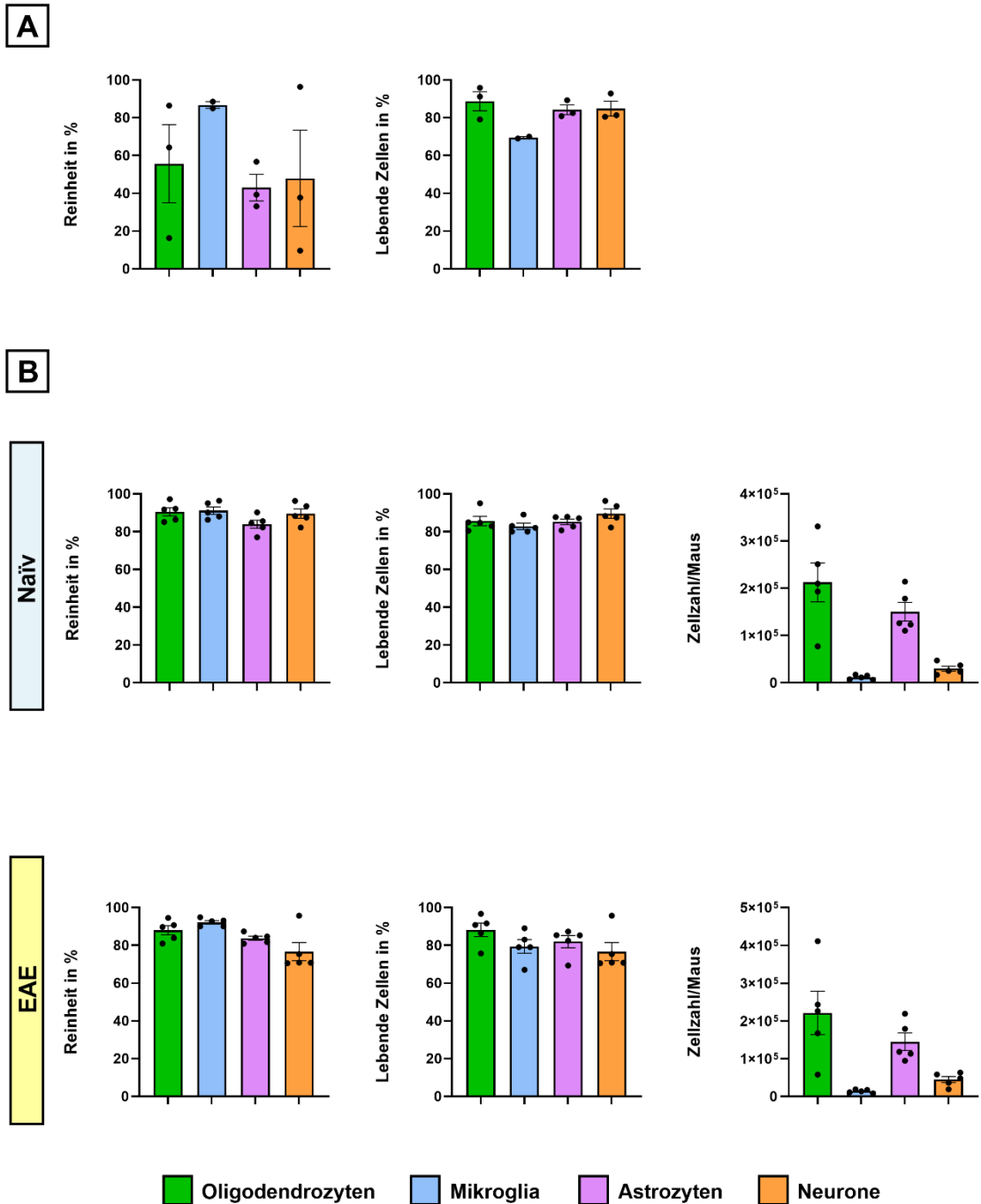


Abb. 12 Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen der Einzelzellsuspensionen vor und nach Optimierung des Zellisolationsprotokolls. Abkürzungen: EAE = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; MACS = Magnetisch-aktivierte Zellsortierung; SEM = Standardfehler des Mittelwertes. **(A)** Durchschnittliche Reinheits- sowie Viabilitätsanalysen der mittels MACS-isolierten Einzelzellsuspensionen während der Etablierungsphase (n=3). **(B)** Durchschnittliche Reinheits- und Viabilitätsanalysen der mittels MACS isolierten Einzelzellsuspensionen sowie durchschnittlich isolierte Zellzahl pro Maus aus EAE- und naïven Mäusen nach Optimierung des Zellisolationsprotokolls. Die Balkendiagramme zeigen jeweils die durchschnittliche Reinheit, Lebensfähigkeit und isolierte Zellzahl pro Maus für jeden isolierten Zelltyp. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Für jeden Zelltyp wurden fünf biologische Replikate sowohl für die naïven als auch die EAE-Mäuse gemessen.

Trotz der mechanischen Belastung durch das MACS- und FACS-Verfahren, belief sich die durchschnittliche Viabilität aller isolierten ZNS-residenten Zelltypen auf 85,8% bei naïven Mäusen bzw. 81,6% bei den EAE-Replikaten. Diese Ergebnisse bestätigten ebenfalls die Annahme, dass eine parallele Isolation von Astrozyten und Neuronen im Anschluss an die Isolation der Oligodendrozyten zu keiner signifikanten Reduktion der Zell-Viabilität führte (**Abbildung 12**).

Pro naïver Maus konnten durchschnittlich $2,12 \times 10^5 \pm 0,41 \times 10^5$ Oligodendrozyten, $0,11 \times 10^5 \pm 0,02 \times 10^5$ Mikroglia, $1,50 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ Astrozyten und $0,30 \times 10^5 \pm 0,05 \times 10^5$ Neurone aus dem ZNS-Homogenat isoliert werden (**Abbildung 12**).

Die Isolation der ZNS-residenten Zelltypen aus EAE-Mäusen erfolgte während des Krankheitsmaximums, das heißt 16 Tage nach der Immunisierung.

Bei der Aufarbeitung der EAE-Mäuse wurden pro Maus durchschnittlich $2,21 \times 10^5 \pm 0,58 \times 10^5$ Oligodendrozyten, $0,14 \times 10^5 \pm 0,02 \times 10^5$ Mikroglia, $1,45 \times 10^5 \pm 0,23 \times 10^5$ Astrozyten und $0,45 \times 10^5 \pm 0,08 \times 10^5$ Neurone aus dem ZNS-Homogenat isoliert (**Abbildung 12**).

Das vorliegende Zellisolutionsprotokoll schafft somit die Grundlage für eine zuverlässige Analyse zellulärer Interaktionen sowie den präzisen Vergleich molekularer und biochemischer Parameter zwischen den einzelnen Zelltypen. Durch die hier beschriebene Methode werden Artefakte, die durch die Verwendung unterschiedlicher Mausproben zur Isolation der Zelltypen entstehen könnten, signifikant reduziert, wodurch Experimente mit hoher Reproduzierbarkeit ermöglicht werden. Darüber hinaus wird die Anzahl der Versuchstiere im Sinne des 3R-Prinzips und gemäß dem Tierschutzgesetz minimiert.

Zusammenfassend kann in diesem zweiten Ergebnisteil festgehalten werden, dass das hier dargelegte Protokoll eine höchst effiziente Methode zur simultanen Isolation aller ZNS-residenten Zelltypen aus einem murinen ZNS-Replikat darstellt.

Dieses Zellisolationsprotokoll eröffnet die Möglichkeit, neuro-gliale Zellinteraktionen und neuroinflammatorische Signalkaskaden *ex vivo* aus einer einzelnen ZNS-Zellsuspension zu untersuchen. Darüber hinaus können verschiedene ZNS-residente Zelltypen in unterschiedlichen Stadien des EAE-Verlaufes in Bezug auf relevante biochemische Signaltransduktionswege und zelluläre Interaktionen untersucht werden. Aufgrund der hohen Reinheit und Viabilität der generierten Einzelzellsuspensionen ermöglicht dieses Protokoll darüber hinaus die Durchführung umfassender Multi-*Omic*s-Analysen.

3.3 Etablierung durchflusszytometrischer Analysen der peripheren Immunzellen

Um die zugrundeliegende Pathophysiologie der Neuroinflammation und der daran beteiligten Zelltypen besser verstehen zu können, ist es von großer Bedeutung neben den ZNS-residenten Zellen ebenfalls Analysen der peripheren Immunzellen durchzuführen. Dieser dritte Ergebnisteil widmet sich der Etablierung eines ergänzenden Immunzellpanels für die Durchflusszytometrie in das ZNS immigrierter Immunzellen, die aus demselben ZNS-Replikat stammen, aus dem zuvor die ZNS-residenten Zellen isoliert wurden (**Tabelle 11**).

Immunzellpanel (extrazelluläres Färbeprotokoll)		
Cytoflex Kanal	FACS-Antikörper	Finale Konzentration
FITC GFP blue	CD11b-FITC (clone M1/70)	1:50
PC7 yellow green	CD19-PE/Cy7 (clone 6D5)	1:100
APC red	CD25-APC (clone PC61)	1:100
APC-A700 red	CD8a-AF700 (clone 53-67)	1:100
APC/Cy7	CD45 APC/Cy7 (clone 30-F11)	1:200
PB450 violet	CD4-BV421 (clone RM4-5)	1:100
KO525 violet	FVD506	1:100.000
	CD16/32	1 µg pro 10 ⁶ Zellen

Tabelle 11. Durchflusszytometrisches Immunzellpanel (extrazelluläres Färbeprotokoll). Abkürzungen: APC = Allophycocyanin; BV = engl. brilliant violet; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; Cy = Cyanin 7; FACS = Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting; FITC = Fluoresceinisothiocyanat; FVD = engl. fixable viability dye; GFP = Grün fluoreszierendes Protein; PB = engl. pacific blue; PC7 = PE-Cyanin-7-Farbstoff; PE = Phycoerythrin; ZNS = Zentrales Nervensystem. Immunzellpanel zur durchflusszytometrischen Analyse peripherer, immigrierter Immunzellen, die aus demselben ZNS-Replikat stammen, aus dem zuvor die ZNS-residenten Zellen isoliert wurden. Die Tabelle bietet eine Übersicht über die verwendeten Antikörper, die entsprechenden Farbstoffe sowie deren Konzentrationen.

Die durchflusszytometrische Analyse der peripheren Immunzellen erfolgte im Anschluss an die Zellisolation der ZNS-residenten Zellen. Zu Beginn wurde der negative Durchfluss der Astrozyten mit dem positiven Durchfluss der Neuronen in einem Falcon gepoolt. Diese Zellsuspension war infolgedessen nahezu frei von einer Kontamination durch ZNS-residenten Zellen. Die Analyse dieser gepoolten Zellsuspension erfolgte unter der Annahme, dass alle relevanten Immunzell-Populationen der Peripherie, die im Rahmen der Neuroinflammation in das ZNS infiltrierten, in dieser Probe enthalten waren.

Nach der Selektion von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W) wurden verbliebene CD45^{intermediate}CD11b^{high}-Mikroglia identifiziert und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Analysen des Immunzellpanels umfassten somit alle CD45⁺-Zellen im ZNS, die aus demselben Replikat stammten, aus dem zuvor die ZNS-residenten Zellen isoliert wurden.

Die Differenzierung von Makrophagen und Monozyten erfolgte anhand der Oberflächenmarker CD11b und CD45, angefärbt mit FITC und APC-750. Die Darstellung im CD11b FITC-A/ CD45 APC-A750-Plot erlaubte die Identifizierung und Quantifizierung der CD11b⁺-Zellen innerhalb der CD45⁺-Population (**Abbildungen 13, 14**).

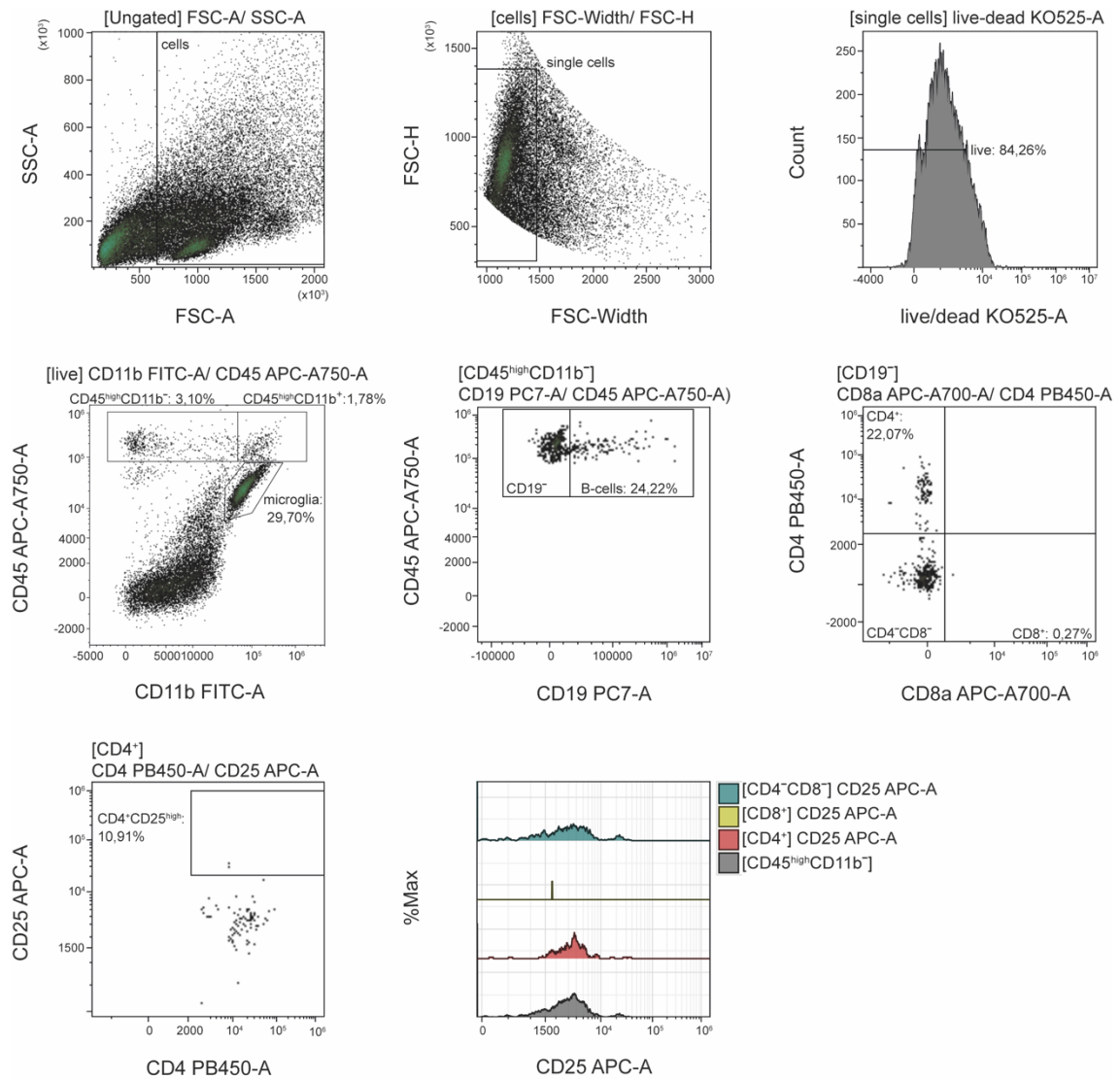


Abb. 13 Immunzellpanel zur durchflusszytometrische Analyse peripherer Immunzellen aus einer ZNS-Zellsuspension von naiven Mäusen. Abkürzungen: APC = Allophycocyanin; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; FITC-A = Fluoresceinisothiocyanat; FSC-A = Forwardscatter Area; FSC-H = Forwardscatter Height; FSC-W = Forwardscatter Width; Mg = Mikroglia; PB = Pacific Blue; PC7 = PE-Cyanin-7-Farbstoff; SSC-A = Sidescatter Area, Tregs = regulatorische T-Zellen; ZNS = Zentrales Nervensystem. Exemplarische durchflusszytometrische Analyse peripherer Immunzellen aus einer ZNS-Zellsuspension von naiven Mäusen. Die durchflusszytometrische Analyse der peripheren Immunzellen erfolgte im Anschluss an die Zellisolation der ZNS-residenten Zellen. Hierfür wurde der Positiv-Durchfluss der Neuronen mit dem Negativ-Durchfluss der Astrozyten in einem Falcon gepoolt. Nach der Selektion von lebenden (SSC-A/ FCS-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W) wurden verbliebene CD45^{int}CD11b^{high}-Mikroglia identifiziert und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die anschließenden Analysen des Immunzellpanels umfassten alle CD45⁺-Zellen im ZNS, die aus demselben Replikat stammten, aus dem zuvor die ZNS-residenten Zellen isoliert wurden. Makrophagen und Monozyten wurden hierfür anhand ihrer CD45- und CD11b-Expression identifiziert. Die Charakterisierung von B-Lymphozyten erfolgte durch deren CD19-Expression innerhalb der CD45⁺CD11b⁻-Zellpopulation. T-Lymphozyten wurden durch eine fehlende Expression von CD19 innerhalb der CD45⁺CD11b⁻-Population klassifiziert. Zur weiteren Differenzierung der T-Zellpopulation wurden die Oberflächenmarker CD4 und CD8a verwendet. Für eine detaillierte Analyse der T-Zellaktivierungsmuster wurde die CD25-Expression auf unterschiedlichen T-Zellpopulationen gemessen. Dabei wurden CD4⁺CD25⁺-T-Zellen in dieser Arbeit als Tregs charakterisiert.

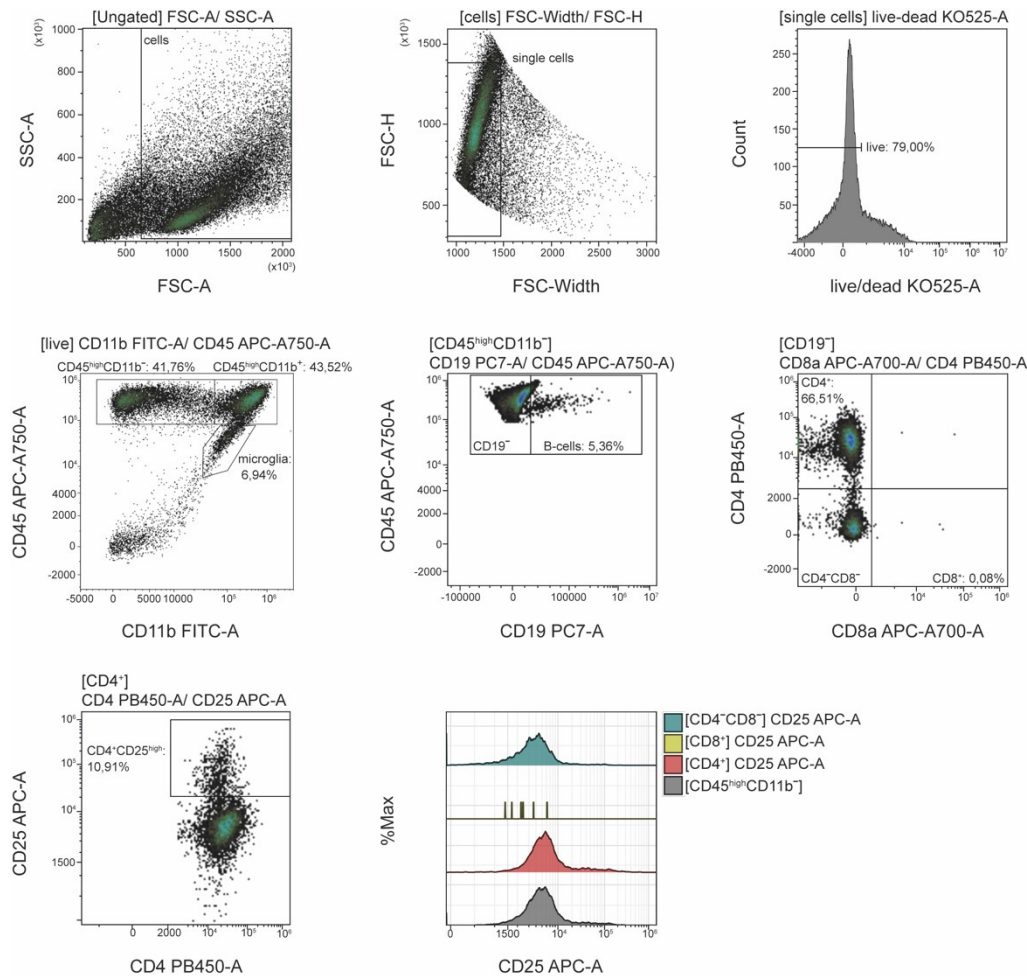


Abb. 14 Immunzellpanel zur durchflusszytometrische Analyse peripherer Immunzellen aus einer ZNS-Zellsuspension von EAE-Mäusen. Abkürzungen: APC = Allophycocyanin; CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; FITC-A = Fluoresceinisothiocyanat; FSC-A = Forwardscatter Area; FSC-H = Forwardscatter Height; FSC-W = Forwardscatter Width; Mg = Mikroglia; PB = Pacific Blue; PC7 = PE-Cyanin-7-Farbstoff; SSC-A = Sidescatter Area, ZNS = Zentrales Nervensystem. Exemplarische durchflusszytometrische Analyse peripherer Immunzellen aus einer ZNS-Zellsuspension von EAE-Mäusen. Die durchflusszytometrische Analyse der peripheren Immunzellen erfolgte im Anschluss an die Zellisolation der ZNS-residenten Zellen. Hierfür wurde der Positiv-Durchfluss der Neuronen mit dem Negativ-Durchfluss der Astrozyten in einem Falcon gepoolt. Nach der Selektion von lebenden (SSC-A/ FSC-A) und Einzelzellen (FSC-H/ FSC-W) wurden verbliebene CD45^{int} CD11b^{high}-Mikroglia identifiziert und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die anschließenden Analysen des Immunzellpanels umfassten alle CD45⁺-Zellen im ZNS, die aus demselben Replikat stammten, aus dem zuvor die ZNS-residenten Zellen isoliert wurden. Makrophagen und Monozyten wurden hierfür anhand ihrer CD45- und CD11b-Expression identifiziert. Die Charakterisierung von B-Lymphozyten erfolgte durch ihre CD19-Expression innerhalb der CD45⁺CD11b⁻-Zellpopulation. T-Lymphozyten wurden durch eine fehlende Expression von CD19 innerhalb der CD45⁺CD11b⁻-Population klassifiziert. Zur weiteren Differenzierung der T-Zellpopulation wurden die Oberflächenmarker CD4 und CD8a verwendet. Für eine detaillierte Analyse der T-Zellaktivierungsmuster wurde die CD25-Expression auf unterschiedlichen T-Zellpopulationen gemessen. Dabei wurden CD4⁺CD25⁺-T-Zellen in dieser Arbeit als Tregs charakterisiert.

Die Definition der Lymphozyten-Population basierte auf der Expression von CD45 sowie einem fehlenden CD11b-Signal. Innerhalb dieser CD45⁺CD11b⁻-Population erfolgte eine Charakterisierung der B-Lymphozyten anhand ihrer

Expression von CD19. Dementsprechend wurden T-Lymphozyten innerhalb derselben CD45⁺CD11b⁻-Population durch das Fehlen der CD19-Expression klassifiziert.

Zur weiteren Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen wurden die Oberflächenmarker CD4 und CD8a verwendet. Die Darstellung dieser Marker im CD8a APC-A700-A / CD4 PB450-A-Plot ermöglichte eine Unterscheidung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen (**Abbildungen 13, 14**). Innerhalb der CD4⁺-Population wurden regulatorische T-Lymphozyten (Tregs) durch die zusätzliche Expression des CD25-Markers charakterisiert.

Für die detaillierte Untersuchung der T-Zell-Aktivierung im Kontext der EAE wurde zudem die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf verschiedenen T-Zell-Subpopulationen gemessen, darunter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, doppelt-negative T-Zellen sowie CD45^{high} CD11b⁻-Lymphozyten.

Eine vollständige Übersicht des entwickelten FACS-Panels wird in den **Abbildungen 13 und 14** dargestellt.

Das Ziel dieser FACS-Analyse war es, periphere Immunzellen in naïven bzw. EAE-Mäusen zu detektieren und hinsichtlich ihrer Verteilung zu analysieren. In diesem Zusammenhang wurde jeweils der Anteil der unterschiedlichen Zellpopulationen an der Gesamtheit der CD45⁺-Zellen im ZNS bestimmt.

Unter physiologischen Bedingungen konnte dabei ein durchschnittlicher Anteil von 3% ± 0,43% der CD45^{high}CD11b⁺-Zellen, 1,12% ± 0,25% der B-Lymphozyten, 1,42% ± 0,33% der CD4⁺-T-Lymphozyten, 0,04% ± 0,02% der CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen und 0,02% ± 0,02% der CD4⁺CD25^{high}-regulatorischen T-Zellen in den ZNS-Zellsuspensionen nachgewiesen werden (**Abbildung 15**).

Im Gegensatz dazu wurden im Kontext der EAE zum Zeitpunkt des Krankheitsmaximums an Tag 16 durchschnittlich 53,20% ± 3,16% der CD45^{high} CD11b⁺-Zellen, 1,20% ± 0,55% der B-Lymphozyten, 19,97% ± 4,64% der CD4⁺-T-Lymphozyten, 2,13% ± 0,463% der CD4⁺CD25^{high}-regulatorischen T-Zellen, jedoch keine CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen detektiert (**Abbildung 15**). Diese

experimentellen Daten zeigten somit eine signifikante Zunahme von Makrophagen, Monozyten, CD4⁺-T-Lymphozyten als auch der CD4⁺CD25⁺-Tregs im ZNS bei EAE-induzierter Neuroinflammation im Vergleich zu naïven Mäusen.

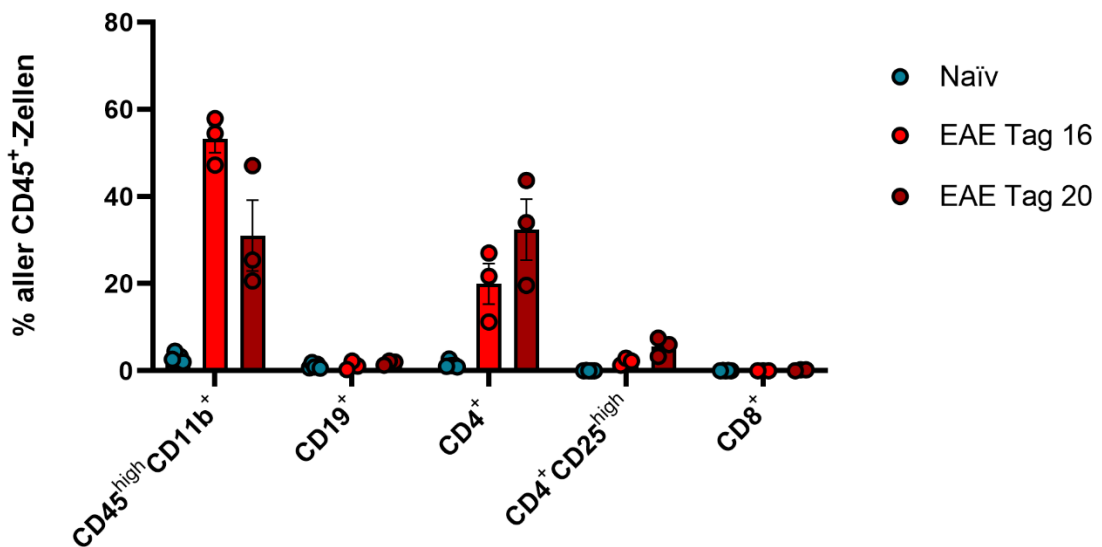


Abb. 15 Verteilung der peripheren Immunzell-Populationen in Bezug auf die Gesamtheit der CD45⁺-Zellen im ZNS während des EAE-Verlaufs sowie bei naïven Mäusen. Abkürzungen: CD = Unterscheidungsmerkmale, engl. cluster of differentiation; EAE = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; Tregs = regulatorische T-Zellen; ZNS = Zentrales Nervensystem. Die durchflusszytometrische Analyse der peripheren Immunzellen erfolgte im Anschluss an die Zellisolation der ZNS-residenten Zellen. Hierfür wurde der Positiv-Durchfluss der Neuronen mit dem Negativ-Durchfluss der Astrozyten in einem Falcon gepoolt. Zunächst wurden verbliebende CD45^{int} CD11b^{high}-Mikroglia identifiziert und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. In der darauffolgenden Untersuchung der ZNS-Zellsuspension wurde jeweils der Anteil peripherer Immunzellen an der Gesamtheit aller CD45⁺-Zellen bestimmt. Die Identifizierung und Charakterisierung der Zelltypen erfolgte anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker-Expression. Die experimentellen Daten zeigten eine signifikante Zunahme der CD45^{high}CD11b⁺-Zellen, der CD4⁺-T-Lymphozyten als auch der CD4⁺CD25⁺-Tregs im ZNS bei EAE-induzierter Neuroinflammation im Vergleich zu naïven Mäusen. Zudem konnte eine Reduktion des Anteils der CD45^{high}CD11b⁺-Zellen sowie eine relative Zunahme der CD4⁺-T-Lymphozyten und der CD4⁺CD25⁺-Tregs im ZNS an Tag 20 im Vergleich zu Tag 16 des EAE-Verlaufs detektiert werden. Die experimentellen Daten werden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Es wurden jeweils 3 Replikate von EAE- und 5 Replikate von naïven Mäusen pro Zelltyp gemessen.

Des Weiteren wurde eine vergleichende Analyse der peripheren Immunzellverteilung im ZNS zum Zeitpunkt des Krankheitsmaximums an Tag 16 mit derer zu Beginn der Remissionsphase an Tag 20 durchgeführt.

An Tag 20 des EAE-Verlaufs wurden durchschnittlich 31,03% ± 8,15% der CD45^{high} CD11b⁺-Zellen, 1,83% ± 0,27% der B-Lymphozyten, 32,43% ± 7,00% der CD4⁺-T-Lymphozyten, 5,60% ± 1,23% der CD4⁺CD25^{high}- regulatorischen T-

Zellen sowie $0,13\% \pm 0,07\%$ der CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen (**Abbildung 15**).

Im Rahmen der vorliegenden Analyse konnte somit ein Unterschied in der Immunzellverteilung im ZNS zwischen Tag 16 und Tag 20 festgestellt werden, welcher sich durch einen reduzierten Anteil an CD45^{high}CD11b⁺ -Zellen sowie eine relative Zunahme von CD4⁺-T-Lymphozyten und CD4⁺CD25⁺-Tregs an Tag 20 auszeichnete.

Zusammenfassend wurde in diesem dritten Ergebnisteil eine durchflusszytometrische Methode zur Analyse von ZNS-Präparaten unter physiologischen als auch inflammatorischen Bedingungen ergänzend zum bestehenden Zellisolationsprotokoll entwickelt und etabliert. Das in dieser Arbeit vorgestellte Immunzellpanel ermöglicht eine synchrone phänotypische Charakterisierung der von peripher immigrierten Immunzellen aus demselben ZNS-Replikat, aus dem zuvor die ZNS-residenten Zellen isoliert wurden. Zudem konnten signifikante Unterschiede in der Häufung und Verteilung der peripheren Immunzellen im ZNS sowohl zwischen naiven und EAE-Replikaten als auch im Verlauf der EAE nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Angesichts der zunehmenden Erkenntnisse über die bedeutende Rolle ZNS-residenter Zellen in der Krankheitsätiologie und dem Verlauf der MS ist es von entscheidender Bedeutung, präzise und reproduzierbare Zellisolutionsprotokolle zu entwickeln, die die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und potenzieller therapeutischer Zielstrukturen unterstützen.

Obwohl bereits eine Auswahl etablierter Zellisolutionsprotokolle zur Isolation ZNS-residenter Zellen vorhanden ist, sind diese meist darauf ausgelegt, jeden Zelltyp einzeln zu isolieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine bestehende Methode zur simultanen Isolation von Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Neuronen aus einem ZNS-Replikat an einem neuen Standort systematisch etabliert, optimiert und validiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, ausreichende Reinheiten für die nachfolgende Durchführung von Multi-Omics-Analysen der verschiedenen ZNS-residenten Zelltypen zu erreichen sowie in der Integration eines neuen *FACS-Panels* zur Durchflusszytometrie immigrierter Immunzellen desselben ZNS-Replikates. Die Zusammenführung der Analyse dieser beiden wichtigen Kompartimente in einem Protokoll ermöglicht ein umfassenderes Verständnis der MS. Darüber hinaus erwies sich das Protokoll sowohl bei naiven als auch bei EAE-Tieren als zielführend und durchführbar.

Im Folgenden werden die methodische Vorgehensweise, der theoretische Bezugsrahmen sowie die erzielten Fortschritte und deren wissenschaftliche Relevanz diskutiert und im Kontext bestehender Literatur betrachtet, um die Implikationen für zukünftige Forschungsansätze und klinische Anwendungen herauszuarbeiten.

4.1 EAE als Forschungsmodell für die Multiple Sklerose: Relevanz und Limitationen

Auch wenn das EAE-Modell einen etablierten Standard zur Erforschung der MS-Pathologie darstellt, weist das Immunsystem von Mensch und Maus sowohl

geno- als auch phänotypische Unterschiede auf ^{81,85}. Im Gegensatz zu der bislang nur unvollständig geklärten Pathophysiologie der MS, erfolgt die EAE-Induktion aktiv durch das MOG ³⁵⁻⁵⁵ -Antigen. Dieses induziert eine periphere Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen, welche das ZNS über die der BHS infiltrieren ^{80,98}.

Die Autoimmunreaktion in der EAE beruht primär auf einer durch CD4⁺-T-Zell-vermittelten Immunreaktion, die mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und IL-17 einhergeht ^{8,85}. CD8⁺-T-Lymphozyten sowie B-Lymphozyten spielen in diesem Tiermodell eine nachrangige Rolle ^{85,98}. Eine weitere Abweichung in der Krankheitsätiologie zum menschlichen Organismus ist die zusätzliche Injektion von Ptx in die Maus, die die klonale Expansion von T-Zellen und eine Permeabilitätserhöhung der BHS bewirkt ⁹.

Im Gegensatz dazu zeigten zahlreiche humane Studien eine Dominanz von CD8⁺-T-Lymphozyten gegenüber CD4⁺-Zellen in Hirnregionen von MS-Patient:innen mit entzündlichen Zellinfiltraten ^{99,100}. Neuropathologische als auch experimentelle Daten belegten zudem, dass die anhaltende CD8⁺-T-Zell-vermittelte zytotoxische Aktivität, in Kombination mit oxidativem Stress und inflammatorischen Zytokinen, einen Hauptfaktor für die neuronale Schädigung bei MS darstellt ¹⁰¹. Dieser unzureichend repräsentierte Aspekt der MS-Pathophysiologie in der EAE stellt eine erhebliche Einschränkung für die umfassende Untersuchung der Erkrankung im Mausmodell und die Interpretation von Forschungsergebnissen dar.

Die klinische Manifestationsform der EAE zeigt sich innerhalb weniger Tage nach Immunisierung durch eine aufsteigende Lähmung der Gliedmaßen, einem reduzierten Allgemeinzustand und Gewichtsverlust ^{102,103}. Die Ausprägung der Symptome sowie der Krankheitsverlauf variieren in Abhängigkeit von der Art des EAE-Modelles ⁹. Charakteristisch für die EAE ist eine starke Demyelinisierung des Rückenmarks, wobei Sehnerv, Großhirnrinde oder Kleinhirn oftmals nur in geringem Maß betroffen sind ⁹⁸.

Im Gegensatz dazu zeigt sich das klinische Erscheinungsbild der multifokalen MS in differenzierterer Form: Die Ausprägung der klinischen Symptome ist dabei individuell verschieden und durch den betroffenen ZNS-Lokus bedingt ⁶. Der Großteil der demyelinisierenden Prozesse findet sich im Großhirn und im Kleinhirn ⁹⁸.

Die Mehrheit der MS-Fälle zeigt sich als langfristig chronisch-progrediente Form ⁵. Obwohl es zu teilweisen oder vollständigen Rückbildungen einzelner Krankheitsschübe kommen kann, zeigt die Erkrankung bei den meisten Patient:innen ein fortschreitendes klinisches Bild. Im Gegensatz zum monophasischen Verlauf der EAE, bei dem in der Remissionsphase häufig eine vollständige Symptomrückbildung beobachtet wird, ist dies bei dem Großteil der MS-Patient:innen selten der Fall ⁵. Der Krankheitsverlauf der MS ist stattdessen durch rezidivierende Schübe und eine kontinuierliche Progression gekennzeichnet, bedingt durch die anhaltende Krankheitsaktivität. Sobald das Ausmaß der zentralen Läsionen die Fähigkeit des ZNS zur funktionellen Kompensation übersteigt, wird die MS klinisch progressiv ¹⁰⁴. Infolgedessen leiden viele MS-Patient:innen im Krankheitsverlauf unter bleibenden neurologischen Defiziten, die langfristig zu einer kumulativen Behinderung führen ¹⁰⁴.

Zusammenfassend stellt die EAE ein wertvolles Krankheitsmodell dar, um die Kernaspekte der MS wie Demyelinisierung, Neuroinflammation und Neurodegeneration vertieft zu analysieren. Trotz immunologischer Differenzen zur MS bietet dieses Modell aktuell eine der besten Möglichkeiten, diese prototypische neuroinflammatorische Autoimmunerkrankung mit ihren systemischen Dimensionen zu untersuchen. Ein kritisches Hinterfragen der Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen, die auf EAE-Experimenten basieren, ist dabei unerlässlich.

4.2 Methodische Vorgehensweise

Durch die in **Abschnitt 3.1** beschriebenen Modifikationen und gezielten Optimierungen bei der Etablierung des hier verwendeten EAE-Modells konnte die Inzidenz von initial durchschnittlich $22,22 \pm 11,28\%$ auf $84,26\% \pm 4,08\%$ gesteigert werden. Die erzielte Steigerung der Inzidenz kann als eine deutliche Verbesserung betrachtet werden, erreicht jedoch nicht das theoretische Optimum von 100%, wie von Huntemann *et al.* (2022) berichtet.

Die vollständige Standardisierung biologischer Modelle stellt häufig eine Herausforderung dar, da selbst geringfügige Abweichungen im Protokoll oder in den Haltungsbedingungen der Tiere erhebliche Auswirkungen auf die Inzidenz haben können. Trotz dieser Einschränkungen gewährleistete die erreichte Inzidenz eine ausreichend hohe Anzahl erkrankter Tiere und bildete somit eine robuste Grundlage für die geplanten Zellisoliationsversuche.

Die hiesige Forschungsarbeit konzentriert sich auf die Isolation von Primärzellen aus Mausgewebe. Primärzellen eignen sich besonders gut, um *in vivo* Konditionen von Zellen zu untersuchen. Die Eigenschaften der Primärzellen sind jedoch stark von den biologischen Gegebenheiten des jeweiligen Tieres abhängig, aus dem die Zellen isoliert wurden. Durch die ausschließliche Verwendung von Mäusen einer definierten Altersgruppe, konnte die tierbedingte Variabilität in unserer Studie minimiert werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass mikroregionale oder strukturelle Unterschiede im ZNS (bspw. Zuordnung der isolierten Zellen zu Großhirnrinde, Kleinhirn und Rückenmark sowie Unterschiede in der Myelinisierung) nicht berücksichtigt wurden, obwohl diese für das Verständnis pathologischer Signalkaskaden von Bedeutung sein könnten.

4.2.1 Optimierung der Zellisolation durch Pooling von ZNS-Gewebe

Prinzipiell ist es für die Durchführung des vorliegenden Zellisoliations-Protokolls nicht zwingend erforderlich, mehrere ZNS-Gewebe zu poolen. Diese Entscheidung kann vom Experimentator bzw. der Experimentatorin individuell

getroffen werden, abhängig vom spezifischen Forschungsansatz und der angestrebten finalen Zellzahl. Die Verwendung unterschiedlicher Mäuse zur Isolation der einzelnen Zelltypen würde jedoch die Möglichkeit ausschließen, alle ZNS-residenten Zelltypen aus demselben ZNS-Replikat zu untersuchen und miteinander in Beziehung zu setzen.

Die separate Aufarbeitung von Versuchstieren für die jeweiligen ZNS-residenten Zelltypen ermöglicht es daher nicht, nachfolgende Analysen neuronaler Netzwerke und zellulärer Interaktionen durchzuführen. Das in dieser Arbeit beschriebene Protokoll bietet durch die Teilung der ZNS-Zellsuspension vor der magnetischen Isolation von Oligodendrozyten und Mikroglia die Möglichkeit, verschiedene Zelltypen unter identischen biologischen Bedingungen zu untersuchen. Zudem wird durch das Gewebe-Pooling eine ausreichende Zellzahl für Downstream-Analysen sichergestellt.

Die Arbeit mit lediglich einem ZNS-Präparat führt zu einem hohen Materialverbrauch und dadurch zu einer geringen Kosteneffizienz. Eine Aufarbeitung von mehr als zwei gepoolten ZNS-Zellsuspensionen erfordert hingegen eine proportionale Hochskalierung aller Reagenzien und Volumina. Zwei ZNS-Gewebe stellen jedoch die maximale Kapazität pro C-Röhrchen dar. Daher wurden alle Reagenzien und Volumina auf die Menge von zwei gepoolten ZNS-Zellsuspensionen abgestimmt und als Standard definiert.

4.2.2 Methodenvergleich zur Isolation von Primärzellen aus dem murinen ZNS

Die simultane Isolation von ZNS-residenten Zellen wie Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Neuronen stellt eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass jeder dieser Zelltypen spezifische mechanische und enzymatische Anforderungen für die Isolation mit sich bringt.

In dieser Arbeit wurden die Methoden MACS und FACS eingesetzt, die eine effiziente Isolation mit einer hohen Zellviabilität und -integrität ermöglichen

^{64,105,106}. Das MACS-Verfahren zeichnet sich durch einfache Handhabung und kurze Dauer aus und eignet sich gut für größere Zellmengen, da verschiedene Zelltypen parallel separiert werden können ¹⁰⁶. Die Verwendung kleiner Magnetperlen in Kombination mit spezifischen Antikörpern gewährleistet dabei eine besonders schonende Behandlung der Zellkonjugate mit weniger mechanischem Stress als beim *Sorting*.

Die FACS-Methode hingegen ermöglicht insbesondere eine hohe Präzision und Reinheit bei der Zellisolation und findet vor allem bei der Isolation von Zellpopulationen mit niedrigen Marker-Leveln oder basierend auf intrazellulären Markern wie NeuN Anwendung ¹⁰⁷. Gegenüber der MACS-Methode ist jedoch ein höherer Zellverlust und mechanischer Stress zu berücksichtigen ¹⁰⁶. Eine vergleichende Analyse der Reinheit muriner CD4⁺CD25⁺-T-Lymphozyten, die mittels MACS und FACS isoliert wurden, zeigte in der Studie von Yan *et al.* (2009), dass die mit FACS isolierten CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen eine Reinheit von etwa 99,0 % erzielten, während die mit MACS isolierten Zellen eine Reinheit von etwa 91,2 % aufwiesen ¹⁰⁸. Aktuelle Studien der letzten Jahre belegen ebenfalls die Präzision und Effizienz von MACS und FACS bei der Isolation muriner ZNS-residenten Zellen und zeigen, dass beide Methoden Zellsuspensionen mit einer Reinheit von etwa 90% und einer Viabilität von über 85 % isolieren können ^{64,105}. Diese Studienergebnisse stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen der Zellisolation.

Beiden Methoden geht jedoch eine enzymatische und mechanische Dissoziation bei etwa 37°C voraus, welche bereits in vielen Studien zu nachweisbaren transkriptomischen Veränderungen führten und somit die Interpretation von Multi-Omics-Analysen verfälschen könnten ¹⁰⁹. Zudem kann die Verwendung von Antikörpern die Funktionalität und die Signaltransduktion der isolierten Zellen beeinträchtigen, natürliche Zell-Zell-Interaktionen im Gewebe stören und die Zellmorphologie der isolierten Zelltypen verändern. ZNS-residente Zelltypen, insbesondere Mikroglia, reagieren zudem mit Veränderungen ihres phänotypischen Zustands auf ZNS-Gewebeschäden, die während des Isolationsprozesses unvermeidbar sind ¹¹⁰. Daher war im Rahmen der

Optimierungen des verwendeten Protokolls von großer Bedeutung, neben dem Vermeiden von verlängerten Inkubationszeiten eine konstante Kühlung sämtlicher Reagenzien und Zellsuspensionen sicherzustellen, um die Induktion von Genen und proinflammatorischen Enzymen zu minimieren.

Darüber hinaus kann sich die Verteilung von Oberflächenmarkern im Verlauf der Isolationsprozesse verändern, was die Interpretation der Experimente und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse potentiell erschweren kann ¹¹¹.

Als alternative Methode wäre eine Isolation durch Zellkultivierung möglich gewesen. Diese birgt jedoch das Risiko einer Ko-Kultivierung mit benachbarten Zellen, was die Reinheit beeinträchtigen kann ^{112,113}. Zudem können Zellen bei längerer Kultivierung ihren Phänotyp verändern, was die Relevanz der Ergebnisse für *in vivo* Bedingungen verringert ¹¹¹. Die begrenzte Zellmenge in Kulturen kann außerdem die Durchführung bioinformatischer Analysen erschweren, die oft große Zellzahlen erfordern.

Eine weitere effiziente Methode zur Isolation reiner Mikroglia- und Astrozyten-Populationen stellt die Dichtegradienten-Zentrifugation dar. Diese Methode ist jedoch äußerst zeitaufwendig und erfordert spezielle Materialien, die mit einem hohen Kostenaufwand verbunden sind ⁷⁸. Darüber hinaus setzt diese Methode eine umfassende praktische Erfahrung in der korrekten Festlegung und Handhabung des Dichtegradienten voraus ⁷³. Zudem kann eine geringe Zellausbeute Folge der Zentrifugation sowie der Trennung der beiden Zellfraktionen sein ⁷⁸.

Ähnlich verhält es sich mit der mikrofluidischen Zentrifugationstechnik, die ebenfalls die nötige Fachkompetenz erfordert und einen enormen Kostenfaktor darstellt ⁷³.

Ein fortschrittliches *in-vitro*-Modell zur Untersuchung von komplexen neuronalen Strukturen und Funktionen des Gehirns, einschließlich dessen residenter Zellen, stellen Brain-on-a-Chip-Systeme (BoCs) dar. Als Trägerwerkzeug werden mikrofluidische Chips genutzt, um die Mikroumgebungen des Gehirns

einschließlich zellulärer Interaktionen, der extrazellulären Matrix und deren physikalischen Eigenschaften nachzubilden ^{114,115}. Die Herstellung erfolgt durch die Verwendung tierischer Embryonen oder menschlich induzierter pluripotenter Stammzellen. Sie stellen ein vielversprechendes Instrument zur Untersuchung neurophysiologischer Signalkaskaden und struktureller Prozesse des Gehirns dar. BoCs sind jedoch häufig nicht in der Lage, die gesamte Komplexität Nervensystems abzubilden, sodass ein vollständiges Verständnis der den Krankheiten zugrunde liegenden Mechanismen auf der Grundlage von BoCs aktuell noch nicht möglich scheint ¹¹⁶. Zudem zeigen diese Modelle sowohl ein limitiertes Zellwachstum als auch eine eingeschränkte Zellmigration ^{117,118}. Das Potenzial der BoCs, zelluläre Interaktionen naturgetreu nachzubilden, wird bislang noch durch die physikalischen und biochemischen Einschränkungen dieser Modelle begrenzt.

Unter Berücksichtigung der aktuellen Studienergebnisse sowie der vorhandenen Literatur, hat sich die Kombination von MACS und FACS als eine der bislang effizientesten Methoden zur Gewinnung reiner, vitaler Zellsuspensionen erwiesen ^{64,105,108}. Darüber hinaus belegen die Reinheit und Lebensfähigkeit der in dieser Arbeit isolierten Zelltypen unter physiologischen und EAE-Bedingungen, dass diese Methoden gleichermaßen für naive sowie EAE-Tiere geeignet sind (**Abbildung 12**).

4.2.3 Strategien zur zelltypspezifischen Isolation im ZNS: Markerprofile im Vergleich

4.2.3.1 Isolation von Oligodendrozyten via O4

Im Rahmen der Isolation von reinen und viablen Oligodendrozyten aus dem murinen ZNS erfolgte deren Markierung mittels anti-O4-MicroBeads. Die Detektion des O4-Oberflächenantigens zur Isolation von Oligodendrozyten-Populationen wurde bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben und ist gut etabliert ^{70,119,120}. O4 wird bereits von Prä-Oligodendrozyten auf deren

Zelloberfläche exprimiert und kann als zuverlässiger Marker für OPCs verwendet werden, die sich auf den oligodendroglialen Zelltyp festgelegt haben ^{70,120}.

In weiteren Publikationen wurden alternativ zu O4 das Proteoglykan Nerven/Glia-Antigen 2 (NG2), Galactocerebroside (GalC), Oligodendrozytenmarker 1 (O1) und das Myelinbasisprotein (MBP) für die Isolation von Oligodendrozyten bzw. deren Vorläuferzellen diskutiert ^{58,121}. NG2 ist ein Marker für frühe oligodendrogliale Vorläuferzellen, jedoch können sich NG2-positive Zellen auch in Astrozyten differenzieren, was die Interpretation nachfolgender Analysen erschwert ^{58,121,58,122}.

GalC, MBP und O1 hingegen sind Myelinproteine, die von reifen, differenzierten Oligodendrozyten gebildet werden ^{58,121}. In Krankheitsmodellen wie der EAE, die mit einer gestörten Myelinisierung einhergehen, könnte die Verwendung dieser Marker zu einer insuffizienten Identifizierung der Oligodendrozyten führen. Die Wahl von O4 als Isolationsmarker hingegen ermöglicht eine umfangreichere Isolation größerer Oligodendrozyten-Populationen, da O4 bereits in frühen Stadien der Oligodendrozyten-Differenzierung exprimiert wird ⁶⁹.

4.2.3.2 Isolation von Mikroglia via CD11b und CD45

Um den Einfluss der Mikroglia auf die Krankheitsätiologie und den EAE-Verlauf zu untersuchen, ist eine Differenzierung der Mikroglia-Population von weiteren CD11b⁺-Zelltypen, die während der Neuroinflammation ebenfalls das ZNS infiltrieren, wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen oder Monozyten ^{46,123}, erforderlich. Die in dieser Arbeit verwendete umfassende *Gating*-Strategie hierzu ist in **Abbildung 5** dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mikroglia als CD11b⁺CD45^{high} klassifiziert ^{44,46,124}. Da CD45 ebenso wie CD11b auch von Leukozyten exprimiert wird, kann die Unterscheidung zwischen Mikroglia und infiltrierenden Leukozyten erschwert sein ⁴⁶. Die gleichzeitige Analyse beider Oberflächenmarker ermöglicht dennoch eine Differenzierung zwischen ZNS-residenten Mikroglia und infiltrierenden Makrophagen, die als CD11b⁺ und mit einer hohen CD45-Expression

charakterisiert werden. Unter inflammatorischen Bedingungen, wie bei EAE, können erhöhte CD45-Expressionswerte jedoch die Trennschärfe zwischen diesen Populationen beeinträchtigen ⁴⁴.

Im Vergleich zu den anderen ZNS-residenten Zelltypen, fiel die durchschnittliche Zellzahl der isolierten Mikroglia sowohl unter physiologischen als auch unter EAE-Bedingungen geringer aus (**Abbildung 5**). In beiden Fällen wurde eine Sortierung der CD11b⁺CD45^{high}-Population im Anschluss an die MACS-basierte Isolation durchgeführt, um die Vergleichbarkeit zwischen Mikroglia aus naiven und EAE-Replikaten in nachfolgenden Analysen zu gewährleisten. Grundsätzlich kann dieser Schritt im Hinblick auf naive Replikate als optional betrachtet werden. Die additive fluoreszenzbasierte Zellsortierung kann eine relevante Beeinträchtigung der Integrität, Funktionalität und Lebensfähigkeit der Mikroglia zur Folge haben und somit als eine mögliche Ursache der verminderten Zellzahl betrachtet werden.

Bei naiven Mäusen betrug der Anteil der Mikroglia in den phänotypischen Analysen etwa 91,16% (96% der CD11b⁺-Population), während bei EAE-Tieren ein Anteil von 46,85% aller lebenden Einzelzellen (55% der gesamten) beobachtet wurde. Diese Unterschiede in der Mikroglia-Verteilung sollten bei der Interpretation der Zellzahlen aus EAE-Mäusen berücksichtigt werden. Während der Neuroinflammation kommt es zu einer verstärkten Einwanderung weiterer CD11b⁺-Zellen, wie Makrophagen, dendritischer Zellen oder Monozyten, in das ZNS ^{44,125}. Die Ergebnisse des Immunzellpanels bestätigten zudem eine erhöhte Immigration peripherer Lymphozyten, welche zusätzlich die Nachweisbarkeit von Mikroglia in den FACS-Analysen beeinträchtigen kann ¹²⁵. Ein weiterer Faktor, der die Isolation und die Zellzahl der Mikroglia aus EAE-Mäusen beeinträchtigen kann, ist deren Aktivierungszustand unter inflammatorischen Bedingungen. Aktivierte Mikroglia zeigen eine veränderte Zellphysiologie sowie eine erhöhte CD45-Expression, was mit der eingesetzten *Gating*-Strategie möglicherweise nicht erfasst wird ^{39,126}. Dies kann fälschlicherweise zu einer Reduktion der isolierten Zellzahl führen, weshalb bei

geringer Ausbeute das *Gating*-Setup sowie die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen angepasst werden sollten.

Alternative Marker wie das Transmembranprotein 119 (Tmem119), der P2Y-Purinozeptor 12 (P2RY12) sowie der CX3C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 1 (CX3CR1) wurden für die Isolation von Mikroglia beschrieben, zeigen jedoch unter inflammatorischen Bedingungen signifikante Einschränkungen. Tmem119 ist unter physiologischen Bedingungen zwar spezifisch für Mikroglia, verliert jedoch unter neuroinflammatorischen Zuständen an Sensitivität und wird auch von anderen Zelltypen wie follikulären dendritischen Zellen exprimiert^{127–129}. Ebenso zeigt P2RY12, ein Marker mit zentraler Rolle in der Chemotaxis, eine herabgesetzte Expression bei aktivierten Mikroglia und ist daher bei EAE-Mäusen weniger geeignet^{44,130,130,131}.

In einer experimentellen Studie von Doughty *et al.* (2022) konnte eine 84-92,5%ige Expression von CX3CR1 in Mikroglia nachgewiesen werden, wobei in weiteren Publikationen gezeigt wurde, dass CX3CR1 auch von Astrozyten und Neuronen exprimiert werden kann^{126,132,133}. Dies stellt eine wesentliche Einschränkung für die Verwendung dieses Markers in der hier verfolgten Studienstrategie dar.

Zusammenfassend wurde die Sortierung anhand der CD11b- und CD45-Expression als die zuverlässigste Methode zur Isolation von Mikroglia aus EAE-Tieren erachtet, trotz Herausforderungen, die mit deren Aktivierungszustand und den Limitationen alternativer Marker verbunden sind^{43,45,46}.

4.2.3.3 Isolation von Astrozyten via ACSA-2

Für die Isolation reiner und lebensfähiger Astrozyten wurde das ACSA-2-Antigen als Marker genutzt, welches durch eine Bindung an ein extrazelluläres Epitop der Natrium-Kalium-transportierenden ATPase-Untereinheit $\beta 2$ (ATP1B2) eine spezifische Isolation von Astrozyten aus dem murinen ZNS ermöglicht^{64,68,134}. ACSA-2 wird nicht von Neuronen oder Oligodendrozyten exprimiert und zeigt

eine durchgängige Stabilität in allen Entwicklungsstadien der Astrozyten, was seine Vielseitigkeit und Zuverlässigkeit belegt ^{67,135,136}.

Alternative Marker wie ACSA-1 und das saure Gliafaserprotein (GFAP) weisen dagegen relevante Einschränkungen auf. ACSA-1 markiert den Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST), der sowohl von murinen als auch humanen Astrozyten exprimiert wird ^{78,135,137}. Studien zeigten jedoch, dass GLAST auch auf Oligodendrozyten und Mikroglia detektiert werden kann ¹³⁸. Zudem ist die GLAST-Expression anfällig für phänotypische Veränderungen, wie sie zum Beispiel bei der reaktiven Astroglieose auftreten ¹³⁸.

GFAP hingegen fungiert als eine Hauptkomponente des zellulären, astrozytären Zytoskeletts und wird unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert, was es als Marker für die Untersuchung der reaktiven Astroglieose interessant macht ^{135,139,140}. Allerdings variieren die GFAP-Expressionslevel stark in Abhängigkeit von der Mikroumgebung sowie der ZNS-Homöostase ¹⁴⁰.

Zusammenfassend ermöglichte der Einsatz von ACSA-2 in dieser Studie eine zuverlässige Isolation reiner Astrozyten-Populationen aus EAE- und naiven Tieren. Die stabile Expression von ACSA-2 unter sowohl inflammatorischen als auch nicht-inflammatorischen Bedingungen führte zu konsistenten und reproduzierbaren Ergebnissen (**Abbildung 9+12**).

4.2.3.4 Isolation von Neuronen via Negativselektion

Während die Isolation von Oligodendrozyten, Mikroglia und Astrozyten durch eine Positivselektion erfolgte, wurde die Isolation reiner Neuronen-Populationen mittels Negativselektion durchgeführt. Diese methodische Vorgehensweise ergab sich vor allem aus dem Mangel an spezifischen anti-MicroBeads für die Isolation von Neuronen im Rahmen einer Positivselektion.

Das verwendete Neuronen-Isolationskit von Milteny basiert auf der Kombination eines Biotin-Antikörper-Cocktails mit den zugehörigen anti-Biotin-MicroBeads. Dieses Kit ermöglicht die Isolation reiner Neuronen-Populationen durch ein

indirektes Markierungsverfahren aller nicht-neuronalen Zellen. Die Anwendung dieses Kits ist weit verbreitet ^{141–143}.

Miltenyi hat ein von ihnen nicht veröffentlichtes Oberflächenantigen identifiziert, welches von der Mehrzahl aller nicht-neuronalen Zelltypen, wie bspw. Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten, Endothelzellen und Fibroblasten, exprimiert wird. Diese Zelltypen werden mithilfe Biotin-konjugierter MicroBeads markiert und depletiert. Eine Ausnahme bilden Erythrozyten, die neben den Neuronen ebenfalls keine Expression dieses unbenannten Oberflächenmarkers aufweisen. Eine Depletion dieser Zellpopulation erfolgte in der vorliegenden Studie jedoch bereits im Voraus in Protokollschritt 2.2.5.

Die Färbung mit NeuN als spezifischem Marker für neuronale Zellkerne wurde zur Validierung in einem additiven FACS-Panel eingesetzt (**Abbildung 11**). In einer Studie von Berl et. al (2017) erzielte diese Methode zusammen mit dem Miltenyi-Kit eine Reinheit von bis zu 86,5% NeuN-positiven, viablen Neuronen. Im Vergleich dazu erreichte die FACS-basierte Isolation von fluoreszierenden Neuronen lediglich etwa 62,4% NeuN-positive Zellen ¹⁴². Mithilfe des hier beschriebenen Protokolls konnten unter Verwendung des Miltenyi-Kits Reinheiten von bis zu 87,58% NeuN-positiven, viablen Neuronen generiert werden (**Abbildung 11**).

Obwohl mittlerweile mehrere FACS-Marker für die Isolation neuronaler Stammzellen zur Verfügung stehen, wie bspw. *Fatty Acid-Binding Protein 7* (FABP7) oder *Prominin-like-Protein 1* (CD133), mangelt es nach wie vor an etablierten Alternativen für die Isolation reifer ausdifferenzierter Neurone ^{144,145}.

Die Negativselektion mit dem Miltenyi-Kit in Kombination mit dem intranukleären Marker NeuN erwies sich in dieser Arbeit als zuverlässige Methode zur Gewinnung reiner Neuronen-Populationen und stellte die bislang am besten etablierte Methode zur Isolation von immunologisch aktiven Zellkonjugaten dar ^{142,146–148}.

4.3 Charakterisierung der Immunzellverteilung im ZNS: Relevanz und Implikationen des Immunzellpanels

Um ein umfassenderes Verständnis der Immunreaktion in der Pathogenese der EAE bzw. MS zu erlangen, ist es von großer Relevanz, sowohl periphere Immunzellen als auch ZNS-residente Zellen aus einem EAE-Zell-Homogenat zeitgleich mittels FACS zu analysieren.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnten signifikante Unterschiede in der Häufung und Verteilung der peripheren Immunzellen in naïven versus EAE-Replikaten sowie innerhalb des EAE-Verlaufs festgestellt werden (**Abbildung 15**). Das hier beschriebene FACS-Panel erlaubt eine differenzierte phänotypische Charakterisierung peripherer und zentraler Immunzellen aus demselben ZNS-Homogenat, wodurch der Informationsgewinn pro Maus maximiert wird.

Das zusätzlich in die Analysen einbezogene periphere Kompartiment kann als „fünfter Zelltyp“ des Protokolls betrachtet werden. Die zeitliche Koordination peripherer und zentraler Immunantworten, die mit diesem Panel analysiert werden kann, ist entscheidend, um den Verlauf der MS-Progression und den Übergang zur Neurodegeneration besser zu verstehen.

Unter physiologischen Bedingungen ist lediglich eine geringe Präsenz von Lymphozyten im ZNS zu beobachten, da die intakte BHS den Eintritt peripherer Immunzellen limitiert (**Abbildung 15**)¹⁴⁹. Im Kontext der Neuroinflammation wurde eine deutliche Zunahme der CD45⁺-Immunzellen im ZNS beobachtet. Insbesondere CD45^{high}CD11b⁺-Zellen, wie Makrophagen und Monozyten, dringen verstärkt in das ZNS ein, angeregt durch die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, und tragen maßgeblich zur zentralen Entzündungsreaktion bei ^{44,150}.

Der erhöhte Anteil an CD4⁺-Lymphozyten in den EAE-Replikaten deutet auf eine starke Aktivierung von T-Helferzellen hin, die eine zentrale Rolle in der Autoimmunreaktion und Gewebeschädigung im ZNS spielen ^{8,151}. CD8⁺-T-

Lymphozyten waren nur in geringem Maße nachweisbar, was auf die dominierende Rolle der CD4⁺-T-Zellen im EAE-Modell hinweist ^{7,85}.

Für eine differenzierte Analyse von T-Lymphozyten, könnte das FACS-Panels um einen anti-CD3-Antikörper erweitert werden, da CD3 ebenfalls auf differenzierten CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Lymphozyten exprimiert wird ¹⁵². CD3⁺CD4⁻CD8⁻-doppelnegative T-Lymphozyten und Tregs wurden zudem als wichtige Modulatoren der Immunhomöostase identifiziert ^{153,154}. Aktivierte Tregs exprimieren verstärkt CD25 auf ihrer Zelloberfläche, weshalb die Kombination von CD4 und CD25 als Marker für die Identifikation von Tregs weit verbreitet ist^{154,155}.

Im Vergleich mit, der an Tag 16 beobachteten Immunzellverteilung konnte an Tag 20 des EAE-Verlaufs eine relative Zunahme sowohl der CD4⁺ -Lymphozyten als auch der CD4⁺CD25^{high}-regulatorischen T-beobachtet werden, was deren bedeutende Rolle bei der Regulation zentraler Entzündungen unterstreicht. Die Treg-Population ist darüber hinaus auch in therapeutischer Hinsicht von Relevanz, da sie Autoimmunreaktionen hemmen und durch MS-Therapeutika wie IFN-β, welches die Treg-Zahl erhöht, modifiziert werden können ¹⁵⁶.

Sowohl bei naiven als auch EAE-Replikaten konnte in den FACS-Analysen lediglich ein geringer Anteil an CD19⁺-B-Lymphozyten in den ZNS-Homogenaten nachgewiesen werden, was auf ihre primär periphere Rolle in der Pathogenese der EAE hinweist. Alternativ könnte eine erschwerte ZNS-Infiltration der B-Zellen diskutiert werden. Der Oberflächenmarker CD19 fungiert als Bestandteil des B-Zell-Rezeptor-Signalkomplexes und wird bereits von B-Zellvorläufern exprimiert ^{157,158,159}. Obwohl T-Lymphozyten die ZNS-Entzündung dominieren, bleibt die Bedeutung der B-Lymphozyten für die MS-Ätiologie aufgrund ihrer Interaktion mit den T-Zellen und ihrer Aktivierung von T-Helferzellen zentral ^{5,88,99,151}.

Um das Verständnis von B-Zellen in der EAE weiter zu vertiefen, wären unter anderem Untersuchungen aus peripheren lymphatischen Organen sinnvoll. Die Wirksamkeit aktueller B-Lymphozyten-Depletionstherapien unterstreicht ihre

Relevanz in der MS-Ätiologie und betont die Notwendigkeit detaillierter Analysen ihrer spezifischen Rolle in der Krankheitsentwicklung und -progression ¹⁵⁸.

4.4 Potenzielle Erweiterungen und Limitationen des Immunzellpanels: Chancen und methodische Herausforderungen

Das entwickelte Immunzellpanel zur Charakterisierung peripherer Immunzellen aus demselben ZNS-Replikat wie die zuvor isolierten ZNS-residenten Zellen stellt einen bedeutenden methodischen Fortschritt für die Untersuchung neuroinflammatorischer Signalkaskaden dar. Es berücksichtigt jedoch nicht alle peripheren Zelltypen, die an der MS-Pathogenese beteiligt sind. Eine Ergänzung des Panels durch zusätzliche Marker wie CD16 und CD56 könnte die Detektion natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) ermöglichen, welche bei proinflammatorischen Prozessen und der ZNS-Infiltration eine wichtige Rolle spielen ^{5,160,161}. Ebenso könnte die Einbindung von Markern für dendritische Zellen sinnvoll sein, um ihre Rolle bei der Stimulation von T-Lymphozyten näher zu untersuchen ¹⁰¹. Die Identifizierung dendritischer Zellen wird jedoch durch ihre variable Expression spezifischer Marker wie den *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHCII) oder das Integrin CD11c unter entzündlichen Bedingungen erschwert ¹⁶². Zudem wird CD11c auch von B- und T-Lymphozyten sowie Makrophagen exprimiert ^{163,164}. Perspektivisch könnte zudem die Analyse von myeloischen APZs Einblicke in die zentrale Reaktivierung von T-Lymphozyten liefern.

Eine weitere Limitation des durchflusszytometrischen Immunzellpanels könnte das potenzielle Übersehen von Subpopulationen und deren Aktivierungszuständen darstellen, sofern nicht ausreichend Marker zur Identifizierung der einzelnen Zelltypen einbezogen wurden.

In diesem Zusammenhang könnte die Erweiterung des Immunzellpanels um den Leukozyten-Aktivierungsmarker CD69, der eine Rolle bei der Zellmigration, -retention und der Regulation von TH-17-Reaktionen von T-Lymphozyten spielt,

wichtige Hinweise auf regulatorische Signalkaskaden liefern¹⁶⁵. Die durchflusszytometrische Detektion spezifischer Aktivierungsmarker könnte somit auch Hinweise auf potenziell wichtige regulatorische Signalkaskaden liefern. Zusätzlich könnte eine intrazelluläre Zytokin-Färbung helfen, entzündungsfördernde und -hemmende Zellprofile zu erfassen.

Die Erweiterung des durchflusszytometrischen Panels durch zusätzliche Antikörper erfordert eine sorgfältige Planung, insbesondere hinsichtlich der begrenzten Kanäle und der Fluoreszenzinterferenzen. Durch die gezielte Auswahl von Antikörpern mit unterschiedlichen Emissionsspektren konnte die gleichzeitige Detektion mehrerer Marker ohne Signalverluste realisiert werden.

Die Festlegung der *Gating*-Parameter zur Identifizierung einzelner Zellpopulationen ist zudem subjektiv und kann je nach Experimentator oder Labor variieren. Diese Variabilität könnte Unterschiede in der Detektion und Quantifizierung der Zellpopulationen zur Folge haben und somit die Vergleichbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen Studien einschränken.

Da die Durchflusszytometrie keine vollständige molekulare Charakterisierung erlaubt, könnten ergänzende funktionelle Analysen wie Ribonukleinsäure (RNA)-Sequenzierung oder Proteomik notwendig sein. Die experimentellen Daten des Immunzellpanels repräsentieren Momentaufnahmen zu definierten Zeitpunkten des EAE-Verlaufs. Um potenziell wichtige dynamische Veränderungen im Krankheitsverlauf zu detektieren, wären fortlaufende Analysen in kurzen Intervallen erforderlich. Ein solches Versuchsdesign wäre durch das hier vorgestellte durchflusszytometrische Panel realisierbar.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Promotionsarbeit wurde eine bestehende Zellisolations-Methode erfolgreich an einem neuen Standort etabliert und erweitert, um präzisere Forschungsdesigns und damit einen umfassenderen und robusten Erkenntnisgewinn zu ermöglichen.

Die Nutzung einer einzigen ZNS-Zellsuspension zur anschließenden Isolation aller ZNS-residenten Zellen und zur gleichzeitigen Analyse aus der Peripherie immigrierter Immunzellen aus EAE- und naiven Tieren, bietet zahlreiche Vorteile und wegweisende Fortschritte für zukünftige wissenschaftliche Fragestellungen: Neben einer Kostenersparnis ermöglicht dieser Ansatz die detaillierte *ex vivo* Analyse potenzieller Zellinteraktionen und neuronaler Netzwerke. Dadurch kann die Variabilität innerhalb experimenteller Gruppen signifikant verringert und die Vergleichbarkeit von Downstream-Analysen optimiert werden. Durch das Pooling von ZNS-Gewebe mehrerer Versuchstiere desselben biologischen Replikats lässt sich zudem eine ausreichend hohe Anzahl isolierter Zellen für weiterführende bioinformatische Analysen erzielen.

Im Anschluss durchgeführte FACS-Analysen bestätigten die erfolgreiche Generierung reiner und viabler Einzelzell-Suspensionen. Diese Ergebnisse ermöglichen eine nachfolgende Kultivierung der isolierten Zellfraktionen in Monokulturen für weiterführende funktionelle Tests und Analysen.

Darüber hinaus eignen sich die isolierten Zellproben für eine umfassende Untersuchung der jeweiligen Proteom-, Transkriptom- und Metabolomprofile, wodurch wertvolle Einblicke im Hinblick auf die Identifikation potenzieller Biomarker oder therapeutisch wichtiger Zielstrukturen bei MS gewonnen werden können. Dadurch können ZNS-residente Zelltypen in verschiedenen Krankheitsstadien der EAE – wie Neuroinflammation, Neurodegeneration oder Remission – detailliert untersucht werden. Aufgrund der im Ergebnisteil beschriebenen, unvorhersehbaren Herausforderungen bei der Etablierung und der damit verbundenen längeren Dauer konnten die geplanten Multi-Omics-Analysen jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit umgesetzt werden.

Eine essenzielle Optimierung und Erweiterung des bereits etablierten Zellisolations-Protokolls betraf die nachfolgenden durchflusszytometrischen Analysen peripherer Immunzellen aus dem ZNS-Präparat. Die Etablierung eines neuen FACS-Panels ermöglichte eine gleichzeitige Analyse peripherer Immunzellen sowie ihrer Migrationsdynamik aus demselben ZNS-Replikat, aus dem zuvor ZNS-residente Zellen isoliert wurden. Diese Vorgehensweise schafft die Voraussetzung, Interaktionen zwischen diesen beiden bedeutenden Kompartimenten im Kontext der MS eingehender zu untersuchen.

Das optimierte Zellisolationsprotokoll sowie das zugehörige Immunzellpanel bieten vielversprechende Ansätze, die über die Anwendung auf das EAE-Modell hinausgehen. Insbesondere könnten diese Methoden auf andere Tiermodelle neuroinflammatorischer oder neurodegenerativer Erkrankungen übertragen werden, die ähnliche Immunantworten aufweisen.

Die Adaption des hiesigen Protokolls für klinische Studien und die Verwendung menschlicher Proben bringt jedoch mehrere Herausforderungen mit sich: Eine der größten Hürden ist die Genehmigung des Ethikantrages und die Verfügbarkeit von humanen Gewebeproben. Zudem könnten Zellmorphologie, Viabilität und die Reaktivität von humanen Immunzellen stark variieren, was potenziell die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigt. Die klinische Relevanz der aus den Tiermodellen abgeleiteten Ergebnisse sollte somit stets evaluiert werden, um sicherzustellen, dass die identifizierten therapeutischen Zielstrukturen tatsächlich in der klinischen Praxis von Bedeutung sein können. Der Übergang von präklinischen zu klinischen Studien erfordert eine gründliche Validierung der verwendeten Methoden und Ergebnisse.

Zusammenfassend bietet die hier vorgestellte Forschungsarbeit bedeutende Fortschritte hinsichtlich der Identifizierung molekularer, biochemischer und funktionell relevanter *targets* der MS, die nachfolgende präklinische und klinische Forschungsprojekte relevant unterstützen können.

6 Literatur – und Quellenverzeichnis

1. Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008;255(S6):2-6. doi:10.1007/s00415-008-6001-2
2. Trapp BD, Nave KA. Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? *Annu Rev Neurosci*. 2008;31(1):247-269. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313
3. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JGG. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(7):507-514. doi:10.1038/nrn3275
4. Ward M, Goldman MD. Epidemiology and Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2022;28(4):988-1005. doi:10.1212/CON.0000000000001136
5. Haki M, AL-Biati HA, Al-Tameemi ZS, Ali IS, Al-hussaniy HA. Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. *Medicine*. 2024;103(8):e37297. doi:10.1097/MD.00000000000037297
6. Simon JH, Kleinschmidt-DeMasters BK. Variants of Multiple Sclerosis. *Neuroimaging Clinics of North America*. 2008;18(4):703-716. doi:10.1016/j.nic.2008.06.003
7. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-558. doi:10.1038/nri3871
8. Rangachari M, Kuchroo VK. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *Journal of Autoimmunity*. 2013;45:31-39. doi:10.1016/j.jaut.2013.06.008
9. Huntemann N, Vogelsang A, Groeneweg L, et al. An optimized and validated protocol for inducing chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6J mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 2022;367:109443. doi:10.1016/j.jneumeth.2021.109443
10. Limmroth V, Bartzokis I, Bonmann E, Kusel P, Schreiner T, Schürks M. The BETACONNECT™ system: MS therapy goes digital. *Neurodegenerative Disease Management*. 2018;8(6):399-410. doi:10.2217/nmt-2018-0030
11. Portaccio E, Magyari M, Havrdova EK, et al. Multiple sclerosis: emerging epidemiological trends and redefining the clinical course. *The Lancet Regional Health - Europe*. 2024;44:100977. doi:10.1016/j.lanep.2024.100977
12. Lemus HN, Warrington AE, Rodriguez M. Multiple Sclerosis. *Neurologic Clinics*.

2018;36(1):1-11. doi:10.1016/j.ncl.2017.08.002

13. Khalil M, Reindl M, Lutterotti A, et al. Epitope specificity of serum antibodies directed against the extracellular domain of myelin oligodendrocyte glycoprotein: Influence of relapses and immunomodulatory treatments. *Journal of Neuroimmunology*. 2006;174(1-2):147-156. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.01.012
14. Kennel De March A, De Bouwerie M, Kolopp-Sarda MN, Faure GC, Béné MC, Bernard CCA. Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein B-cell responses in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2003;135(1-2):117-125. doi:10.1016/S0165-5728(02)00434-4
15. Karni A, Bakimer-Kleiner R, Abramsky O, Ben-Nun A. Elevated Levels of Antibody to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Is Not Specific for Patients With Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 1999;56(3):311. doi:10.1001/archneur.56.3.311
16. Martinsen V, Kursula P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: insights into protein disorder and disease. *Amino Acids*. 2022;54(1):99-109. doi:10.1007/s00726-021-03111-7
17. Docampo MJ, Lutterotti A, Sospedra M, Martin R. Mechanistic and Biomarker Studies to Demonstrate Immune Tolerance in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2022;12:787498. doi:10.3389/fimmu.2021.787498
18. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2018;391(10130):1622-1636. doi:10.1016/S0140-6736(18)30481-1
19. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(1):51-64. doi:10.1038/s41579-022-00770-5
20. Ortega-Hernandez OD, Martínez-Cáceres EM, Presas-Rodríguez S, Ramo-Tello C. Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis: A Convolved Interaction and the Opportunity to Unravel Predictive Biomarkers. *IJMS*. 2023;24(8):7407. doi:10.3390/ijms24087407
21. Montague T, Drummond J, Ng K, Parratt J. Advancements in multiple sclerosis. *Internal Medicine Journal*. 2025;55(6):895-904. doi:10.1111/imj.70023
22. Hedström AK. Risk factors for multiple sclerosis in the context of Epstein-Barr virus infection. *Front Immunol*. 2023;14:1212676. doi:10.3389/fimmu.2023.1212676
23. Hansen T, Skytté A, Stenager E, Petersen HC, Brønnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler*. 2005;11(5):504-510. doi:10.1191/1352458505ms1220oa

24. Langer-Gould AM, Gonzales EG, Smith JB, Li BH, Nelson LM. Racial and Ethnic Disparities in Multiple Sclerosis Prevalence. *Neurology*. 2022;98(18). doi:10.1212/WNL.0000000000200151
25. Zarghami A, Li Y, Claflin SB, Van Der Mei I, Taylor BV. Role of environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2021;21(12):1389-1408. doi:10.1080/14737175.2021.1978843
26. Yang JH, Rempe T, Whitmire N, Dunn-Pirio A, Graves JS. Therapeutic Advances in Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2022;13:824926. doi:10.3389/fneur.2022.824926
27. Jalkh G, Abi Nahed R, Macaron G, Rensel M. Safety of Newer Disease Modifying Therapies in Multiple Sclerosis. *Vaccines*. 2020;9(1):12. doi:10.3390/vaccines9010012
28. Freeman L, Longbrake EE, Coyle PK, Hendin B, Vollmer T. High-Efficacy Therapies for Treatment-Naïve Individuals with Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. 2022;36(12):1285-1299. doi:10.1007/s40263-022-00965-7
29. medicalletter.org 2021; Steinman and Zamvil 2006.
30. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. Longo DL, ed. *N Engl J Med*. 2018;378(2):169-180. doi:10.1056/NEJMra1401483
31. Shokati A, Naser Moghadasi A, Nikbakht M, Sahraian MA, Mousavi SA, Ai J. A focus on allogeneic mesenchymal stromal cells as a versatile therapeutic tool for treating multiple sclerosis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):400. doi:10.1186/s13287-021-02477-5
32. Christodoulou MV, Petkou E, Atzemoglou N, et al. Cell replacement therapy with stem cells in multiple sclerosis, a systematic review. *Human Cell*. 2023;37(1):9-53. doi:10.1007/s13577-023-01006-1
33. Krämer J, Wiendl H. Bruton tyrosine kinase inhibitors in multiple sclerosis: evidence and expectations. *Current Opinion in Neurology*. 2024;37(3):237-244. doi:10.1097/WCO.0000000000001269
34. Turner TJ, Brun P, Gruber RC, Ofengeim D. Comparative CNS Pharmacology of the Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor Tolebrutinib Versus Other BTK Inhibitor Candidates for Treating Multiple Sclerosis. *Drugs R D*. 2024;24(2):263-274. doi:10.1007/s40268-024-00468-4
35. Geladaris A, Torke S, Weber MS. Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors in Multiple Sclerosis: Pioneering the Path Towards Treatment of Progression? *CNS Drugs*.

2022;36(10):1019-1030. doi:10.1007/s40263-022-00951-z

36. Guerrero BL, Sicotte NL. Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol.* 2020;11:374. doi:10.3389/fimmu.2020.00374

37. López-Muguruza E, Matute C. Alterations of Oligodendrocyte and Myelin Energy Metabolism in Multiple Sclerosis. *IJMS.* 2023;24(16):12912. doi:10.3390/ijms241612912

38. Patani R, Hardingham GE, Liddel SA. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. *Nat Rev Neurol.* 2023;19(7):395-409. doi:10.1038/s41582-023-00822-1

39. Zia S, Rawji KS, Michaels NJ, et al. Microglia Diversity in Health and Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2020;11:588021. doi:10.3389/fimmu.2020.588021

40. Voet S, Prinz M, Van Loo G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends in Molecular Medicine.* 2019;25(2):112-123. doi:10.1016/j.molmed.2018.11.005

41. Airas L, Yong VW. Microglia in multiple sclerosis – pathogenesis and imaging. *Current Opinion in Neurology.* 2022;35(3):299-306. doi:10.1097/WCO.0000000000001045

42. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dörries R, Butcher GW, Ter Meulen V. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(16):7438-7442. doi:10.1073/pnas.88.16.7438

43. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of Microglia. *Physiological Reviews.* 2011;91(2):461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010

44. Haage V, Semtner M, Vidal RO, et al. Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in health and glioma. *acta neuropathol commun.* 2019;7(1):20. doi:10.1186/s40478-019-0665-y

45. Kosior N, Petkau TL, Connolly C, Lu G, Leavitt BR. Isolating cells from adult murine brain for validation of cell-type specific cre-mediated deletion. *Journal of Neuroscience Methods.* 2019;328:108422. doi:10.1016/j.jneumeth.2019.108422

46. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:198. doi:10.3389/fncel.2020.00198

47. M. Van Noort J, J. Van Den Elsen P, Van Horssen J, J.G. Geurts J, Van Der

- Valk P, Amor S. Preactive Multiple Sclerosis Lesions Offer Novel Clues for Neuroprotective Therapeutic Strategies. *CNSNDDT*. 2011;10(1):68-81. doi:10.2174/187152711794488566
48. Proto JD, Zhang M, Ryan S, et al. Disrupted microglial iron homeostasis in progressive multiple sclerosis. Preprint posted online May 10, 2021. doi:10.1101/2021.05.09.443127
49. Jasmine Pathan. Roles of Microglia in Neuroinflammation. Published online 2022. Pathan, J. (2022). Roles of Microglia in Neuroinflammation. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-63a4bc394320eed93210b91b-roles-of-microglia-in-neuroinflammation>
50. Lee HG, Wheeler MA, Quintana FJ. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(5):339-358. doi:10.1038/s41573-022-00390-x
51. Correale J, Farez MF. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Front Neurol*. 2015;6. doi:10.3389/fneur.2015.00180
52. Ponath G, Park C, Pitt D. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9:217. doi:10.3389/fimmu.2018.00217
53. Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*. 2020;108(4):608-622. doi:10.1016/j.neuron.2020.08.012
54. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*. 2018;97(4):742-768. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.021
55. Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends in Cell Biology*. 2011;21(10):585-593. doi:10.1016/j.tcb.2011.06.004
56. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(1):a020479. doi:10.1101/cshperspect.a020479
57. Soldán M, Pirko I. Biogenesis and Significance of Central Nervous System Myelin. *Semin Neurol*. 2012;32(01):009-014. doi:10.1055/s-0032-1306381
58. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 2019;8(11):1424. doi:10.3390/cells8111424
59. Keirstead HS, Blakemore WF. The Role of Oligodendrocytes and Oligodendrocyte Progenitors in CNS Remyelination. In: Matsas R, Tsacopoulos M, eds. *The Functional Roles of Glial Cells in Health and Disease*. Vol 468. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US; 1999:183-197. doi:10.1007/978-1-

4615-4685-6_15

60. Falcão AM, Van Bruggen D, Marques S, et al. Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis. *Nat Med*. 2018;24(12):1837-1844. doi:10.1038/s41591-018-0236-y
61. Kennedy PGE, George W, Yu X. The Possible Role of Neural Cell Apoptosis in Multiple Sclerosis. *IJMS*. 2022;23(14):7584. doi:10.3390/ijms23147584
62. Schirmer M, Franzosa EA, Lloyd-Price J, et al. Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nat Microbiol*. 2018;3(3):337-346. doi:10.1038/s41564-017-0089-z
63. Gentile A, De Vito F, Fresegna D, et al. Peripheral T cells from multiple sclerosis patients trigger synaptotoxic alterations in central neurons. *Neuropathology Appl Neurobio*. 2020;46(2):160-170. doi:10.1111/nan.12569
64. Pan J, Wan J. Methodological comparison of FACS and MACS isolation of enriched microglia and astrocytes from mouse brain. *Journal of Immunological Methods*. 2020;486:112834. doi:10.1016/j.jim.2020.112834
65. Grützkau A, Radbruch A. Small but mighty: How the MACS®-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry*. 2010;77A(7):643-647. doi:10.1002/cyto.a.20918
66. Schroeter CB, Herrmann AM, Bock S, et al. One Brain—All Cells: A Comprehensive Protocol to Isolate All Principal CNS-Resident Cell Types from Brain and Spinal Cord of Adult Healthy and EAE Mice. *Cells*. 2021;10(3):651. doi:10.3390/cells10030651
67. Batiuk MY, De Vin F, Duqué SI, et al. An immunoaffinity-based method for isolating ultrapure adult astrocytes based on ATP1B2 targeting by the ACSA-2 antibody. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(21):8874-8891. doi:10.1074/jbc.M116.765313
68. Kantzer CG, Parmigiani E, Cerrato V, et al. ACSA-2 and GLAST classify subpopulations of multipotent and glial-restricted cerebellar precursors. *J Neurosci Res*. 2021;99(9):2228-2249. doi:10.1002/jnr.24842
69. Bansal R, Warrington AE, Gard AL, Ranscht B, Pfeiffer SE. Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J Neurosci Res*. 1989;24(4):548-557. doi:10.1002/jnr.490240413
70. Flores-Obando RE, Freidin MM, Abrams CK. Rapid and Specific

Immunomagnetic Isolation of Mouse Primary Oligodendrocytes. *JoVE*. 2018;(135):57543. doi:10.3791/57543

71. Douvaras P, Fossati V. Generation and isolation of oligodendrocyte progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2015;10(8):1143-1154. doi:10.1038/nprot.2015.075

72. Schroeter CB, Henes A, Vogelsang A, et al. Simultaneous Isolation of Principal Central Nervous System-Resident Cell Types from Adult Autoimmune Encephalomyelitis Mice. *JoVE*. 2023;(200):65735. doi:10.3791/65735

73. Intisar A, Lee SJ, Kim YG, et al. A fully automated primary neuron purification system using continuous centrifugal microfluidics. *Lab Chip*. 2022;22(17):3268-3276. doi:10.1039/d2lc00381c

74. Lohani V, A.R A, Kundu S, Akhter MQ, Bag S. Single-Cell Proteomics with Spatial Attributes: Tools and Techniques. *ACS Omega*. 2023;8(20):17499-17510. doi:10.1021/acsomega.3c00795

75. Schmit T, Klomp M, Khan MN. An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. *Methods Mol Biol*. 2021;2223:169-182. doi:10.1007/978-1-0716-1001-5_13

76. Scott N, Witt K, Schober JM. A simplified procedure for isolation of primary murine microglia. *Biotechniques*. 2022;73(6):273-279. doi:10.2144/btn-2022-0054

77. Mazuir E, Dubessy AL, Wallon L, Aigrot MS, Lubetzki C, Sol-Foulon N. Generation of Oligodendrocytes and Oligodendrocyte-Conditioned Medium for Co-Culture Experiments. *J Vis Exp*. 2020;(156). doi:10.3791/60912

78. Agalave NM, Lane BT, Mody PH, Szabo-Pardi TA, Burton MD. Isolation, culture, and downstream characterization of primary microglia and astrocytes from adult rodent brain and spinal cord. *J Neurosci Methods*. 2020;340:108742. doi:10.1016/j.jneumeth.2020.108742

79. Bittner S, Bauer MA, Ehling P, et al. The TASK1 channel inhibitor A293 shows efficacy in a mouse model of multiple sclerosis. *Experimental Neurology*. 2012;238(2):149-155. doi:10.1016/j.expneurol.2012.08.021

80. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. *JoVE*. 2014;(86):51275. doi:10.3791/51275

81. Hasselmann JPC, Karim H, Khalaj AJ, Ghosh S, Tiwari-Woodruff SK. Consistent induction of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in

- C57BL/6 mice for the longitudinal study of pathology and repair. *Journal of Neuroscience Methods*. 2017;284:71-84. doi:10.1016/j.jneumeth.2017.04.003
82. Göbel K, Asaridou CM, Merker M, et al. Plasma kallikrein modulates immune cell trafficking during neuroinflammation via PAR2 and bradykinin release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(1):271-276. doi:10.1073/pnas.1810020116
83. Ballerini C. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. In: Annunziato F, Maggi L, Mazzoni A, eds. *T-Helper Cells*. Vol 2285. Methods in Molecular Biology. Springer US; 2021:375-384. doi:10.1007/978-1-0716-1311-5_27
84. Birmpili D, Charmorke Askar I, Bigaut K, Bagnard D. The Translatability of Multiple Sclerosis Animal Models for Biomarkers Discovery and Their Clinical Use. *IJMS*. 2022;23(19):11532. doi:10.3390/ijms231911532
85. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS): EAE as model for MS. *British Journal of Pharmacology*. 2011;164(4):1079-1106. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
86. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *European Journal of Pharmacology*. 2015;759:182-191. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.042
87. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol*. 2011;12(3):255-263. doi:10.1038/ni.1993
88. Jakimovski D, Bittner S, Zivadinov R, et al. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2024;403(10422):183-202. doi:10.1016/S0140-6736(23)01473-3
89. Delarasse C, Smith P, Baker D, Amor S. Novel pathogenic epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein induce experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Immunology*. 2013;140(4):456-464. doi:10.1111/imm.12155
90. Shenderov K, Barber DL, Mayer-Barber KD, et al. Cord factor and peptidoglycan recapitulate the Th17-promoting adjuvant activity of mycobacteria through mincle/CARD9 signaling and the inflammasome. *J Immunol*. 2013;190(11):5722-5730. doi:10.4049/jimmunol.1203343
91. Dredge K, Marriott JB, Todryk SM, Dalglish AG. Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2002;51(10):521-531. doi:10.1007/s00262-002-0309-z
92. Tigno-Aranjuez JT, Jaini R, Tuohy VK, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Encephalitogenicity of complete Freund's adjuvant relative to CpG is linked to induction

- of Th17 cells. *J Immunol*. 2009;183(9):5654-5661. doi:10.4049/jimmunol.0900645
93. van Aalst S, Ludwig IS, van Kooten PJS, van der Zee R, van Eden W, Broere F. Dynamics of APC recruitment at the site of injection following injection of vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2017;35(12):1622-1629. doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.005
94. Smith AJ, Liu Y, Peng H, Beers R, Racke MK, Lovett-Racke AE. Comparison of a classical Th1 bacteria versus a Th17 bacteria as adjuvant in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2011;237(1-2):33-38. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.05.012
95. Jaric I, Voelkl B, Clerc M, et al. The rearing environment persistently modulates mouse phenotypes from the molecular to the behavioural level. Lino De Oliveira C, ed. *PLoS Biol*. 2022;20(10):e3001837. doi:10.1371/journal.pbio.3001837
96. Voelkl B, Altman NS, Forsman A, et al. Reproducibility of animal research in light of biological variation. *Nat Rev Neurosci*. 2020;21(7):384-393. doi:10.1038/s41583-020-0313-3
97. Mina Nashed. Purification of Murine B Cells. Published online 2023. Nashed, M. (2023). Purification of Murine B Cells. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-63c551122a916317ee625810-purification-of-murine-b-cells>
98. Dedoni S, Scherma M, Camoglio C, et al. An overall view of the most common experimental models for multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease*. 2023;184:106230. doi:10.1016/j.nbd.2023.106230
99. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018;141(7):2066-2082. doi:10.1093/brain/awy151
100. Fransen NL, Hsiao CC, Van Der Poel M, et al. Tissue-resident memory T cells invade the brain parenchyma in multiple sclerosis white matter lesions. *Brain*. 2020;143(6):1714-1730. doi:10.1093/brain/awaa117
101. Veroni C, Aloisi F. The CD8 T Cell-Epstein-Barr Virus-B Cell Dialogue: A Central Issue in Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Front Immunol*. 2021;12:665718. doi:10.3389/fimmu.2021.665718
102. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *The American Journal of Pathology*. 2008;172(1):146-155. doi:10.2353/ajpath.2008.070690

103. Carbajal KS, Mironova Y, Ulrich-Lewis JT, et al. Th Cell Diversity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2015;195(6):2552-2559. doi:10.4049/jimmunol.1501097
104. Pozzilli C, Pugliatti M, Vermersch P, et al. Diagnosis and treatment of progressive multiple sclerosis: A position paper. *Euro J of Neurology*. 2023;30(1):9-21. doi:10.1111/ene.15593
105. Ocañas SR, Pham KD, Blankenship HE, Machalinski AH, Chucair-Elliott AJ, Freeman WM. Minimizing the *Ex Vivo* Confounds of Cell-Isolation Techniques on Transcriptomic and Translatomic Profiles of Purified Microglia. *eNeuro*. 2022;9(2):ENEURO.0348-21.2022. doi:10.1523/ENEURO.0348-21.2022
106. Sutermaister BA, Darling EM. Considerations for high-yield, high-throughput cell enrichment: fluorescence versus magnetic sorting. *Sci Rep*. 2019;9(1):227. doi:10.1038/s41598-018-36698-1
107. Liao X, Makris M, Luo XM. Fluorescence-activated Cell Sorting for Purification of Plasmacytoid Dendritic Cells from the Mouse Bone Marrow. *J Vis Exp*. 2016;(117):54641. doi:10.3791/54641
108. Yan H, Ding C guang, Tian P xun, et al. Magnetic cell sorting and flow cytometry sorting methods for the isolation and function analysis of mouse CD4+ CD25+ Treg cells. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009;10(12):928-932. doi:10.1631/jzus.B0920205
109. Herron S, Delpech JC, Madore C, Ikezu T. Using mechanical homogenization to isolate microglia from mouse brain tissue to preserve transcriptomic integrity. *STAR Protocols*. 2022;3(4):101670. doi:10.1016/j.xpro.2022.101670
110. Bohlen CJ, Bennett FC, Bennett ML. Isolation and Culture of Microglia. *Curr Protoc Immunol*. 2019;125(1):e70. doi:10.1002/cpim.70
111. Bohlen CJ, Bennett FC, Tucker AF, Collins HY, Mulinyawe SB, Barres BA. Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron*. 2017;94(4):759-773.e8. doi:10.1016/j.neuron.2017.04.043
112. Swire M, French-Constant C. Oligodendrocyte–Neuron Myelinating Coculture. In: Lyons DA, Kegel L, eds. *Oligodendrocytes*. Vol 1936. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2019:111-128. doi:10.1007/978-1-4939-9072-6_7
113. Facci L, Barbierato M, Skaper SD. Astrocyte/Microglia Cocultures as a Model to Study Neuroinflammation. In: Skaper SD, ed. *Neurotrophic Factors*. Vol 1727. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2018:127-137. doi:10.1007/978-1-4939-

7571-6_10

114. Wang Z, Zhang Y, Li Z, Wang H, Li N, Deng Y. Microfluidic Brain-on-a-Chip: From Key Technology to System Integration and Application. *Small*. 2023;19(52):e2304427. doi:10.1002/sml.202304427

115. Jarrah R, Nathani KR, Bhandarkar S, et al. Microfluidic “brain-on chip” systems to supplement neurological practice: development, applications and considerations. *Regen Med*. 2023;18(5):413-423. doi:10.2217/rme-2022-0212

116. Cerutti L, Brofiga M. Unraveling brain diseases: The promise of brain-on-a-chip models. *J Neurosci Methods*. 2024;405:110105. doi:10.1016/j.jneumeth.2024.110105

117. Kilic O, Pamies D, Lavell E, et al. Brain-on-a-chip model enables analysis of human neuronal differentiation and chemotaxis. *Lab Chip*. 2016;16(21):4152-4162. doi:10.1039/c6lc00946h

118. Prael LS, Stanslaski MR, Vargas P, Piel M, Odde DJ. Predicting Confined 1D Cell Migration from Parameters Calibrated to a 2D Motor-Clutch Model. *Biophys J*. 2020;118(7):1709-1720. doi:10.1016/j.bpj.2020.01.048

119. Robinson AP, Rodgers JM, Goings GE, Miller SD. Characterization of oligodendroglial populations in mouse demyelinating disease using flow cytometry: clues for MS pathogenesis. *PLoS One*. 2014;9(9):e107649. doi:10.1371/journal.pone.0107649

120. Dincman TA, Beare JE, Ohri SS, Whittemore SR. Isolation of cortical mouse oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci Methods*. 2012;209(1):219-226. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.06.017

121. Samal SK, Sharma M, Sarma JD. Isolation and Enrichment of Major Primary Neuroglial Cells from Neonatal Mouse Brain. *Bio Protoc*. 2024;14(2):e4921. doi:10.21769/BioProtoc.4921

122. Hou J, Bi H, Ye Z, et al. Pen-2 Negatively Regulates the Differentiation of Oligodendrocyte Precursor Cells into Astrocytes in the Central Nervous System. *J Neurosci*. 2021;41(23):4976-4990. doi:10.1523/JNEUROSCI.2455-19.2021

123. Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. Inflammatory Cell Migration into the Central Nervous System: A Few New Twists on an Old Tale. *Brain Pathology*. 2007;17(2):243-250. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00067.x

124. Pennati A, Nysten EA, Duncan ID, Galipeau J. Regulatory B Cells Normalize CNS Myeloid Cell Content in a Mouse Model of Multiple Sclerosis and Promote Oligodendrogenesis and Remyelination. *J Neurosci*. 2020;40(26):5105-5115.

doi:10.1523/JNEUROSCI.2840-19.2020

125. Greter M, Lelios I, Croxford AL. Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol*. 2015;6. doi:10.3389/fimmu.2015.00249
126. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology*. 2016;233(9):1637-1650. doi:10.1007/s00213-016-4218-9
127. Li Q, Lan X, Han X, Wang J. Expression of Tmem119/Sall1 and Ccr2/CD69 in FACS-Sorted Microglia- and Monocyte/Macrophage-Enriched Cell Populations After Intracerebral Hemorrhage. *Front Cell Neurosci*. 2019;12:520. doi:10.3389/fncel.2018.00520
128. Mercurio D, Fumagalli S, Schafer MKH, et al. Protein Expression of the Microglial Marker Tmem119 Decreases in Association With Morphological Changes and Location in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:820127. doi:10.3389/fncel.2022.820127
129. Ruan C, Elyaman W. A New Understanding of TMEM119 as a Marker of Microglia. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:902372. doi:10.3389/fncel.2022.902372
130. Gómez Morillas A, Besson VC, Lerouet D. Microglia and Neuroinflammation: What Place for P2RY12? *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1636. doi:10.3390/ijms22041636
131. Bollinger JL, Dadosky DT, Flurer JK, Rainer IL, Woodburn SC, Wohleb ES. Microglial P2Y12 mediates chronic stress-induced synapse loss in the prefrontal cortex and associated behavioral consequences. *Neuropsychopharmacology*. 2023;48(9):1347-1357. doi:10.1038/s41386-022-01519-7
132. Doughty D, Rajpurohit SK, Trang A, et al. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2022;247(16):1433-1446. doi:10.1177/15353702221096060
133. Zhao XF, Alam MM, Liao Y, et al. Targeting Microglia Using Cx3cr1-Cre Lines: Revisiting the Specificity. *eNeuro*. 2019;6(4):ENEURO.0114-19.2019. doi:10.1523/ENEURO.0114-19.2019
134. Kantzer CG, Boutin C, Herzig ID, et al. Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes: Kantzer et al. *Glia*. 2017;65(6):990-1004. doi:10.1002/glia.23140
135. Peterson IL, Thompson AD, Scholpa NE, Largent-Milnes T, Schnellmann RG. Isolation and monoculture of functional primary astrocytes from the adult mouse spinal cord. *Front Neurosci*. 2024;18:1367473. doi:10.3389/fnins.2024.1367473

136. Iwasaki R, Kohro Y, Tsuda M. A method for selective and efficient isolation of gray matter astrocytes from the spinal cord of adult mice. *Mol Brain*. 2024;17(1):25. doi:10.1186/s13041-024-01097-3
137. Jungblut M, Tiveron MC, Barral S, et al. Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia*. 2012;60(6):894-907. doi:10.1002/glia.22322
138. Balouch B, Funnell JL, Ziemba AM, et al. Conventional immunomarkers stain a fraction of astrocytes in vitro: A comparison of rat cortical and spinal cord astrocytes in naïve and stimulated cultures. *J Neurosci Res*. 2021;99(3):806-826. doi:10.1002/jnr.24759
139. Takizawa T, Gudla PR, Guo L, Lockett S, Misteli T. Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. *Genes Dev*. 2008;22(4):489-498. doi:10.1101/gad.1634608
140. Brenner M, Messing A. Regulation of GFAP Expression. *ASN Neuro*. 2021;13:1759091420981206. doi:10.1177/1759091420981206
141. Monteiro R, Sivasubramanian MK, Balasubramanian P, Subramanian M. Obesity-Induced Sympathoexcitation is Associated with Glial Senescence in the Brainstem. *The FASEB Journal*. 2020;34(S1):1-1. doi:10.1096/fasebj.2020.34.s1.06223
142. Berl S, Karram K, Scheller A, Jungblut M, Kirchhoff F, Waisman A. Enrichment and isolation of neurons from adult mouse brain for ex vivo analysis. *Journal of Neuroscience Methods*. 2017;283:15-22. doi:10.1016/j.jneumeth.2017.03.015
143. Li S, Chang L, Teissie J, eds. *Electroporation Protocols: Mircroorganism, Mammalian System, and Nanodevice*. Third edition. Humana Press; 2020.
144. Leong C, Zhai D, Kim B, Yun SW, Chang YT. Neural stem cell isolation from the whole mouse brain using the novel FABP7-binding fluorescent dye, CDr3. *Stem Cell Research*. 2013;11(3):1314-1322. doi:10.1016/j.scr.2013.09.002
145. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al. Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Experimental Neurology*. 2007;205(2):547-562. doi:10.1016/j.expneurol.2007.03.021
146. Elia G. Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics*. 2008;8(19):4012-4024. doi:10.1002/pmic.200800097
147. Rayaprolu S, Bitarafan S, Santiago JV, et al. Cell type-specific biotin labeling in vivo resolves regional neuronal and astrocyte proteomic differences in mouse brain.

Nat Commun. 2022;13(1):2927. doi:10.1038/s41467-022-30623-x

148. Mao SY. Biotinylation of Antibodies. In: Oliver C, Jamur MC, eds. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Vol 588. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2010:49-52. doi:10.1007/978-1-59745-324-0_7
149. Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood–brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *Journal of Experimental Medicine*. 2020;217(4):e20190062. doi:10.1084/jem.20190062
150. Rangaraju S, Raza SA, Li NX, et al. Differential Phagocytic Properties of CD45^{low} Microglia and CD45^{high} Brain Mononuclear Phagocytes—Activation and Age-Related Effects. *Front Immunol*. 2018;9:405. doi:10.3389/fimmu.2018.00405
151. Van Langelaar J, Rijvers L, Smolders J, Van Luijn MM. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front Immunol*. 2020;11:760. doi:10.3389/fimmu.2020.00760
152. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, Van Der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry Pt A*. 2019;95(6):647-654. doi:10.1002/cyto.a.23724
153. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, et al. CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol*. 2022;13:816005. doi:10.3389/fimmu.2022.816005
154. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol*. 2020;38(1):541-566. doi:10.1146/annurev-immunol-042718-041717
155. Walker LSK. CD4⁺ CD25⁺ Treg: divide and rule? *Immunology*. 2004;111(2):129-137. doi:10.1111/j.0019-2805.2003.01788.x
156. Duffy SS, Keating BA, Moalem-Taylor G. Adoptive Transfer of Regulatory T Cells as a Promising Immunotherapy for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Front Neurosci*. 2019;13:1107. doi:10.3389/fnins.2019.01107
157. Miller BC, Maus MV. CD19-Targeted CAR T Cells: A New Tool in the Fight against B Cell Malignancies. *Oncol Res Treat*. 2015;38(12):683-690. doi:10.1159/000442170
158. Lee DSW, Rojas OL, Gommerman JL. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(3):179-199. doi:10.1038/s41573-020-00092-2
159. Liu R, Du S, Zhao L, et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis:

- Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol.* 2022;13:996469.
doi:10.3389/fimmu.2022.996469
160. Beliën J, Goris A, Matthys P. Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis: Entering the Stage. *Front Immunol.* 2022;13:869447. doi:10.3389/fimmu.2022.869447
161. Kucuksezer UC, Aktas Cetin E, Esen F, et al. The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:622306.
doi:10.3389/fimmu.2021.622306
162. Poltorak MP, Schraml BU. Fate Mapping of Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2015;6. doi:10.3389/fimmu.2015.00199
163. Huleatt JW, Lefrançois L. Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo. *J Immunol.* 1995;154(11):5684-5693.
164. Drutman SB, Kendall JC, Trombetta ES. Inflammatory Spleen Monocytes Can Upregulate CD11c Expression Without Converting into Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2012;188(8):3603-3610. doi:10.4049/jimmunol.1102741
165. Jiménez-Fernández M, de la Fuente H, Martín P, Cibrián D, Sánchez-Madrid F. Unraveling CD69 signaling pathways, ligands and laterally associated molecules. *EXCLI J.* 2023;22:334-351. doi:10.17179/excli2022-5751

7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Tobias Ruck für die Ermöglichung und die kontinuierliche Betreuung dieses Promotionsprojektes bedanken. Das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine konstruktive Kritik und wissenschaftlichen Ratschläge, die diese Forschungsarbeit maßgeblich geprägt haben, waren von unschätzbarem Wert. Auch für ihre Geduld und die stets ermutigenden Worte möchte ich Ihnen meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt zudem meiner Betreuerin, Dr. Christina Menskes, die nicht nur mein neurowissenschaftliches Verständnis vertieft, sondern mich auch stets motiviert hat, mein Bestes zu geben. Ihre herausragende Unterstützung, sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene, hat mir sehr geholfen, über mich hinaus zu wachsen und meinen wissenschaftlichen Werdegang fortzusetzen. Ohne ihre Unterstützung hätte ich viele Hürden nicht so erfolgreich gemeistert.

Des Weiteren möchte ich Alexander Hermann meinen Dank aussprechen, der mich von Beginn an im Labor anlernte und mich fortlaufend während meiner gesamten Promotionszeit, insbesondere bei der Durchführung des Zellisolationspotokolls, unterstützte. Deine Geduld und Hilfsbereitschaft haben entscheidend zu dem Erfolg dieses Projektes beigetragen. Die Zusammenarbeit mit dir hat mir viel Freude bereitet.

Ebenfalls möchte ich mich von Herzen bei Stefanie Lichtenberg, Vera Dobelmann und Derya Cengiz bedanken. Stefanie Lichtenberg führte die durchflusszytometrische Sortierung der Mikroglia durch und unterstütze mich bei der Durchführung und Auswertung weiterer FACS-Analysen. Vera Dobelmann und Derya Cengiz danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung an all den langen Aufarbeitungstagen. Ihr drei standet stets für einen wissenschaftlichen Austausch sowie wertvollen Rat zur Verfügung und trugt zu einer tollen Arbeitsatmosphäre bei.

Mein Dank gilt zudem auch allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus dem Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität, insbesondere Mary Beyer und Niklas Huntemann, die mich tatkräftig bei meiner Arbeit mit den Versuchstieren unterstützt und in stressigen Zeiten ausgeholfen haben. Ihr Beitrag ist nicht zu unterschätzen.

Der Jürgen Manchot Stiftung möchte ich darüber hinaus ebenfalls meinen Dank aussprechen, die mich ein Jahr lang im Rahmen dieser Promotionsarbeit großzügig unterstützt hat.

Mein größter Dank gilt schließlich meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunden, die mir mit ihrer Liebe, ihrem Verständnis und ihrer Geduld den Rücken gestärkt haben. Ihr habt mich stets ermutigt und mir die notwendige Ruhe und Motivation gegeben, um dieses Projekt erfolgreich abzuschließen.