

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktion: Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld,  
Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner

# Mechanismen axonaler Kalziumdynamiken im Tiermodell der Multiplen Sklerose



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

vorgelegt von  
Christoph Friedrich Mahler  
aus Stuttgart

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Frank Weber  
Prof. Dr. Peter Nelson  
Prof. Dr. Hans-Walter Pfister

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2019



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	5
1.1. Multiple Sklerose .....	5
1.1.1. Epidemiologie .....	5
1.1.2. Immunologie .....	6
1.1.3. Diagnose, Verlauf und Therapie .....	11
1.1.4. Pathologie .....	13
1.1.5. Pathomechanismen der Axonschädigung .....	16
1.2. Die EAE als Tiermodell der Multiplen Sklerose .....	21
1.3. Methoden zur Untersuchung der Axondegeneration in der EAE .....	22
1.3.1. Multiphotonen-Mikroskopie des Zentralen Nervensystems .....	23
1.3.2. In-vivo Ca <sup>2+</sup> -Mikroskopie und genetische Ca <sup>2+</sup> -Sensoren .....	26
2. Material und Methoden .....	28
2.1. Reagenzien .....	28
2.1.1. Pharmakologische Wirkstoffe und Lösungen .....	28
2.1.2. Immunisierung .....	29
2.2. Materialien .....	30
2.2.1. Chirurgisches Material und Werkzeug .....	30
2.3. Technische Geräte .....	31
2.3.1. Chirurgie .....	31
2.3.2. Mikroskopie .....	31
2.3.3. Daten-Analyse / Software .....	31
2.3.4. Versuchstiere .....	32
2.4. Methoden .....	32
2.4.1. Induktion der EAE .....	32
2.4.2. Chirurgische Techniken .....	33
2.4.3. In-vivo Mikroskopie des Rückenmarks .....	33
2.4.4. Datenanalyse .....	34
3. Zusammenfassung relevanter Vorergebnisse unserer Arbeitsgruppe .....	35
4. Ziele der Studie .....	37
5. Ergebnisse .....	38
5.1. Quellen des intra-axonalen Ca <sup>2+</sup> .....	38

5.1.1. EGTA verzögert die fokale Axondegeneration .....	38
5.1.2. EGTA beeinflusst $[Ca^{2+}]_{cyt}$ im gesunden Tier nicht .....	39
5.2. Mediatoren der fokalen Axondegeneration.....	39
5.2.1. Glutamat bewirkt keinen Anstieg der axonalen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ .....	40
5.2.2. Azidose bewirkt keinen Anstieg der axonalen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ .....	42
5.2.3. Asic1-knock-out bewirkt keine „Neuroprotektion“ in EAE .....	43
5.2.4. ROS/RNS bewirkt einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ .....	44
5.3. ROS/RNS als Modell der immunmedierten Axondegeneration .....	45
5.3.1. L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanalblocker .....	46
5.3.2. $Na^+/Ca^{2+}$ Austausch in RNS-medierter Axonschädigung.....	46
5.3.3. Spezifische Blockade des Umkehrmodus des $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers .....	47
5.4. Therapiestudie mit Bepridil in EAE .....	47
6. Diskussion .....	49
6.1. Zusammenfassung.....	49
6.2. Stärken und Grenzen der eingesetzten Methoden.....	49
6.2.1. Technische Betrachtung der $Ca^{2+}$ -2-Photonenmikroskopie .....	49
6.2.2. Technische Aspekte der Wirkstoffapplikation in EAE.....	51
6.2.3. Stärken und Limitationen des EAE-Tiermodells .....	53
6.3. Die Rolle von $Ca^{2+}$ in der FAD.....	54
6.4. Quellen des axonalen $Ca^{2+}$ - Einstroms .....	55
6.5. Mechanismen des axonalen $Ca^{2+}$ -Einstroms.....	58
6.5.1. Glutamat .....	58
6.5.2. pH-sensitive Ionenkanäle .....	60
6.5.3. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies .....	61
6.5.4. Mitochondrien und virtuelle Hypoxie .....	63
6.5.5. Membranschädigung .....	64
7. Schlussfolgerung und Ausblick.....	68
8. Abschließender Kommentar .....	70
9. Literaturverzeichnis .....	72
10. Eidesstattliche Versicherung.....	96
11. Danksagung .....	97
12. Lebenslauf.....	98

## Kapitel 1: Einleitung

### 1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine primär entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems. Bei einem Großteil der Patienten manifestiert sich die Erkrankung erstmalig im jungen Erwachsenenalter mit einem schubförmigen Erkrankungsverlauf. Mit zunehmender Erkrankungsdauer geht dieser häufig in einen progredienten Verlauf mit akkumulierender neurologischer Funktionsstörung über (Compston and Coles 2008). Bildmorphologisch in MRT und Histologie ist die MS durch Plaques der weißen Substanz mit Demyelinisierung, relativem Axonerhalt und reaktiver Gliose gekennzeichnet (McAlpine and Compston 2005).

Die Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose konnte in den letzten Jahren maßgebliche Fortschritte erzielen (Ontaneda, Hyland, and Cohen 2012). Durch die eskalierende immunmodulierende Therapie wird eine substantielle Schubratenreduktion erreicht (Sedal, Wilson, and McDonald 2014). Dennoch kommt es auch unter Behandlung mit hochaktiven Präparaten weiterhin zu einer schleichenden Progression der MS (Tur and Montalban 2017; Wundes et al. 2017).

Welche zugrundeliegenden Mechanismen den Krankheitsprozess antreiben und wie es dabei zur Schädigung von Nervenzellen kommt, ist nur unvollständig verstanden. Im Folgenden werden für die vorliegende Arbeit relevante Hypothesen zur Genese und Pathophysiologie der MS dargestellt. Basierend darauf werde ich die Methoden und Ergebnisse meiner Untersuchungen zur Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamiken bei der Axondegeneration im Tiermodell der MS beschreiben. Abschließend sollen diese Ergebnisse in Zusammenschau mit weiteren Befunden unserer eigenen und anderer Arbeitsgruppen eingeordnet und mögliche nächste experimentelle Schritte zu einem besseren Verständnis der MS-spezifischen neurodegenerativen Prozesse erläutert werden.

#### 1.1.1 Epidemiologie

Weltweit sind ungefähr 2,3 Millionen Menschen von der Multiplen Sklerose betroffen (Browne et al. 2014). Bei einer Prävalenz von 289 pro 100.000 Versicherten in Deutschland (Petersen et al. 2014) liegt der Inzidenzgipfel bei einem Alter von 30 Jahren (Koch-Henriksen and Sørensen 2010). Hierbei sind Frauen in etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer (Petersen et al. 2014). Der Beginn der progredienten Verlaufsform liegt dagegen etwa 10 Jahre später und betrifft Frauen und Männer etwa gleich häufig (Antel et al. 2012).

Die genauen Ursachen der Multiplen Sklerose sind bis heute unbekannt. Aus Studien bei eineiigen Zwillingspaaren mit Multipler Sklerose wissen wir, dass der genetischen Prädisposition ein Risikoanteil um 30% zukommt (Handunnetthi, Handel, and Ramagopalan 2010). Dabei besteht das Risiko unabhängig vom Verlaufstyp der Multiplen Sklerose. Innerhalb derselben Familie können verschiedene Verläufe auftreten (Weinshenker et al. 1990).

Neben genetischen Risikofaktoren spielen Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle für das Auftreten der Multiplen Sklerose. So bestehen bemerkenswerte geographische Unterschiede für die MS-Prävalenz. Dabei nimmt die Häufigkeit der MS mit der geographischen Entfernung vom Äquator zu (Simpson et al. 2011). Während die MS in äquatornahen Regionen selten auftritt, ist die Häufigkeit in nördlichen Regionen höher. Eine mögliche Interpretation dieser Beobachtung ist eine Korrelation des MS-Risikos zur Sonneneinstrahlung bzw. zum Serum-Vitamin-D Spiegel (Simpson et al. 2010).

### 1.1.2 Immunologie

Das zentrale Nervensystem gilt aufgrund seiner spezifischen immunologischen Eigenschaften als immunprivilegiertes Organ. So ist der Eintritt von Zellen der adaptiven Immunantwort in das zentrale Nervensystem über die Blut-Hirnschranke, die Blut-Liquor-Schranke und die Liquor-Hirn-Schranke eng kontrolliert (Bechmann, Galea, and Hugh Perry 2007; Korn and Kallies 2017).

Desweiteren findet die Expression von MHC-Molekülen innerhalb des ZNS Gewebes nur in beschränktem Umfang statt (Williams et al. 1980). Drittens repräsentiert das Antigen-Repertoire in den peripheren Lymphknoten aufgrund der speziellen Eigenschaften des Lymphabflusses im ZNS nicht das gesamte Antigen-Spektrum im zentralen Nervensystem (Galea, Bechmann, and Hugh Perry 2007). Folglich ist das adaptive Immunsystem naiv gegenüber einer Vielzahl von Antigenen, die im Hirngewebe exprimiert werden.

Kommt es nun im Rahmen viraler Infektionen zum Übertritt von ZNS-Antigenen in die das ZNS-drainierenden Lymphknoten, so kann es möglicherweise in der Konsequenz zur unkontrollierten Aktivierung von T-Zellen gegen diese körpereigenen Antigene kommen.

Zusätzlich patrouillieren T-Zellen in den umgebenden Gefäßen und Lymphabflussbahnen, um beispielsweise virale Infektionen frühzeitig zu erkennen und einzudämmen. In diesem fein austarierten Milieu muss die adaptive Immunantwort im ZNS reguliert werden, um das richtige Maß zwischen Infektionskontrolle und immunvermitteltem Schaden aufrechtzuerhalten (Korn and Kallies 2017).

Dieses Gleichgewicht ist bei der Multiplen Sklerose gestört, sodass es zu einer übermäßigen Aktivierung des Immunsystems kommt und Entzündungszellen, insbesondere Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen ins ZNS einwandern. Wir wollen im Folgenden die

Argumente für eine entscheidende Rolle des adaptiven und angeborenen Immunsystems bei der MS näher betrachten.

### *Genetik*

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)(Baranzini and Oksenberg 2017) geben Hinweise auf ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren und einem komplexen genetischen Risikoprofil für die Entwicklung einer zellulär vermittelten Entzündungsreaktion in der Ätiologie der Multiplen Sklerose.

Innerhalb der letzten 10 Jahre wurden anhand von GWAS mehr als 200 Gen-Loci beschrieben, die unabhängig voneinander zur Pathogenese der MS beitragen (Baranzini and Oksenberg 2017). So gelang der Nachweis, dass insbesondere Klasse II HLA (Human Leucozyte-Antigen)-Gene (Moutsianas et al. 2015) das Risiko beeinflussen, eine Multiple Sklerose zu entwickeln. Beispielsweise ist das Gen HLA-DRB1\*1501, welches für ein MHC-Restriktions-Element von CD4-T-Zellen kodiert, mit einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken assoziiert. Aber auch Mutationen sogenannter Non-HLA Risiko-Gene wie beispielsweise TNFSF13B für das Zytokin Baff, welches die B-Zell Differenzierung fördert, sind mit immunologischen Funktionen assoziiert (Moutsianas et al. 2015; Steri et al. 2017).

### *Risikofaktoren*

Neben den genetischen Ursachen für die Entstehung einer Multiplen Sklerose geben auch die relevanten Umweltfaktoren Hinweise auf eine immunologische Genese. Insbesondere für eine stattgehabte EBV-Infektion, einen Vitamin-D-Mangel und das vermehrte Rauchen ist ein erhöhtes MS-Erkrankungsrisiko belegt (Munger and Ascherio 2007).

So ist die Assoziation von Sonnenlichtexposition und MS möglicherweise dadurch bedingt, dass unter UV-B-Strahlung mehr aktives Vitamin D (1,24 dihydroxyvitamin D3) gebildet wird. Das so aktivierte Vitamin-D hemmt die Reifung und Aktivierung antigenpräsentierender Zellen und verringert die Wahrscheinlichkeit, autoreaktive Zellen durch Präsentation von Autoantigenen zu aktivieren (Széles et al. 2009). Die Tatsache, dass neben einer verminderten Sonnenexposition auch genetische CYP27B1 Varianten mit einem erhöhten MS-Risiko assoziiert sind, veranschaulicht, dass sowohl Umweltfaktoren als auch die Genetik über eine gemeinsame Endstrecke, die Modifikation des Immunsystems, das MS-Risiko beeinflussen.

Des Weiteren geben große Kohortenstudien Hinweise darauf, dass eine vorausgegangene EBV-Infektion das Entstehen einer Multiplen Sklerose begünstigt (Levin et al. 2010). Ebenso stellt ein regelmäßiger Nikotinabusus einen eigenständigen Risikofaktor dar (Ramagopalan et al. 2010).

Zusätzlich werden Triggerfaktoren von Erkrankungsschüben und ihr Zusammenspiel mit dem Immunsystem diskutiert. Hierzu zählen insbesondere vermehrter Stress, Leben-

dimpfungen, Infektionen und ein niedriger Vitamin-D-Spiegel im Serum. Aus Tierstudien gibt es Hinweise, dass neben diesen Faktoren die Zusammensetzung der Mikrobiota im Magen-Darm-Trakt eine Rolle in der Entstehung der Multiplen Sklerose spielen könnte (Koch et al. 2013). Dabei konnten Berer und Kollegen zeigen, dass nach Transfer humaner Mikrobiota aus MS-Patienten eine spontane EAE signifikant häufiger auftrat, als nach Transfer aus deren eineiigen, für die MS diskordanten Zwillingen (Berer et al. 2017; Hindson 2017).

Zusammenfassend halten wir fest, dass die exakten Auslöser (Trigger) der MS weiterhin unklar sind. Die Pathogenese der MS lässt sich jedoch am besten anhand eines multifaktoriellen Modells erklären, welches genetische, infektiöse (z.B. Epstein-Barr-Virus (EB-V)-Infektion) und Umweltfaktoren (z.B. Sonnenexposition und Rauchen) mit einbezieht. Dabei deuten ein Großteil dieser Faktoren auf eine gemeinsame Endstrecke im Sinne einer Modulation des Immunsystems hin, sodass das fein austarierte Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Kontrolle der Immunantwort gestört wird.

### *Immuntherapien*

Die Daten zur Assoziation von MS-Risikogenen mit der Regulation des adaptiven Immunsystems und immunmodulierenden Umweltfaktoren spiegeln sich auch in der hohen Wirksamkeit neuer, gegen B- und T-Zellen gerichteter Therapien wieder (Tabelle 1) (Hemmer, Kerschensteiner, and Korn 2015). Diese Therapien führen nicht nur zu einer deutlichen Reduktion der entzündlichen Aktivität im ZNS, sondern auch zu einer effekti-

**Tabelle 1: Hochaktive Therapien modulieren das angeborene Immunsystem** (basierend auf Hemmer, Kerschensteiner, and Korn 2015)

<b>Wirkstoff</b>	<b>Mechanismus</b>	<b>Ziel</b>
Natalizumab	Verhindert die Migration von Lymphozyten in das Gehirn durch Inhibition des $\alpha 4\beta 1$ -Integrins	$CD4^+$ T-Zellen > B-Zellen > $CD8^+$ T-Zellen
Fingolimod	Verhindert Auswanderung von Lymphozyten aus den Lymphknoten durch Modulation des S1P-Rezeptors	$CD4^+$ T-Zellen > B-Zellen
Alemtuzumab	Depletiert $CD52^+$ Zellen in der Peripherie	$CD4^+$ T-Zellen > $CD8^+$ T-Zellen > B-Zellen > Monozyten/NK-Zellen
Rituximab	Depletiert $CD20^+$ Zellen	B-Zellen
Daclizumab	CD-25 Antikörper vermindert T-Zellantwort und expandiert $CD56^+$ NK-Zellen	T-Zellen, NK-Zellen
Plasmapherese	Vermindert zirkulierende Immunglobulin Level durch Adsorption	Immunglobuline

ven Schubratenreduktion.

Daraus lässt sich folgern, dass die histopathologisch beobachtete Infiltration und Aktivierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems eine entscheidende Rolle für die Demyelinisierung und den Verlust von Axonen in entzündlichen MS-Läsionen und damit für die Genese der klinischen Symptome spielt.

#### *Mögliche Szenarien für die Initiation der Immunantwort*

Trotz der Hinweise auf eine zentrale Rolle des Immunsystems bei der Entstehung der Multiplen Sklerose ist nicht vollständig geklärt, warum ausschließlich das zentrale Nervensystem betroffen ist und gegen welche Zielantigene sich die Immunantwort richtet.

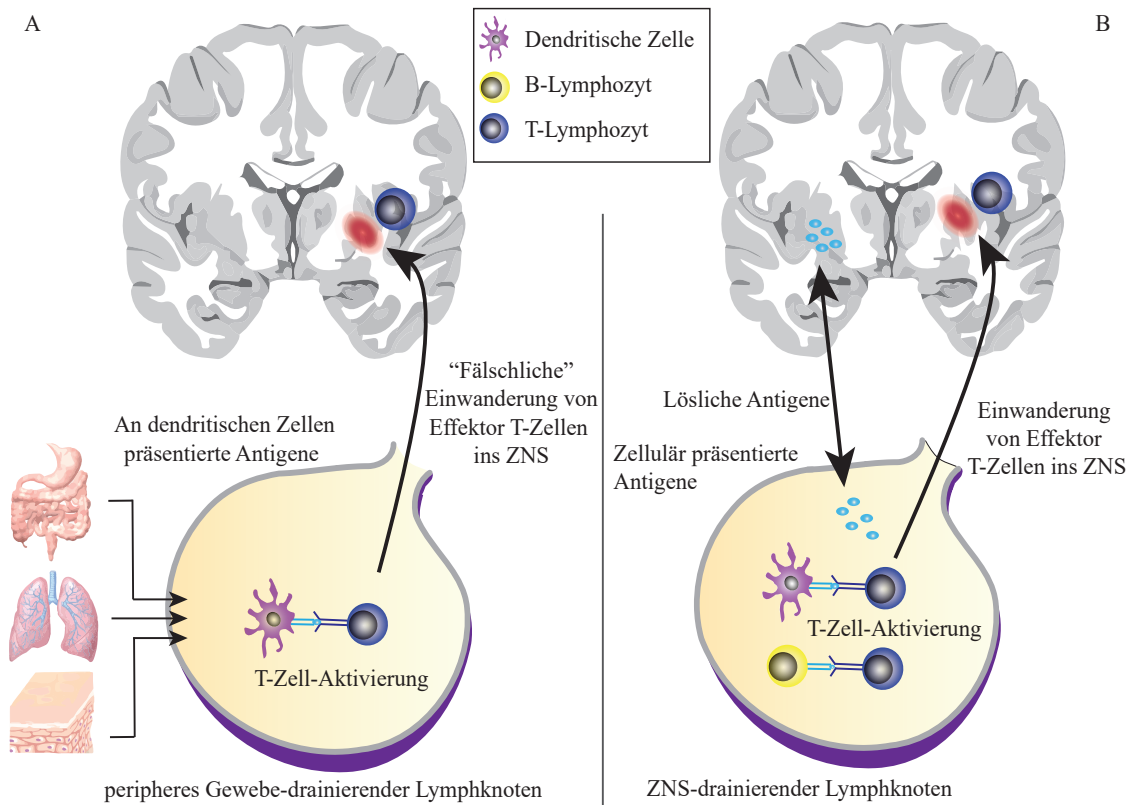
Für die Annahme, dass sich die initiale Immunantwort gegen einzelne Antigene im ZNS richtet, sprechen die Untersuchungen an T-Zellen von Patienten mit Multipler Sklerose. Anhand von hochparalleler Sequenzierung (*deep sequencing*) des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Repertoires in Liquor und Serum wurde gezeigt, dass bei MS-Patienten eine höhere Diversität des TCR-Repertoires vorlag, zusätzlich war dabei die Häufigkeit klonaler TCR-Expansion deutlich erhöht. Gegenüber dem Serum waren die stark expandierten T-Zell-Klone selektiv im Liquor-Raum angereichert. Zusammengefasst weisen diese Daten auf eine antigen- und kompartimentspezifische T-Zell-Expansion bei MS-Patienten hin (de Paula Alves Sousa et al. 2016; Junker et al. 2007).

Zusätzlich sprechen Befunde aus dem Tiermodell für eine entscheidende Rolle der peripheren T-Zell-Aktivierung: Tiere, welche humane Myelin-spezifische T-Zellen und die korrespondierenden HLA-Moleküle exprimieren, entwickeln eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)(Quandt et al. 2012, 2004; Madsen et al. 1999), die in wesentlichen histopathologischen Kriterien der Multiplen Sklerose ähnelt.

Die Zielantigene dieser T-Zellaktivierung bei der Multiplen Sklerose sind nicht bekannt. Da in den entzündlichen ZNS-Läsionen neben der axonalen Degeneration auch eine Schädigung des Myelins und der Oligodendrozyten im Vordergrund steht, stellen axonale und gliale Membranproteine mögliche Kandidaten-Antigene für die Auslösung der Immunantwort dar. Insbesondere Antikörper gegen das Myelin-Oligodendrozytenglykoprotein (MOG) in der Myelinscheide oder Neurofascin am Ranvierschen Schnürring wurden in einzelnen Fallstudien bei MS-Patienten beschrieben (Schirmer, Srivastava, and Hemmer 2014; Mayer and Meisl 2012).

Zusätzlich sprechen auch die liquorspezifischen oligoklonalen Banden (OKBs) als Ausdruck einer Antikörper-Produktion im ZNS für eine Immunantwort gegen bestimmte Antigene (Blauth et al. 2015). Eine weitere wichtige Frage ist, in welchem Kompartiment die Antigenexposition erfolgt. Dabei sind grundsätzlich zwei Szenarien vorstellbar (Hemmer, Kerschensteiner, and Korn 2015):





**Abbildung 1:** Mögliche Szenarien der Initiation der Immunantwort a) „outside-in Hypothese“: Antigene aus dem peripheren Gewebe wie dem Darm, der Lunge oder der Haut aktivieren T-Zellen, die anschließend Ziel-Antigene im ZNS erkennen. Diese Antigene können durch molekulare Mimikry ZNS-Antigenen ähneln oder von Viren produziert werden, die initial eine systemische Infektion verursachen, bevor sie das ZNS infizieren. b) „inside-out“ Hypothese: In ZNS-drainierenden Lymphknoten kommt es zur Aktivierung einer adaptiven Immunantwort gegen ZNS-Antigene und in der Folge zu einer entzündlichen Reaktion im ZNS. In löslicher Form oder an Antigen-präsentierende Zellen gebundene körpereigene Antigene (self-antigens) werden in die ZNS-drainierenden Lymphknoten transportiert und aktivieren dort T-Zellen. Diese migrieren anschließend in das ZNS und lösen dort eine autoimmune Entzündungsreaktion aus. Abbildung basierend auf (Korn and Kallies 2017).

### „Outside-in“-Hypothese

1) Extrinsische Mechanismen führen zu einer initialen autoimmunen Attacke auf das gesunde ZNS (Abbildung 1a). Diese wird beispielsweise durch eine Immunantwort im Sinne eines „molekularen Mimikrys“ getriggert, sodass antigenpräsentierende Zellen (APCs) z.B. durch bakterielle Toll-Like-Rezeptor-Liganden aktiviert werden und das „fremde Antigen“ präsentieren. Anschließend kommt es in den Lymphknoten zu einer systemischen Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Wenn diese über die Blut-Hirn-Schranke ins zentrale Nervensystem einwandern, können sie hier durch eine Antigenpräsentation reaktiviert werden (Kreuzreaktion) und klonal expandieren; dabei locken Th17- und Th1-Zellen durch die Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  und GM-CSF mononukleäre Zellen an, während Th2-Zellen eine Aktivierung von B-Zellen und somit die Stimulation der Antikörperproduktion auslösen (Hemmer, Kerkschensteiner, and Korn 2015).



### *„Inside-out“-Hypothese*

2) In einem alternativen Szenario erfolgt die Initiation der Immunantwort nicht durch ein “Fremdantigen” sondern durch körpereigene Antigene (Abbildung 1b). Dabei geht diese Hypothese davon aus, dass es initial zu einem Untergang von Oligodendrozyten kommt, wodurch die ZNS-residenten Zellen des angeborenen Immunsystems stimuliert werden. Die Migration von APCs in die zervikalen Lymphknoten führt anschließend dort zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen (Hemmer, Kerschensteiner, and Korn 2015). Diese Hypothese stützt sich auf die Beobachtung sogenannter präphagozytischer Läsionen, die durch eine verminderte Oligodendrozytendichte und Mikroglia-Aktivierung gekennzeichnet sind, während sich nur wenige T-Zellen oder eingewanderte Makrophagen finden (Barnett and Prineas 2004). Auch in der Unterteilung der Läsionstypen nach Demyelinierungsmustern findet sich für die “Pattern III” Läsionen ein Fehlen von perivaskulären Immunezellinfiltraten sowie eine erhöhte Dichte geschädigter Oligodendrozyten (Lucchinetti et al. 2000).

#### 1.1.3 Diagnose, Verlauf und Therapie

Die Diagnose der Multiplen Sklerose erfordert den Nachweis einer räumlichen und zeitlichen Dissemination von entzündlichen Läsionen im ZNS. Dabei beruht die Diagnose primär auf den klinisch-neurologischen Befunden. Zusätzlich ermöglicht die Revision der McDonald Kriterien von 2017 (Thompson et al. 2017) unter Berücksichtigung von MRT- und Liquorbefunden eine frühe Diagnosestellung.

Zum Ausschluss wichtiger Differentialdiagnosen und zur weiteren Sicherung der Diagnose werden ergänzende Untersuchungen empfohlen. Zu diesem Zweck erfolgt einerseits eine Liquordiagnostik, die typischerweise eine geringe Pleozytose sowie eine positive Masern-Röteln-Zoster (MRZ)-Reaktion (Jarius et al. 2017) und liquorspezifische oligoklonale Banden als Ausdruck der Entzündungsreaktion im ZNS zeigt. Andererseits lässt sich anhand evozierter Potentiale eine Latenzverzögerung als Hinweis auf eine abgelauene Demyelinisierung im ZNS nachweisen.

Während die Erkrankungsschübe zu Beginn der MS mit vorherrschend schubförmigem Verlauf (RRMS) meist wieder vollständig remittieren, kommt es bei etwa 60% der Patienten zu einem Übergang in einen chronisch progredienten Verlauf mit schleichender Zunahme der neurologischen Funktionsstörung. Darüber hinaus besteht bei etwa 15% der MS-Patienten von Beginn der Erkrankung an ein chronisch-progredienter Verlauf (PPMS), ohne dass in der Vorgeschichte Erkrankungsschübe auftraten (Christian Confavreux and Compston 2006). Häufige Schübe zu Erkrankungsbeginn sowie ein junges Erkrankungsalter stellen prädisponierende Faktoren für den Übergang in einen chronisch-progredienten Verlauf dar, haben jedoch nach dem Überschreiten eines bestimmten Behinderungsgrades keinen Einfluss mehr auf den Verlauf der chronischen Progression

(C. Confavreux 2003). Zudem unterscheiden sich die primär- und sekundär progrediente Verlaufsform nicht in der zeitlichen Dynamik der chronischen Progression (Kremenutzky et al. 2006). Ebenso beeinflussen weitere Faktoren, wie die Anzahl der Erkrankungsschübe oder der entzündlichen Läsionen im eMRT das Eintreten einer chronischen Krankheitsprogression nicht (C. Confavreux 2006).

Dies legt nahe, dass sich die sekundär- und primär progrediente MS eher in quantitativen Aspekten wie der Läsionszahl und räumlichen Verteilung klinisch eloquenter Läsionen unterscheiden, während sie grundsätzlich pathophysiologisch einen gemeinsamen Krankheitskomplex darstellen (Schumacher, Mahler, and Kerschensteiner 2017).

Die traditionelle Einteilung, welche einen schubförmigen Verlauf mit inflammatorischen Komponenten im Vordergrund von einem chronisch-progredienten mit vorherrschend neurodegenerativer Degeneration abgrenzt, wird in Anbetracht klinisch-neurologischer, bildmorphologischer und neuropathologischer Untersuchungen zunehmend relativiert (Scott 2017). Einerseits lassen sich bereits bei Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS), also in einem sehr frühen Erkrankungsstadium, chronische neurologische Funktionsstörungen wie Konzentrationsstörungen nachweisen (Anhoque et al. 2010) und auch in der optischen Kohärenztomographie (OCT) findet sich bei CIS Patienten eine bilaterale Abnahme der Nervenfaserschichtdicke, ohne dass zuvor eine klinisch apparente Sehnervenentzündung abgelaufen ist (Hanson et al. 2016).

Diese Befunde werden weiter unterstützt durch MRT-Studien bei Patienten mit CIS, welche eine frühe zerebrale und spinale Atrophie zeigten (Brex et al. 2001; Pérez-Miralles et al. 2013). Neben diesen bildmorphologischen Befunden finden sich auch im Liquor von CIS-Patienten Marker einer neuronalen Degeneration wie erhöhtes Neurofilament (Håkansson et al. 2017), ein neuronenspezifisches Intermediärfilament. Andererseits kann es auch bei Patienten mit chronisch progredientem Verlauf zu aufgesetzten Erkrankungsschüben und korrespondierenden kontrastmittelaufnehmenden Läsionen kommen (Paz Soldán et al. 2015).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die scharfe Abgrenzung eines rein schubförmigen von einem progredienten Verlauf kaum möglich ist und es bereits früh im Verlauf der MS zu einer chronischer Progression kommt. Diese Sichtweise setzt sich auch zunehmend im klinischen Alltag durch. Dies manifestiert sich beispielsweise in neueren Kriterien des Krankheitsverlaufs, welche parallel das Vorliegen einer klinischen und paraklinischen (schubförmigen) Krankheitsaktivität sowie einer (chronischen) Krankheitsprogression dokumentieren (Lublin et al. 2014).

Die Therapie der Multiplen Sklerose zielt derzeit primär auf eine Reduktion der Krankheitsaktivität ab. Klassischerweise dienen hierfür insbesondere die Schubratenreduktion und die Anzahl neu aufgetretener MRT-Läsionen als Parameter. Hierbei konnten zuletzt deutliche Fortschritte verzeichnet werden und es stehen mehr als ein Dutzend Präparate

mit belegter Wirksamkeit in der Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose zur Verfügung (Reich, Lucchinetti, and Calabresi 2018).

Demgegenüber steht das langfristige Ziel der MS-Therapie, eine schleichende Progression der Erkrankung und damit eine chronische Funktionsstörung zu verhindern oder zu verzögern. Während für die immunmodulierenden Therapien, insbesondere die monoklonalen Antikörpertherapien wie Natalizumab, Alemtuzumab oder Rituximab und auch die autologe Knochenmarkstransplantation selbst bei hochaktiven Krankheitsverläufen der RRMS eine deutliche Wirksamkeit auf die Entstehung neuer MRT-Läsionen belegt ist, zeigen diese Therapien keine oder nur geringe Effekte auf die schleichende klinische Krankheitsprogression oder die Atrophierate im cMRT (Ontaneda, Fox, and Chataway 2015; Leary et al. 2003).

Aus diesen Befunden lassen sich grundsätzlich folgende mögliche Hypothesen ableiten: (1) Die Neurodegeneration ist direkte Folge einer andauernden, chronischen Inflammation im ZNS, welche losgelöst vom peripheren Immunsystem fortbesteht und so kontinuierlich die Nervenzellen schädigt (kompartimentalisierte, chronische Entzündungsreaktion). (2) Die Inflammation stößt einen irreversiblen, neurodegenerativen Prozess an, der im späten Stadium nicht mehr auf einer anhaltenden Entzündungsreaktion beruht, sondern sich selbst weiter antreibt (selbsterhaltende Neurodegeneration). (3) Es besteht von vorn herein eine primäre Neurodegeneration, die eine sekundäre Aktivierung des Immunsystems hervorruft (primäre Neurodegeneration).

Um die Zusammenhänge zwischen Inflammation und Neurodegeneration besser zu verstehen ist es entscheidend, die Mechanismen zu erforschen, die der Neurodegeneration bei der MS zugrundeliegen und basierend darauf neue Therapien für den progredienten Verlauf der MS zu entwickeln.

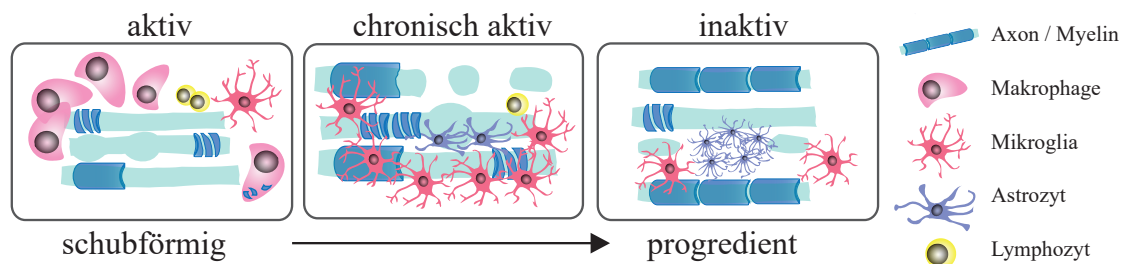
#### 1.1.4 Pathologie

Histopathologisch wurde die “Sclérose en Plaque” (Charcot 1868) erstmals 1868 von Jean Martin Charcot beschrieben. Zentral war dabei die Erkenntnis, dass dieser rätselhaften, in Schüben verlaufenden neurologischen Erkrankung entzündliche Plaques in der weißen und grauen Substanz des Gehirns und des Rückenmarks zugrunde liegen. Diese Plaques zeichnen sich durch eine ausgeprägte Immunezellinfiltration mit resultierender Demyelinisierung bei relativem Axonerhalt und reaktiver Astroglie aus (Compston and Coles 2008).

Aus neueren histologischen Untersuchungen wissen wir, dass an der Entstehung dieser entzündlichen Läsionen sowohl das angeborene Immunsystem als auch das erworbene Immunsystem beteiligt sind (B. F. G. Popescu and Lucchinetti 2012; Hemmer, Kerschensteiner, and Korn 2015) und es typischerweise im Anschluss an eine Phase mit akuter Entzündung zu einer narbenartigen Astroglie kommt, die das makroskopisch-histologische

Bild der Multiplen Sklerose prägt (Cordiglieri and Farina 2010).

Insgesamt zeigt sich histopathologisch während des Krankheitsverlaufs ein heterogenes Bild: Während zum Zeitpunkt des ersten Krankheitsschubs vor allem die früh- und spät-aktiven Läsionstypen mit deutlichem inflammatorischen Infiltrat und einer aktiven Demyelinisierung im Vordergrund stehen, finden sich mit fortschreitender Erkrankung zunehmend chronisch aktive und inaktive Läsionen (B. F. G. Popescu and Lucchinetti 2012; Frischer et al. 2015).



**Abbildung 2: Läsionstypen im Verlauf der Multiplen Sklerose.** Das histopathologische Bild des schubförmigen Krankheitsverlaufs bestimmen die „aktiven“ Läsionen mit dichter Infiltration von Phagozyten, Demyelinisierung und Axonschaden. Im Krankheitsverlauf treten zunehmend „chronisch aktive“ Läsionen auf mit einem charakteristischem Randwall aus Mikroglia und hypozellulärem Zentrum. Im progredienten Krankheitsstadium finden sich vor allem inaktive Läsionen mit Astroglie und kaum aktiver Axonschädigung (Abbildung aus Schumacher, Mahler, and Kerschensteiner 2017).

Im Folgenden wollen wir die axonale Pathologie mit Fokus auf die aktiven Läsionen bei der Multiplen Sklerose betrachten.

### *Aktive Läsionen*

Die massive Infiltration entzündlicher Zellen im Zentrum aktiver Läsionen resultiert in einer ausgeprägten Demyelinisierung, dem Verlust adulter Oligodendrozyten und der Schädigung von Axonen. Dabei findet sich in den aktiven Läsionen ein dichtes Nebeneinander von  $CD3^+/CD8^+$  T-Lymphozyten und  $KiM1P/CD68$  positiven mononukleären Zellen mit phagozytierten Myelinresten in ihrem Zellinneren. Zusätzlich lassen sich perivaskulär Zellinfiltrate nachweisen, die in erster Linie T-Lymphozyten und zu einem geringeren Teil B-Lymphozyten enthalten. Weiterhin kommt es zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, die sich im MRT als fokale Gadoliniumaufnahme darstellen lässt.

### *Chronisch aktive und inaktive Läsionen*

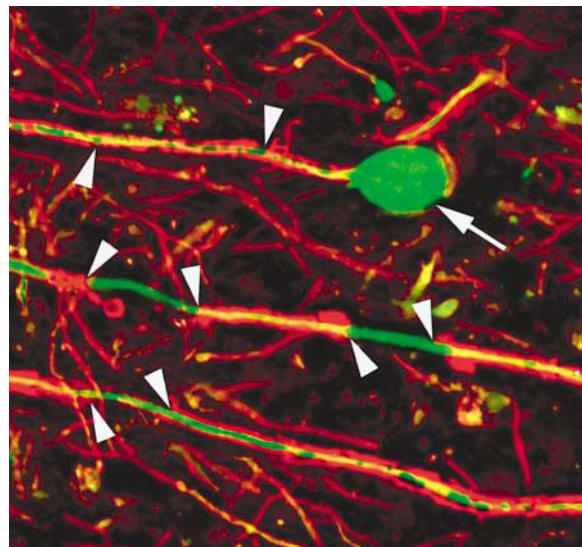
Neben den aktiven Läsionen finden sich auch sogenannte chronisch aktive Läsionen (engl. “smoldering lesions”), welche fast ausschließlich bei Patienten mit chronisch progredientem Verlauf auftreten. In diesen schwelenden Läsionen finden sich im Zentrum nur noch vereinzelte Entzündungszellen, innerhalb eines Randwalls aus aktivierten Makrophagen/ Mikroglia (Frischer et al. 2015).

Mit zunehmendem Alter der Patienten wird das histologische Bild der MS durch “ausgebrannte” (*smoldering plaques*) bzw. chronisch inaktive Läsionen bestimmt, die kaum noch aktivierte Entzündungszellen aufweisen und eine ausgeprägte Astrogliose zeigen. Diese Läsionen weisen kaum noch aktiv fortschreitenden axonalen Schaden und sind diesbezüglich vergleichbar mit normal erscheinender weißer Substanz bei nicht-MS-Kontrollgruppen gleichen Alters (Frischer et al. 2009).

#### *Axonale Pathologie in aktiven Läsionen*

Von Beginn der Erkrankung an lässt sich neben einer Demyelinisierung auch ein axonaler Schaden nachweisen (Trapp et al. 1998). Das Ausmaß der neuronalen Pathologie korreliert dabei mit der klinischen Funktionsstörung und ist bei Patienten mit progredientem Krankheitsverlauf ausgeprägter als bei der schubförmigen MS (Fisniku et al. 2008; Fisher et al. 2002; V. Popescu et al. 2015; Bjartmar et al. 2000).

Verschiedene histopathologische Methoden wurden entwickelt, um die axonale Pathologie bei der Multiplen Sklerose zu untersuchen. Die Bielchowsky Silberfärbung (Abbildung 4c) wurde in Analogie zu Ramón y Cajals Silberimpregnation von Michael Bielchowsky entwickelt, um die Morphologie von Nervenfasern in Physiologie und Pathologie detailliert darzustellen (Uchihara 2007).



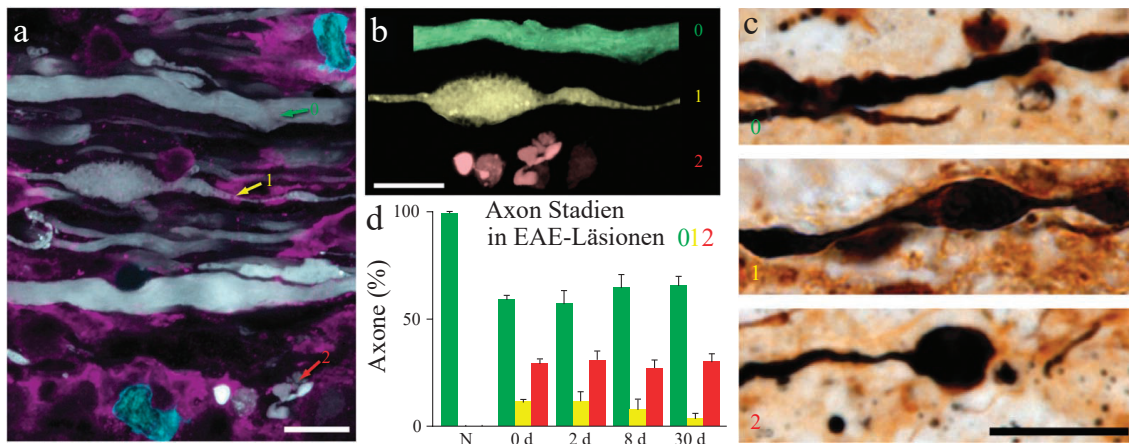
**Abbildung 3: SMI-32<sup>+</sup> positive Axone mit aktiver Demyelinisierung** (Pfeilspitzen). Ein Axon ist fragmentiert und geschwollen (Pfeil) (Trapp et al. 1998).

Um die funktionelle Pathologie über eine rein morphologische Veränderung der Axone hinaus zu beurteilen, stehen neuere Färbemethoden zur Verfügung, die auf der spezifischen Darstellung von bestimmten Proteinen als Marker der Axonschädigung beruhen. So lassen sich beispielsweise dephosphorylierte Neurofilamente, zentrale Strukturproteine von Neuronen, als Marker der Axonschädigung darstellen (Abbildung 3)(Dutta et al. 2006; Trapp et al. 1998; Petzold et al. 2008).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen an demyelinisierten Axonen in chronischen Läsionen findet sich als ultrastrukturelles Korrelat der Desphosphorylierung eine verminderte Anzahl von Neurofilament-Seitenarmen mit in der Folge kompaktiertem Neurofilament und einer frühen Störung des schnellen axonalen Transports (Dutta et al. 2006).

Die Morphologie der Axondegeneration folgt dabei stereotypen Mustern im Rahmen der fokalen Axon-Degeneration (FAD)(Nikić et al. 2011). Bei der FAD kommt es zur Aus-





**Abbildung 4: Stadien der fokalen Axondegeneration in EAE und MS** a) Konfokale Mikroskopie einer entzündlichen Läsion in EAE mit Axonen unterschiedlichen Stadien der FAD (grüner Pfeil: Stadium 0, morphologisch unauffällig; gelber Pfeil: Stadium 1, Fokale Schwellung, roter Pfeil: Stadium 2, Axon-Fragmentation). b) Vergrößerte Ausschnitte aus a) mit Fehlfarbandarstellung typischer Axonmorphologie in den Stadien 0-2 der FAD. c) Bielschowsky Silber-Färbung von Axonen (FAD Stadium 0-2) in akuten humanen MS-Läsionen d) Häufigkeitsverteilung der FAD-Stadien im Verlauf der EAE (N=Kontrolle) 0-30 Tage nach Beginn der EAE. (Abbildung adaptiert von (Nikić et al. 2011)).

bildung fokaler Schwellungen, die sich innerhalb entzündlicher Läsionen präferentiell an den Ranvierschen Schnürringen ausbilden und unabhängig von der Myelinisierung des Axons auftreten (Nikić et al. 2011). Ausgehend von diesen Axonschwellungen (*Beading*) sowie der verjüngten, im Intervall liegenden Axonanteile kommt es schließlich zum Kontinuitätsverlust des Axons (*end bulbs*). Eine mögliche Hypothese ist, dass der vermehrte Energiebedarf an den Ranvierschen Schnürringen diese zu Prädilektionsstellen für die Axonschwellungen macht.

In Mauslinien mit fluoreszenz-markierten Mitochondrien konnte zudem gezeigt werden, dass den morphologischen Veränderungen in der FAD eine Störung des axonalen Transports vorausgeht und bereits in morphologisch intakten Axonen auftritt.

Bemerkenswerterweise sind sowohl die axonale Schwellung als auch das mitochondriale Transportdefizit teilweise reversibel und können durch Therapie mit Sauerstoff- und Stickstoffradikalfängern verhindert werden (Sorbara et al. 2014; Nikić et al. 2011). Damit stellt das reversible Stadium der Axonschwellung einen interessanten Angriffspunkt für therapeutische Strategien der Neuroprotektion dar.

### 1.1.5 Pathomechanismen der Axonschädigung

Die Fortschritte und Resultate der histopathologischen Untersuchungen zeigen, dass der axonale Schaden einen Großteil der anhaltenden neurologischen Funktionsdefizite bei MS-Patienten bestimmt. Insbesondere im Rückenmark kommt es im Mittel zu einem Verlust von 30-60% der Axone, mit direkten klinischen Auswirkungen wie Gang- und Blasenstörungen (Bernitsas et al. 2015; Schlaeger et al. 2015; Ganter, Prince, and Esiri

1999; Petrova et al. 2017).

Diese Axonschädigung bereits in einem frühen Krankheitsstadium zu verhindern muss daher zentrales Ziel der Behandlung von Patienten und der Entwicklung neuer Therapie-strategien sein. Im Folgenden wollen wir die für vorliegende Arbeit relevanten Hypothe-sen zur Mechanismen der Axonschädigung bei MS betrachten.

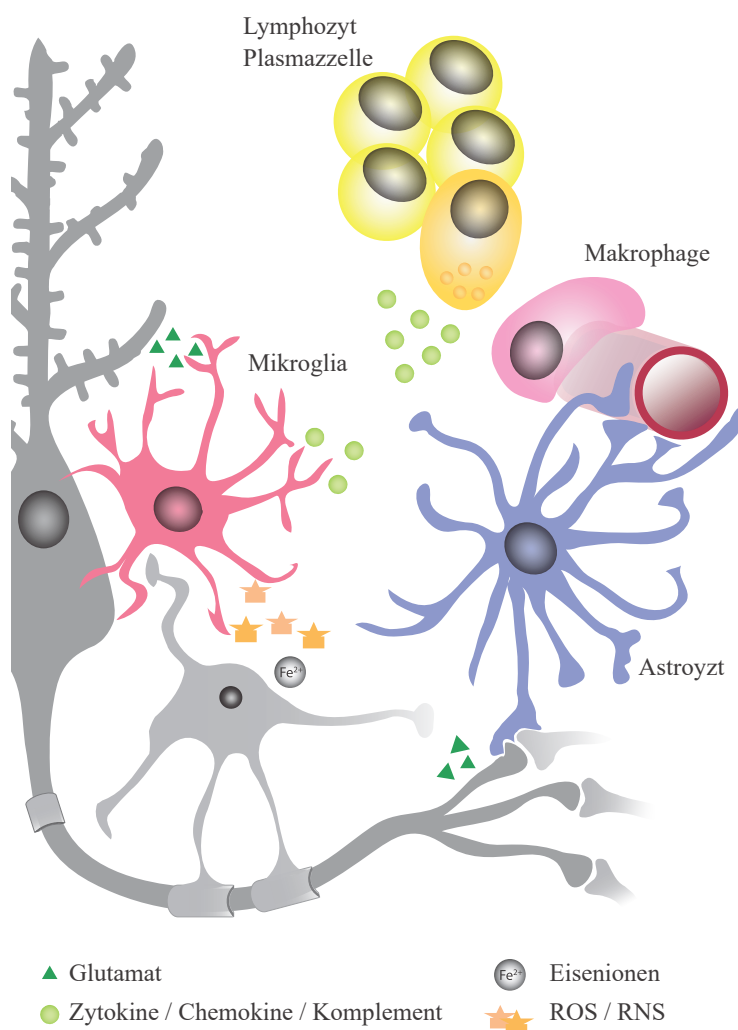
### Zytokine, Chemokine und „immunologische Synapse“

Durch die Infiltration aktivierter Immunzellen kommt es zur Freisetzung proinflammatori-scher Signal- und Effektormoleküle (TNF-alpha, reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spe-zies, Glutamat, Metalloproteasen) (Popescu and Lucchinetti 2012). Diese bewirken einer-seits eine direkten Schädigung von Oligodendrozyten und Neuronen. Andererseits wird die Entzündungsreaktion durch positive Rückkopplungsmechanismen weiter verstärkt.

So aktivieren Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , TNF and C1q benachbarte Astrozyten. Diese nehmen dadurch einen sogenannten A1-Astrozyten-Phänotyp an und verlieren damit nicht nur

ihre unterstützende und ho-möostatische Funktion son-derern begünstigen zusätz-lich die humoral vermittelte Schädigung von Neuronen und Oligodendrozyten (Liddel et al. 2017).

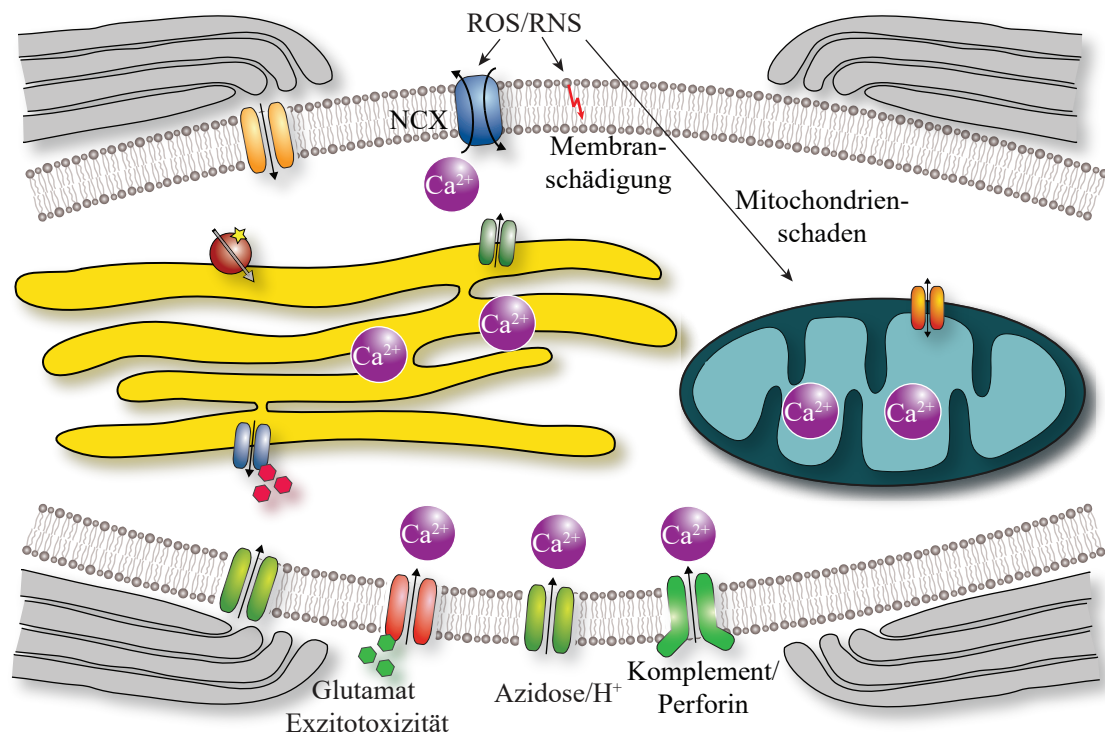
Neben der Aktivierung von Phagozyten und Astrozy-ten führt die Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozy-ten auch zu einer direkten Axonschädigung. So las-sen sich in MS-Läsionen Granzym-B exprimieren-de CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachweisen, die direkt an demyelinisierte Axone an-gelagert sind, wobei die zytotoxischen Vesikel auf der dem Axon zugewand-ten Seite der Zellen akku-mulieren. Diese „immuno-logische“ Synapse führt zu einer direkten Axonschädi-



**Abbildung 5: Mediatoren axonaler Schädigung in entzündlichen MS-Läsionen** (Schumacher, Mahler, and Kerschesteiner 2017).

gung durch zytotoxische T-Zellen (Bitsch 2000; Neumann et al. 2002). Korrespondierend konnten Siffrin und Kollegen in der EAE die Ausbildung immunologischer Synapsen zwischen Neuronen und Th17-Zellen zeigen. Diese resultierte in einer lokalen Axonschädigung mit Anstieg des axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Siffrin et al. 2010).

Insgesamt entsteht als gemeinsame Endstrecke ein zunehmender Energiemangel des Axons und ein Zustand der “virtuellen Hypoxie” mit unkontrolliertem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  der schließlich den Untergang des Axons einleitet und zum Zerfall des axonalen Zytoskeletts führt (Harris und Sloane, 2012).



**Abbildung 6: Mögliche Mechanismen der Axonschädigung.** Im inflammatorischen Milieu entzündlicher Läsionen kommt es durch unterschiedliche Mechanismen zu einem unkontrollierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum sowie aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien (Abbildung adaptiert von Minh Schumacher und Jonas Lehmitz).

### *Exzitotoxizität, Azidose und neuroglialer Haushalt*

Magnetresonanz-spektroskopischen (MRS)-Studien zeigen, dass in den entzündlichen Läsionen ebenso wie in der NAWM erhöhte Glutamatkonzentrationen bestehen. Diese korrelieren sowohl mit dem Axonschaden gemessen als N-acetylaspartate (NAA) Konzentration, dem Hirnvolumen und kognitiven Parametern (Azevedo et al. 2014).

In Zusammenschau mit histologischen (Vallejo-Illarramendi et al. 2006) und liquordiagnostischen (Sarchielli et al. 2003) Untersuchungen bestehen also Hinweise auf erhöhte Glutamatkonzentrationen im ZNS bei MS-Patienten. Kommt es zu solch erhöhten Glutamatkonzentrationen am synaptischen Spalt, resultiert eine Übererregung des postsynap-



tischen Neurons mit einem unkontrollierten Anstieg der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration und Schädigung des Axons (Saab et al. 2016; Piani et al. 1992; Sarchielli et al. 2003).

Neben der Aktivierung von neuronalen Glutamat-Kanälen führt das azidotische Milieu entzündlicher MS-Läsionen auch zur Öffnung von Azidose-sensitiven Kanälen (neuronal proton-gated acid-sensing ion channel-1(ASIC1))(Friese et al. 2007). Diese sind für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen permeabel und tragen ebenfalls zur Dysregulation der axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei, sodass eine pharmakologische Blockade oder eine genetische Deletion dieser Kanalmoleküle im Mausmodell der MS (EAE) einen günstigen Effekt auf den klinischen Verlauf hat (Friese et al. 2007).

Zusätzlich führt der Verlust der Myelinscheide führt zu einer verminderten elektrischen Isolation der Axone, wodurch die saltatorische Erregungsweiterleitung gestört ist, es zu einer Umverteilung von spannungsabhängigen Natriumkanälen über die Axonmembran kommt und der zu einem erhöhten axonalen Energieverbrauch führt (Black et al. 2007). Zusammenfassend kommt es durch Glutamat-medierte Exzitotoxizität sowie durch den Verlust der isolierenden und trophischen Myelinscheide zu einer Übererregung und schließlich wiederum zu einem überschießendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.

#### *Oxidativer Stress*

In den aktiven Läsionen setzen eingewanderte Makrophagen und aktivierten Mikroglia im Rahmen der Phagozytose große Mengen an reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) frei. ROS und RNS reagieren mit zellulären Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden und fördern den intrazellulären Abbau phagozytierter Fremdkörper (Gwinn and Vallyathan 2006). Diese Prozesse dienen physiologischerweise bei der akuten Entzündung der Erregerabwehr und dem Schutz des Gewebes.

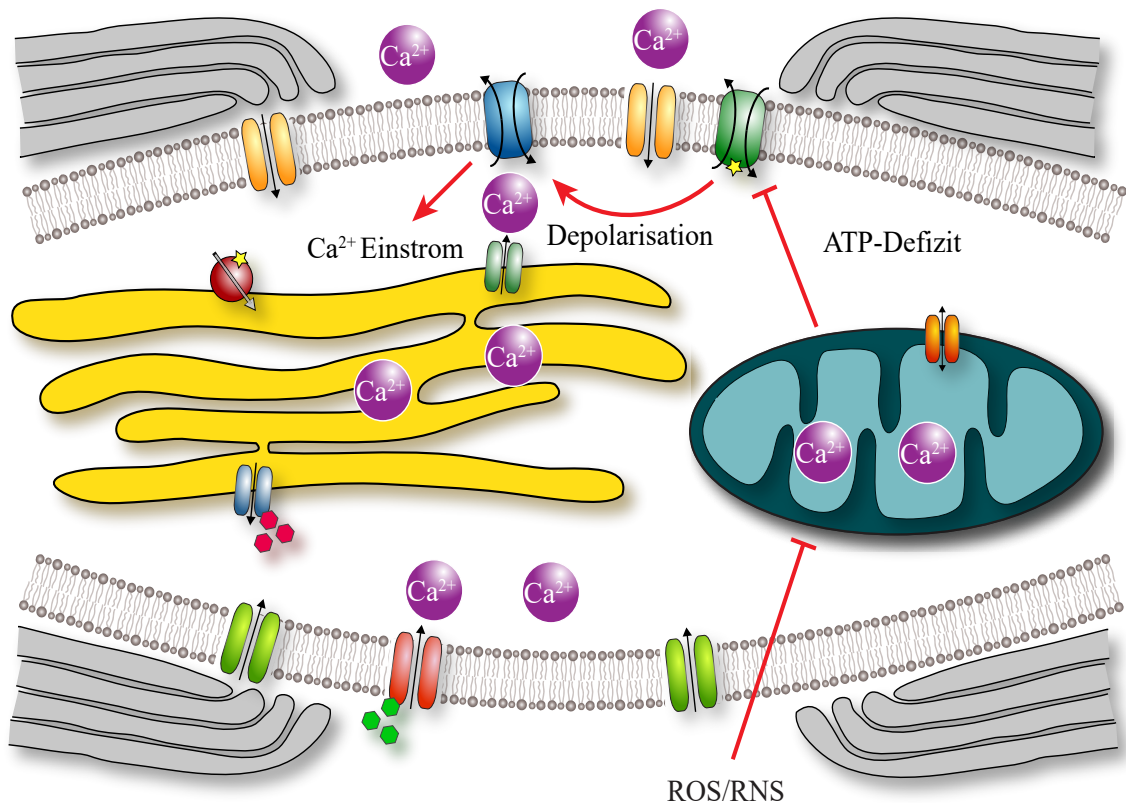
Histopathologische Befunde zeigen, dass in MS-Läsionen sowohl eine gesteigerte NADPH-Oxidase Expression als auch vermehrt oxidierte Phospholipide und DNA-Strangbrüche - als Hinweis auf einen stattgehabten oxidativen Schaden - auftreten (Marie T. Fischer et al. 2012; Haider et al. 2011; Marie Therese Fischer et al. 2013). Durch die Akkumulation von oxidierten Phospholipiden in der Axonmembran verliert diese an Flexibilität und es kann zum Verlust der Membranintegrität kommen (Stark 2005; Hermann et al. 2014).

Bleibt diese Entzündungsreaktion chronisch bestehen, so führt das oxidative Milieu zusätzlich zu einer intrinsischen Stressantwort der umgebenden Zellen – es kommt zur Schädigung von Mitochondrien und damit zu einem zunehmenden Energie-Defizit (Abbildung 7). Entsprechend konnten Redford und Kollegen zeigen, dass es durch die Gabe von NO zu einem Leitungsblock (durch Depolarisation) in Axonen kommt, welcher durch die pharmakologische Gabe des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Blockers Bepridil verhindert wird (Redford, Kapoor, and Smith 1997).

Nikić et al. konnten analog zeigen, dass die Applikation von NO bereits in Axonen mit intakter Myelinscheide Mitochondrienveränderungen im Sinne einer FAD ausgelöst (Nikić et al. 2011). Zusätzlich können ROS und RNS den mitochondrialen Transport in gesunden Axonen zum Erliegen bringen, während die Gabe von Radikalfängern in der EAE diesen wieder reaktivieren kann (Sorbara et al. 2014).

„Virtual Hypoxia“,  $Ca^{2+}$ -Einstrom und Abbau des Zytoskeletts

Zusammenfassend führen die oben beschriebenen Faktoren (Glutamat-Exzitotoxizität, Azidose, Demyelinisierung und oxidative Schädigung der Zellmembran, der Mitochondrien und des mitochondrialen Transports) zu einem Energie-Defizit (ATP-Mangel, „virtual Hypoxia“) des Axons (Stys and Lopachin 1998; Agrawal and Fehlings 1996).



**Abbildung 7:** «Virtual Hypoxia» Initial kommt durch eine oxidative Schädigung der Mitochondrien zu einem ATP-Defizit. Der resultierende Funktionsverlust der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase führt zu einer Depolarisation des Axons, zum Umkehrmodus des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers (NCX) und damit zum weiteren Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Extrazellulärraum (Abbildung adaptiert von Minh Schumacher und Jonas Lehmitz).

Die resultierende Depolarisation der Axonmembran führt zu einer Umkehrung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers (NCX) (Stys, Waxman, and Ransom 1991) und einer Öffnung von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (George, Glass, and Griffin 1995; Fern, Ransom, and Waxman 1995).

In der Folge kommt es zur Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Proteasen (Banik and Shields, n.d.; Das et al. 2008), die das axonale Zytoskelett abbauen. Der Verlust des Mir-

kotubuli-Netzwerks sowie der vorbestehende ATP-Mangel führen zum Zusammenbruch des schnellen axonalen Transports und es bilden sich die histologisch beobachteten axonalen Schwellungen (Kreutzer et al. 2012; Trapp et al. 1998). Bei einer weiteren Schädigung der Axone, fragmentieren diese schließlich und es kommt zum irreversiblen Funktionsverlust des Axons (Nikić et al. 2011).

## 1.2 Die EAE als Tiermodell der Multiplen Sklerose

Verschiedene Tiermodelle der Multiplen Sklerose dienen der Untersuchung histologischer Veränderungen, Pathomechanismen und neuer Therapieoptionen (Hohlfeld and Wekerle 2001). Dabei lassen sich je nach Fragestellung an einem bestimmten Tiermodell einzelne Aspekte und Verläufe der MS untersuchen (Kipp et al. 2017; Bigazzi 1995).

Das am weitesten verbreitete Modell ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Die einfachste Form derselben ist die aktive EAE (Krishnamoorthy and Wekerle 2009), eine induzierte Autoimmunkrankheit des ZNS, bei der es zu T-Zell mediierter Entzündung, Demyelinisierung und Neurodegeneration kommt (Gold, Linington, and Lassmann 2006; Koritschoner RS 1925; Rivers, Sprunt, and Berry 1933).

Dabei werden die Tiere mit ZNS-Antigenen immunisiert. Zusätzlich wird die Immunantwort mit komplettem Freundschem Adjuvans, einem Gemisch aus Mineralöl und abgetötetem Mykobakterium tuberculosis stimuliert und die Blut-Hirn-Schranke mit Pertussis Toxin modifiziert, um den Eintritt der Entzündungszellen zu erleichtern. Je nach verwendetem Antigen und Mausstamm kommt es in der Folge zu einem spezifischen Verlauf und Läsionsmuster der Erkrankung.

Klinisch entwickeln die Tiere nach etwa zwei Wochen eine von dorsal nach kranial aufsteigende, neurologische Funktionsstörung mit Schwanzschwäche und Paraparese. Histopathologisch ähnelt die axonale Pathologie der EAE dabei in vielen Punkten der MS (Soulika et al. 2009). Insbesondere die entzündlich medierte axonale Schwellung und Fragmentation lässt sich so in mit Myelin Oligodendrozyten (MOG)-Peptid induzierter EAE in Mäusen nachweisen (Herrero-Herranz et al. 2008).

In diesem EAE-Modell kommt es bereits früh im Krankheitsverlauf zur Infiltration von Lymphozyten und Zellen des angeborenen Immunsystems mit der Ausbildung akuter entzündlicher Läsionen im Rückenmark und fokaler Axonschädigung. Im chronischen Verlauf findet sich ein progredienter symmetrischer Verlust von kortikospinalen Axonen, ohne entsprechende aktive entzündliche Infiltrate im Rückenmark (Soulika et al. 2009).

Um die komplexen Vorgänge bei der Entstehung der humanen MS besser abzubilden, werden kontinuierlich neue EAE Modelle entwickelt. Da es durch die Immunisierung mit großen Mengen Adjuvans zu einer Modulation des gesamten Immunsystems der behandelten Tiere kommen kann und damit unspezifische Effekte hervorgerufen werden, wur-

den sogenannte “passive transfer EAE” (pEAE)-Modelle entwickelt (Krishnamoorthy and Wekerle 2009). Hierfür werden *in-vitro* aktivierte MOG-spezifische T-Zellen in naive Tiere transferiert und lösen dort eine anti-MOG gerichtete Entzündungsantwort aus.

Um die Entstehung der Autoimmunantwort, die in der aktiven EAE und pEAE jeweils durch externe Eingriffe ausgelöst wird, besser untersuchen zu können, wurden zuletzt spontane EAE (sEAE) Modelle entwickelt. Die “humanisierten” transgenen Tiere, die T-Zell-Rezeptoren aus humanen MOG-Antigen-spezifischen T-Zell-Klonen exprimieren, entwickeln so ohne externe Manipulation eine spontane EAE.

Trotz der kontinuierlichen Entwicklung in Richtung “humanisierterer” Modelle kann die EAE nicht die Komplexität der MS abbilden und es bestehen die folgenden wichtige Unterschiede (Sriram and Steiner 2005, Kipp et al. 2017) zwischen MS und EAE:

(1) Ein Großteil der EAE-Modelle greift auf Inzuchtstämme zurück, sodass genetische Unterschiede von vornherein aus der Analyse ausgeschlossen sind und somit die Situation im Menschen nur unvollständig wiedergegeben wird. (2) Desweiteren wird die EAE durch ein bestimmtes Antigen vermittelt und folgt damit auch einer stereotypen Läsionsverteilung, während bei der MS kein einzelnes kausales Antigen bekannt ist und die Läsionen grundsätzlich im gesamten ZNS auftreten können. (3) Die unterschiedlichen immunologischen Läsionsmuster (B. F. G. Popescu and Lucchinetti 2012) der Multiplen Sklerose finden sich in der EAE nur zum Teil wieder, sodass das komplexe histopathologische und pathomechanistische Spektrum der MS nur teilweise durch die EAE abgebildet wird.

Ein zentraler Aspekt ist hierbei die Dominanz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der EAE, während für die Multiple Sklerose zunehmend Hinweise auf eine entscheidende Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorliegen (Salou et al. 2015). Zudem zeigt sich retrospektiv, dass die EAE aufgrund der Unterschiede im zeitlichen Verlauf und einer Vielzahl von falsch-positiven und zum Teil auch falsch negativen Therapiestudien im Tiermodell nur eingeschränkt für die Entwicklung neuer Therapien der MS geeignet ist (Friese et al. 2006)

Ungeachtet dessen können damit viele Einzelaspekte zuverlässig modelliert werden und in der Vergangenheit wurden damit wichtige Fortschritte in der Behandlung der MS, wie die Entwicklung von Glatirameracetat und Natalizumab erreicht (Croxford, Kurschus, and Waisman 2011).

### 1.3 Methoden zur Untersuchung der Axondegeneration in der EAE

Die EAE dient einerseits als Modell einer Autoimmunreaktion im ZNS und der dabei beteiligten Komponenten des Immunsystems. Andererseits lassen sich in diesem Modell gut die komplexe Interaktion von Immunsystem und Nervenzellen sowie sekundäre Neurodegenerationsmechanismen untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Detektionssysteme entwickelt, mithilfe derer sich einzelne Aspekte dieser Prozesse abbilden lassen. Diese Systeme lassen sich einerseits in verschiedene bildgebende Verfahren wie Licht- und Elektronenmikroskopie (Rossi and Constantin 2016; Nyska et al. 2006; Bishop et al. 2011), sowie OCT, PET- und MRT-basierte (Knier et al. 2015; Buck et al. 2012) Techniken und andererseits in nicht-bildgebende Verfahren, beispielsweise FACS-Analysen oder RNA-Sequenzierung unterteilen.

Zusätzlich unterscheiden sich insbesondere die bildgebenden Verfahren nach ihrer Invasivität und somit nach ihrer Anwendbarkeit *in-vivo* oder in fixiertem Gewebe. Bei der Auflichtmikroskopie und der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie in fixiertem Gewebe ist es anhand verschiedener Färbemethoden (Goto 1987; Ostermann, Sternberger, and Sternberger 1983) möglich, einzelne Zelltypen in dünnen Gewebeschnitten darzustellen, wobei allerdings nur jeweils ein Zeitpunkt betrachtet werden kann.

Demgegenüber kommen bei *in-vivo* Verfahren wie der Multiphotonen-Mikroskopie meistens genetisch exprimierte Fluoreszenzmoleküle zum Einsatz, während für PET-, MRT- oder OCT-Studien radioaktive Liganden bzw. Kontrastmittel sowie intrinsische Eigenschaften der Gewebe detektiert werden.

### 1.3.1 Multiphotonen-Mikroskopie des Zentralen Nervensystems

Seit jeher ist es das Ziel der biologischen Mikroskopie, verschiedene Gewebe und Organe zu betrachten, um die Struktur, Physiologie und Pathologie ihrer zellulären Elemente zu untersuchen. In der Vergangenheit stützten sich diese Unterfangen vor allem auf die konventionelle Lichtmikroskopie mit linearen Absorptionsvorgängen (*one-photon*) um Kontraste zu generieren. Im biologischen Gewebe sind diese Techniken überwiegend auf die Oberfläche beschränkt, da es in tieferliegenden Ebenen ( $>100\mu\text{m}$ ) zu einer übermäßigen Streuung des Lichtes kommt.

Besonders in der konfokalen Mikroskopie kommt es dadurch zu einem Signalverlust, da die optische Schnittbildgebung mittels einer Blende erreicht wird, die alles von außerhalb der idealen Fokusebene emittierte Licht abfängt (Helmchen and Denk 2005).

Daher kommen traditionell aufwändige histologische Verfahren zum Einsatz, um durch Mikroskopie von Dünnschnitten fixiertes Gewebe zu rekonstruieren und dann beispielsweise statistisch die Anzahl von Axonen pro definierter Fläche zu vergleichen (Misgeld, Nikic, and Kerschensteiner 2007). Durch die Fixierung des Gewebes lassen sich inhärent keine sequentiellen Prozesse, wie die Degeneration einzelner Axonen “live” beobachten.

Daher wurden in den letzten Jahren neue Verfahren entwickelt, die es auch in stark myelinisiertem Gewebe, wie dem Rückenmark ermöglichen, einzelne Strukturen räumlich und zeitlich hochaufgelöst darzustellen. So wurden mikrochirurgische Verfahren entwickelt, um nach Laminektomie im anästhesierten Tier das Myelon *in-vivo* darzustellen und aus-



reichend zu stabilisieren.

Zusätzlich stehen neue Mauslinien (Thy1-XFP) zur Verfügung, die basierend auf einem Thy1-Promotorelement in einzelnen Axonen im Rückenmark fluoreszierende Proteine genetisch exprimieren (Feng et al. 2000). So konnten in unserer Arbeitsgruppe mittels Weitfeld-Mikroskopie einzelne oberflächlich gelegene Axone *in-vivo* verfolgt und erstmals die Prozesse der akuten axonalen Degeneration beschrieben werden (Kerschensteiner et al. 2005; Misgeld, Nikic, and Kerschensteiner 2007).

Während außerhalb der fluoreszenzmarkierten Axone kaum Licht absorbiert wird, nimmt die Streuung mit zunehmender Tiefe nicht-linear zu (elastische Streuung) und damit die Bildqualität ab. Da die elastische Streuung von Veränderungen des Brechungsindex im durchstrahlten Medium abhängt, ist sie in inhomogenen und stark myelinisierten Geweben wie dem Rückenmark besonders ausgeprägt. Dabei ist das Ausmaß der Streuung durch die mittlere freie Weglänge ( $l_f$ ) bestimmt, welche von der Wellenlänge  $\lambda$ , der Partikelgröße und der Variation des Brechungsindex abhängt. Bei kleinen Partikeln kommt es zu einer überwiegend gleichförmigen Streuung (Rayleigh Streuung), während Partikel, die wie im Hirngewebe in der Größenordnung der Wellenlänge liegen zu einer vorwärtsgerichteten Streuung führen, sodass beispielsweise rückwärtig beleuchtete Staubpartikel für den Betrachter heller als ihre Umgebung erscheinen (Helmchen and Denk 2005).

Durch fundamentale Fortschritte in der Lasertechnik und Optik konnte in den letzten Jahrzehnten die Multiphotonenmikroskopie (W. Denk, Strickler, and Webb 1990) für die biologische Mikroskopie etabliert werden.

Diese macht sich gegenüber der konventionellen Mikroskopie nicht-lineare Anregungseffekte zunutze. So wird nicht mehr die Interaktionen eines einzelnen Photons mit einem Molekül betrachtet, sondern es treffen mehrere Photonen zur gleichen Zeit (innerhalb von  $\sim 0,5$ fs) am gleichen Molekül auf und kombinieren so ihre Anregungsenergie.

Die Multiphotonen-Absorption hängt dabei von den Eigenschaften des Moleküls sowie von der räumlichen und zeitlichen Verteilung des anregenden Lichts ab. Um das Licht ausreichend zu "konzentrieren" muss der Laserstrahl einerseits durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA) gebündelt werden, andererseits sind dafür aufwendige Lasersysteme notwendig, die einen gepulsten Laserstrahl emittieren.

Diese ultrakurzen Laserpulse ( $< 1$ ps) verdichten die Lichtenergie, wobei bei einer Pulsweite von  $\tau$  mit einer Frequenz von  $f_R$  das Signal um den Faktor  $1 / (\tau f_R)^n - 1$  verstärkt wird ( $n =$  Zahl der beteiligten Photonen; Helmchen and Denk 2005).

Die für die 2-Photonenmikroskopie eingesetzten Lasersysteme erreichen dabei typischerweise 100 fs Pulse mit einer Rate von 100 MHz, sodass dadurch eine Konzentration auf das  $10^5$ -fache erreicht wird (Denk et al. 1995; Helmchen and Denk 2005).

Aufgrund der nicht-linearen Anregungseigenschaften bei der 2-Photonenmikroskopie

trägt nur ballistisches, also nicht gestreutes Licht zur Anregung in der Fokusebene bei. Folglich muss mit zunehmender Tiefe der Fokusebene eine exponentiell höhere Laserleistung eingesetzt werden, um die Fluoreszenzmoleküle in der Fokusebene anzuregen.

Basierend auf der quadratischen Abhängigkeit der 2-Photonen Anregungsrate von der Anregungsintensität ergeben sich bedeutende Vorteile der nicht-linearen Mikroskopie:

Durch die exponentielle Abnahme des Fluoreszenzsignals außerhalb des Fokusvolumens vermindert sich die Phototoxizität, was entscheidend für die Durchführung von *in-vivo* Experimenten mit mehreren Zeitpunkten oder langen Aufnahmeserien sein kann.

Der exakt definierte Ort der Anregung ermöglicht im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie eine rein exzitationsbasierte dreidimensionale Auflösung ohne Einsatz einer Blende. Dadurch kann das gesamte emittierte und durch das Objektiv mit hoher NA gebündelte Licht durch sogenannte externe oder “non-descanned” Detektoren (NDD) erfasst werden. Dabei ist es für die hochaufgelöste Betrachtung tief im Gewebe liegender Strukturen von entscheidender Bedeutung, dass die Streuung innerhalb des Lichtweges sich kaum auf die Bestimmung der Lokalisation des angeregten Moleküls auswirkt, da aufgrund der nicht-linearen Anregung nur ungestreutes Licht das Molekül anregt.

Außerdem erfolgt die Anregung mit etwa der Hälfte der vom angeregten Molekül emittierten Energie, also einem längeren bzw. nach Rot verschobenen Wellenlängenbereich. So kommen typischerweise Wellenlängen im Infrarotbereich von 700-1000 nm zum Einsatz, während die Emission im sichtbaren Lichtspektrum erfolgt. Da die Streuung des Lichts von der Wellenlänge abhängt, penetriert das langwelligere Licht also nicht nur tiefer in das Gewebe, sondern führt auch aufgrund der geringeren Absorption zu weniger Phototoxizität (Helmchen and Denk 2005).

Das mikroskopische Bild eines Objekts entsteht aus der Faltung (Konvolution) des einzelnen Punktspreizfunktionen (PSF) zerlegten Objekts. Hierbei entspricht die PSF dem Abbild eines punktförmigen Objekts, beispielsweise einem Fluorophor, und hängt von der Wellenlänge und der numerischen Apertur des Objektivs ab:

$$\text{PSF}(v,u) = \left| 2 \int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \exp(iu\rho^2/2) \rho \, d\rho \right|^2$$

Dabei beschreibt  $J_0$  die Bessel Funktion 0. Ordnung und  $v = k(\text{NA})r$  und  $u = k(\text{NA})^2 z$  sind radial und axial normalisierte optische Koordinaten mit der Wellenzahl  $k = 2\pi / \lambda$  (Helmchen and Denk 2005).

Für die 2-Photonenmikroskopie gilt dabei, dass die effektive PSF dem Quadrat der Anregungs-PSF entspricht.

$$\text{PSF}_{2\text{-Photon}} = (\text{PSF}_{\text{Anregung}})^2 \approx \text{PSF}^2(v/2, u/2)$$

Wobei  $v/2$  und  $u/2$  in etwa der doppelten Anregungswellenlänge im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie entsprechen (Helmchen and Denk 2005).

Hierbei errechnet sich die maximale räumliche Auflösung, also der Abstand, den zwei Punkte haben müssen, um sie als getrennte Objekte wahrnehmen zu können, aus der Weite der effektiven  $\text{PSF}_{2\text{-Photon}}$ . Aufgrund der längeren Anregungswellenlänge bei der 2-Photonenmikroskopie ist die errechnete Auflösung der 2-Photonenmikroskopie also schlechter als die der konfokalen Mikroskopie, was sich aber in der Praxis aufgrund des endlichen Blendendurchmessers bei der konfokalen Mikroskopie kaum bemerkbar macht (Helmchen and Denk 2005).

### 1.3.2 In-vivo $\text{Ca}^{2+}$ -Mikroskopie und genetische $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von zellulären Mechanismen in nahezu allen Körperzellen. Sie vermitteln die Kontraktion von Herz- und Skelettmuskelzellen ebenso wie die Steuerung von Genexpression, Zellproliferation und Apoptose (Orrenius, Zhivotovsky, and Nicotera 2003). Im zentralen Nervensystem regulieren sie die Membranpolarisation und das Aktionspotential der Nervenzellen.

Die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) ist daher ein geeigneter Parameter der neuronalen Aktivität (Berridge, Lipp, and Bootman 2000). Die optischen Voraussetzungen zur Untersuchung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  *in-vivo* wurden in den letzten Jahren mit der 2-Photonenmikroskopie geschaffen. Zusätzlich wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren entwickelt, die eine ausreichende Sensitivität und Stabilität erreichen, um intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamiken bis hin zu einzelnen Aktionspotentialen *in-vivo* aufzulösen.

Die ersten Indikatoren von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  waren biolumineszente  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine, wie Aequorin (Shimomura, Johnson, and Saiga 1962; Grienberger and Konnerth 2012). Diese Farbstoffe mussten aufwendig in die Zelle eingebracht werden und waren dadurch nur begrenzt einsetzbar (Grienberger and Konnerth 2012). Die Entwicklung neuer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren durch Roger Tsien brachten einen deutlichen Fortschritt, indem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren, wie EDTA an Fluorophore gekoppelt wurden und so beispielsweise mit Fura-2 durch die Anregung mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen quantitative Aussagen über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemacht werden konnten (Neher 1995).

In einem weiteren grundlegenden Entwicklungsschritt kamen erneut aus den Laboren Roger Tsien's Protein-basierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren, die natürlicherweise in Muskelgewebe vorkommende  $\text{Ca}^{2+}$  bindende Proteine, wie Calmodulin und Troponin an fluoreszierende Proteine, wie das „Green fluorescent protein“ (GFP) koppelten. Diese Sensoren ließen sich mittels genetischer Promotoren gewebespezifisch exprimieren.

In der Folge etablierten sich zwei wichtige Gruppen von genetisch kodierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren („genetically encoded calcium indicators“, GECIs). Einerseits sogenannte GCaMPs, die basierend auf einer Kopplung von GFP und Calmodulin ihre Konformität und damit die Intensität des emittierten Lichtes in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verändern (Nakai, Ohkura, and Imoto 2001).



Andererseits eine zweite Gruppe von GECIs, die basierend auf einem strahlungsfreien Energietransfer zwischen Donator- und Akzeptor-Fluorophor, dem sogenannten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) eine Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ermöglichen (Jares-Erijman and Jovin 2003).

Dabei werden die beiden Fluorophore durch eine Proteinverbindung wie Troponin C nach einer  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Konformationsänderung auf weniger als 10 nm angenähert, um so einen FRET zu ermöglichen. Da die beiden Fluorophore Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren dominiert im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Zustand das kurzwelligere Licht, während nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung mehr längerwelliges Licht abgestrahlt wird.

Wichtige Kriterien für den Einsatz genetisch exprimierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren sind die  $K_d$ , als Maß der Wahrscheinlichkeit, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeprotein und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dissoziieren. Die  $K_d$  wird in Mol angegeben und entspricht der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, bei der die Hälfte aller Indikatormoleküle  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden hat. Die  $K_d$  ist dabei häufig abhängig vom intrazellulären pH-Wert, der Temperatur und der Magnesiumkonzentration (Oliver et al. 2000; Grienberger and Konnerth 2012). Desweiteren müssen die intrinsischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffereigenschaften des  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensors berücksichtigt werden, die mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität zunehmen, sodass ein Abwägen zwischen Sensitivität und Affinität des Sensors notwendig ist (Grienberger and Konnerth 2012).

Der in der vorliegenden Studie eingesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator CerTN-L15 ist eine Weiterentwicklung des TN-L15 Sensors. Um die Helligkeit der Fluorophore zu steigern, wurde der Donator *cyan fluorescent protein* (CFP) durch *Cerulean* ersetzt und die faltungsrelevanten Mutationen V163A and S175G in das Akzeptorprotein *Citrin* eingefügt (Heim et al. 2007).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Binde domäne basiert auf Troponin C, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeprotein, das im Herz- und Skelettmuskel exprimiert wird und neben  $\text{Ca}^{2+}$  kaum natürlichen Bindepartner in Neuronen besitzt.

Für die neuronale Expression wurden verschiedene Thy1-CerTN-L15 Mauslinien etabliert, die aufgrund der Kontextabhängigkeit von Thy1, also der Expression in Abhängigkeit von verschiedenen Gen-Regulatoren in verschiedenen Neuronenpopulationen in unterschiedlichem Maß exprimiert werden. Die selektierte Linie exprimiert den Sensor homogen und ohne Kompartimentalisierung in einer Subgruppe von Neuronen in Gehirn, Rückenmark und Hinterwurzelganglion (Heim et al. 2007) und eignet sich damit gut für eine *in-vivo* Messung von axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Rückenmark.

## Kapitel 2: Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

#### 2.1.1 Pharmakologische Wirkstoffe und Lösungen

2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
AMPA (±)- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid hydrat	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5 g	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Bepridil Hydrochlorid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Cutasept F Lösung 250 ml	Bode Chemie GmbH & Co, Hamburg, Deutschland
Ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrasodium salt	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol 70%	CLN GmbH, 85416 Niederhummel, Deutschland
Forene (Isoflurane)	Abbott AG, Baar, Switzerland
Glycine	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Hydrogen Peroxide Solution (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Kainic acid monohydrate $\geq 99\%$ (TLC)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
KB-R7943 mesylate	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Ketamine hydrochloride 10%	Bremer Pharma GmbH, Warburg, Deutschland
L-Glutamic acid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland

Nimodipine	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Nifedipine	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
NMDA (N-Methyl-D-aspartic acid $\geq 98\%$ (TLC))	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
Ringerlösung Fresenius KabiPac	Fresenius KaBI Dtl., Bad Homburg, Deutschland
Steriler künstlicher Liquor (aCSF)	Lösung A 500ml H <sub>2</sub> O: 8,66 g NaCl 0,224 g KCl 0,206 g CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 0,163 g MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O Lösung B 500ml H <sub>2</sub> O: 0,214 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0,027 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O
Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> -freier steriler künstlicher Liquor (aCSF)	Lösung A 500ml H <sub>2</sub> O: 8,66 g NaCl 0,224 g KCl Lösung B 500ml H <sub>2</sub> O: 0,214 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0,027 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O
Sulfo-NONOate- Di-Sodium Salz	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Spermine NONOate	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland

### 2.1.2 Immunisierung

Pertussistoxin (Ptx) aus Bordetella Pertussis, inaktiviert	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland
---------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------

Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, (MOG)	Hergestellt im Labor von Prof. Doron Merkler (Universität Göttingen, Universität Genf)
M. tuberculosis H37 RA, abgetötet	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024, Taufkirchen, Deutschland

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Chirurgisches Material und Werkzeug

Wella contura W7807 (Scherapparat )	Wella, Darmstadt, Deutschland
Noyes Spring Scissors (Federschere)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Plastipak Hypodermic luer slip syringe 1 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, (New Jersey), USA
Skalpell	PFM medical AG, Köln, Deutschland
Dumont Mini Forceps – Inox Style 5	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vannas-Tübingen Spring Scissors, (Kleine gebogene Federschere)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hypodermic Needles BD Microlance 3 23 Gauge (0,6 mm, blau)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, (New Jersey), USA
Hypodermic Needles BD Microlance 3 30 Gauge (0,3 mm, gelb)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, (New Jersey), USA
Metallplatte	Spezialanfertigung
Sugi	Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland
Gummibänder	
Cast Alnico Button Magnets	Eclipse Magnetics Ltd, Sheffield, Vereinigtes Königreich

## 2.3 Technische Geräte

### 2.3.1 Chirurgie

Olympus KL 1500 LCD (LED-Licht)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Olympus Stereo Mikroskop SZ51	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
T/Pump (Wärme-Matte)	Gaymar Industries, Orchard Park (New York), USA

### 2.3.2 Mikroskopie

Olympus FV1200 MPE Multiphotonen Mikroskop x25/1.05 Wasser Immersionsobjektiv	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Olympus FV1000 MPE Multiphotonen-Mikroskop x25/1.05 Wasser Immersionsobjektiv	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
MaiTai eHP/HP Titanium:sapphire Laser	Newport/ Spectraphysics, Irvine, California, USA
Manuelle XY Stage	Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland parts by Thorlabs Inc, Newton (New Jersey), USA
Spinal Cord Clamps	NARISHIGE INTERNATIONAL LIMITED, London, U.K.

### 2.3.3 Daten-Analyse / Software

Adobe Creative Suite 6 (Photoshop, Illustrator)	Adobe Systems, Inc., San Jose, California, USA
ImageJ/ FIJI	General Public License <a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html">http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html</a>
Graphpad Prism	GraphPad Software, La Jolla, California, USA
Microsoft Office (Powerpoint, Excel, Word)	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

### 2.3.4 Versuchstiere

Verwendet wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter von 6-12 Wochen, die auf einem C57/BL6 Hintergrund gezüchtet wurden. Zur Darstellung der intra-axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden Thy1-CerTN-L15-Tiere und Thy1-TN-XXL- Tiere eingesetzt. Diese Tiere exprimieren den genetisch kodierten  $\text{Ca}^{2+}$  Indikator (GECI) CerTN-L15 (Heim & Griesbeck 2004) bzw. TN-XXL (Mank et al. 2008) unter der Kontrolle eines Thy1 Promoters (Heim et al. 2007; Drenberger et al. 2012). Für die Untersuchungen zur Rolle pH-sensitiver Ionenkanäle wurden  $\text{Asic1}^{-/-}$  (acid-sensing (proton-gated) ion channel 1)-Tiere ((Price et al. 2000), JAX stock #013126) mit CerTN-L15 Tieren gekreuzt.

Die Tiere wurden im Tierstall unseres Instituts unter Standardbedingungen (spezifisch pathogenfrei) gehalten. Dabei kamen Eurostandard Typ II Käfige (365x207x140mm, Techniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) innerhalb eines einzel belüfteten (IVC) Käfigsystems zum Einsatz. Es wurden maximal 5 Tiere in einem Käfig gehalten und mit autoklaviertem Futter (Sniff, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum versorgt. Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den lokalen Vorgaben durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Induktion der EAE

Für dieses Projekt induzierten wir eine spinale EAE, entsprechend dem in unserem Labor etablierten Standardprotokoll (Abdul-Majid et al., 2000; Eugster et al., 1999). Dabei erhalten die Tiere eine Emulsion, die 0,2 mg des Myelin-Oligodendrozyten (MOG, N1-N125, hergestellt in E-coli) Proteins gelöst in Natriumacetat-Puffer und 0,625 mg Mykobakterium tuberculosis in komplettem Freundschens Adjuvans enthält. Den Tieren werden

**Tabelle 2:** Klinischer EAE Score

0	keinen erkennbaren Krankheitszeichen
0,5	distale Schwanzschwäche
1	komplette Schwanzschwäche
1,5	Gangunsicherheit
2	Schwäche der Hinterbeine
2,5	Nachziehen der Hinterbeine
3	Komplette Lähmung der Hinterbeine
3,5	Lähmung der Hinterbeine und Schwäche der Vorderbeine
4	Komplette Lähmung von Vorder-/Hinterbeinen
5	Tod

unter Ketamin-Xylazin Anästhesie jeweils subkutan 100µl der Emulsion in jede Flanke sowie 50µl in den Schwanzansatz injiziert. Am Tag der Immunisierung sowie 2 Tage später wird den Tieren intraperitoneal 250 ng Pertussistoxin (verdünnt in PBS) injiziert.

Die Tiere werden ab dem ersten Tag der EAE Induktion täglich kontrolliert, gewogen und klinisch untersucht. Die klinische Beurteilung des Krankheitsverlaufes erfolgt dabei anhand einer Standard EAE-Skala (von 0 bis 5):

#### 2.4.2 Chirurgische Techniken

Die Operationsverfahren zur subduralen Farbstoffinjektion und *in-vivo* Mikroskopie des dorsalen Rückenmarks wurde wie bereits gesondert beschrieben (Kerschensteiner et al., 2005; Misgeld et al., 2007a) durchgeführt. Die Tiere wurden mittels Ketamin–Xylazine (Ketamin 87 mg/kg, Xylazin 13 mg/kg), (alternativ MMF, Kombinationsanästhesie aus Medetomidin 0.5 mg/kg Körpergewicht, Midazolam 5,0 mg/kg, Fentanyl 0.05 mg/kg) anästhesiert. Nach einer doppelten dorsalen Laminektomie über den Wirbelsegmenten L4 und L5 erfolgte jeweils paravertebral eine Durchtrennung der Muskulatur, um die Wirbelsäule kranial und kaudal der Laminektomie zu exponieren. An diesen Stellen wurden die Tiere in eine Rückenmarks-Halterung (Spinal Cord Clamp) eingespannt.

Für Experimente mit pharmakologischer Wirkstoffapplikation (EGTA, 50 mM in  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$  freiem aCSF, Spermine NONOate, 50mM in aCSF,  $\text{H}_2\text{O}_2$  50mM in aCSF, DMSO, 0.5% in aCSF, Bepridil hydrochloride 0,1mM in 0,5% DMSO in aCSF, KB-R7943 mesylate 0,1mM in 0,5% DMSO in aCSF, Nimodipine 0,2mM in aCSF, Glutamat 100 mM in aCSF, Glycin 10mM in aCSF, NMDA 1mM in aCSF, Glycin 0,1mM in aCSF, Kainate 2mM in aCSF, AMPA 1mM in aCSF, 25 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, 1.5 mM  $\text{NaHCO}_3$ ), wurde die Dura über dem gesamten Bereich der Laminektomie mittels einer Insulin-Nadel entfernt, welche von lateral in den Subduralraum eingeführt und dann unter Spaltung der Dura nach kranial vorgeschoben wurde.

Um ein vollständiges Eintauchen des Objektivs in die Immersionslösung (aCSF) zu gewährleisten und das Rückenmarksparenchym durchgehend mit Flüssigkeit bedeckt zu halten wurde eine Wanne aus 2% Agarose um den Bereich der Laminektomie modelliert.

#### 2.4.3 In-vivo Mikroskopie des Rückenmarks

Die *in-vivo* Mikroskopie erfolgte, wie vormals beschrieben (Williams et al, Nikic et al, Romanelli et al). Zusammengefasst wurden die Tiere anästhesiert, es erfolgte eine Laminektomie und eine mechanische Fixation der Wirbelsäule, um Atmungsartefakte zu minimieren. Mittels eines 25c/1,05w Immersionsobjektivs (Olympus) wurden an einem Olympus FV1000/FV1200 MPE Multiphotonensystem mit einem abstimmbaren, Femtosekunden gepulsten Ti:Sapphire Laser 3D Bildstapel aufgenommen. Für die Messung der

Ca<sup>2+</sup>-Dynamiken *in-vivo* wurde die Wellenlänge des Lasers auf 840nm abgestimmt. Das emittierte Licht wurde zuerst durch einen 690nm halbdurchlässigen Spiegel (short pass dichroic mirror) gefiltert. Für die FRET-Mikroskopie kam ein CFP/YFP Filterwürfel zur Verwendung. Dabei wurde das Licht mittels eines 505nm halbdurchlässigen Spiegels in den CFP und den YFP Kanal getrennt. In einem zweiten Schritt wurde das Licht durch ein 460-500 // 520-560 nm (FV1000 MPE) oder 455-490 // 526-557 nm (FV1200 MPE) Filter gefiltert. Als Detektoren wurden Gallium Arsenid Phosphid (GaAsP) Photomultiplier (PMTs) eingesetzt.

#### 2.4.4 Datenanalyse

Die aufgenommenen Bilder wurde mit der *open-source* Bildanalyse Software ImageJ/Fiji weiterverarbeitet und ausgewertet. Für die Datenanalyse wurde jeder Kanal einzeln in einem Schwarz-Grau-Lookuptable dargestellt. Für die Analyse über die Zeit wurden die Bildstapel in ImageJ/Fiji halbautomatisch für XY-Translation registriert. Für jedes Axon wurde dabei nach morphologischen Kriterien eine Einteilung in ein Stadium der FAD und basierend auf der FRET Ratio in hoch bzw. niedrig-Ca<sup>2+</sup> vorgenommen (0: morphologisch unauffällig, 1: geschwollen, 2 fragmentiert) und eine Ca<sup>2+</sup>-Messung durchgeführt. In den Behandlungsexperimenten über 4 Stunden wurden nur Axone ausgewertet, die über den gesamten Zeitraum des Experiments verfolgt werden konnten.

In den Therapieexperimenten war der Auswerter gegenüber dem Therapiestatus des Tieres verblindet, nur in den EGTA-Experimenten war eine Verblindung aufgrund des deutlichen Effekts nicht sinnvoll möglich. Neuriten, die orthogonal zum Rückenmark verliefen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen, da diese oftmals von oberflächlich gelegenen Neuronen stammen und so auch Dendriten sein könnten.

Für die Einteilung der Axone in hoch- bzw. niedrig-Ca<sup>2+</sup> führten wir für jeden Zeitpunkt pro Axon eine FRET Messung durch. Hierfür wurde freihand jeweils eine *region of interest* (ROI) in das Axon und parallel zum Axon in den Hintergrund eingezeichnet. Mit ImageJ/Fiji wurde die mittlere Intensität der ROI bestimmt. Nach Subtraktion des Hintergrundsignals wurde eine Ratio aus YFP/CFP gebildet. Basierend auf der mittleren Ratio +3 SD in gesunden Kontrolltieren wurde ein Schwellenwert für Axone mit hohem Ca<sup>2+</sup> berechnet. Zur Erstellung der ratiometrischen Abbildungen wurden die folgenden Bearbeitungsschritte in Fiji durchgeführt: 1) “*Maximum-Intensity*” Projektion des Bildstapels für den CFP- und YFP-Kanal. 2) Erstellen einer binären Maske auf Basis des YFP-Kanals mit Schwellenwert. 3) Multiplikation des CFP- und YFP-Kanals mit der binären Maske. 4) Division des YFP- durch den CFP-Kanal (YFP/CFP). 5) Einfügen einer eigens erstellten (Minh Schumacher) Lookup Table von Blau über Magenta zu gelben Farbönen (niedrig zu hohem Ca<sup>2+</sup>). Die Bilddateien wurden in Photoshop exportiert und mittels der “overlay” Funktion dem originalen Graustufen-YFP-Kanal überlagert.



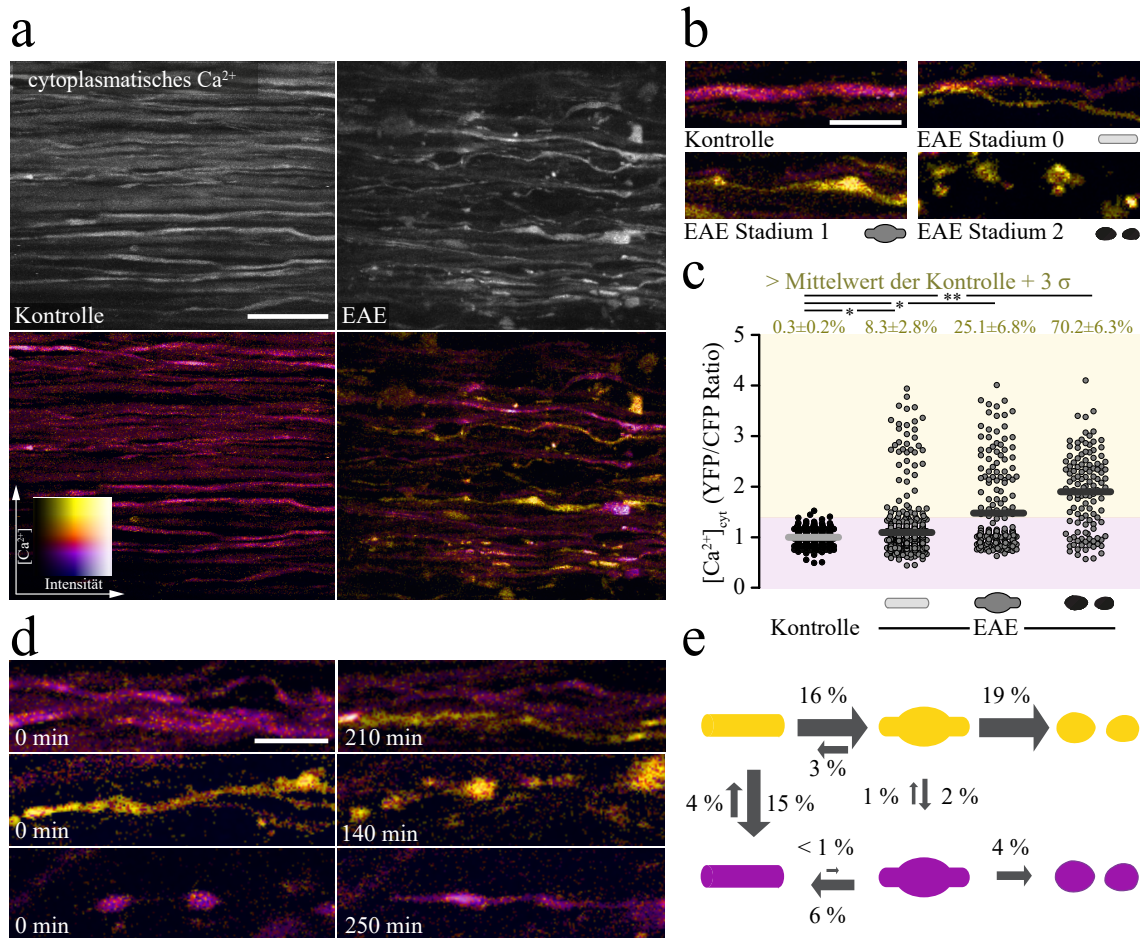
### Kapitel 3: Zusammenfassung relevanter Vorergebnisse unserer Arbeitsgruppe

Bereits vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich mit Prozessen und Mechanismen der entzündlich-mediierten Axonschädigung in EAE. Dabei wurde mittels *in-vivo*-Mikroskopie im Rückenmark eine neue Art der Axondegeneration beschrieben. Diese, sogenannte "Fokale Axonale Degeneration" (FAD) ist durch eine typische Abfolge von morphologischen Stadien gekennzeichnet. Dabei kommt es (1) zur Entstehung fokaler Schwellungen und (2) zur Fragmentation von Axonen. Bemerkenswerterweise verweilen einzelne Axone über den Zeitraum von Stunden bis Tagen im Stadium 1 (Axonschwellung) und dieses Stadium ist in einem Teil der Axone spontan reversibel. Damit bietet sich ein Zeitfenster für eine mögliche therapeutische Intervention (Nikić et al. 2011).

In darauf aufbauenden Experimenten etablierte Minh Schumacher die Untersuchung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  anhand des genetisch in Axonen exprimierten  $Ca^{2+}$ -Sensors CerTN-L15. Dabei ist die axonale  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  im gesunden Rückenmark eng reguliert. In entzündlichen EAE-Läsionen dagegen finden sich bereits im Stadium 0 (morphologisch unauffällige Axone) aber auch im Stadium 1 (Schwellung) und 2 (Fragmentation) erhöhte  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ .

Die Analyse der  $Ca^{2+}$ -Dynamiken einzelner Axone über die Zeit ergibt, dass die axonale  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  möglicherweise das Schicksal einzelner Axone bestimmt. So ist es (1) für ein Stadium 0 Axon mit hoher  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  wahrscheinlicher zu schwellen und zu fragmentieren als mit niedriger  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . (2) Es besteht sowohl bei Stadium 0- als auch bei Stadium 1-Axonen das Potential, die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  wieder zu normalisieren und damit das Fragmentationsrisiko zu reduzieren.

Diese Ergebnisse weisen auf eine zentrale Rolle von  $Ca^{2+}$  für die Initiierung und Unterhaltung der FAD hin. Die genauen Mechanismen, welche zum Eintritt von  $Ca^{2+}$  führen, sind dabei nur unvollständig verstanden und stellen potentielle Ansatzpunkte für eine neuroprotektive Therapie bei entzündlicher Axonschädigung dar.



**Abbildung 8: *In-vivo* 2-Photonen Mikroskopie axonaler  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Dynamiken in EAE.** a) *In-vivo* multiphotonen Projektionsbild von Axonen im gesunden Rückenmark (links) und einer akuten EAE Läsion (rechts, farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ). b) Stadien 0-2 der fokalen Axondegeneration, bereits bei morphologisch unauffälligen Axonen kommt es zum Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . c)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , dargestellt als YFP/CFP Ratio einzelner Axone im Rückenmark gesunder Kontrolltiere und EAE-Tiere (Stadium 0, 1, 2). d) und e) Schicksal und Transitions Wahrscheinlichkeiten pro Axon-Stunde für Axone mit hoher (gelb) und niedriger (magenta)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  (Daten erhoben und Abbildung erstellt von Minh Schumacher).

## Kapitel 4: Ziele der Studie

Die entzündungs-medierte Axondegeneration im ZNS trägt maßgeblich zum irreversiblen Fortschreiten der neurologischen Funktionsstörung bei MS-Patienten bei. Wie die fokalen Entzündungsprozesse Axone schädigen und welche Mechanismen dadurch aktiviert werden ist nur unvollständig verstanden. In vorausgegangenen Studien Minh Schumacher die *in-vivo* Anwendung des genetischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators CerTN-L15 in entzündlichen EAE Läsionen im Rückenmark etablieren und zeigen, dass bei der FAD die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  eine entscheidende Rolle für das Schicksal der Axone spielt.

Dabei ist hervorzuheben, dass ein Teil der Axone in der Lage ist, die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  wieder selbstständig auf ein physiologisches Niveau zu regulieren und so der Degeneration/Fragmentation zu entgehen. Diese Gruppe von Axonen befindet sich also in einem metastabilen Zustand, der therapeutische Optionen eröffnet. Ziel dieser Studie war es, im EAE Modell zu untersuchen, welche immunologischen Mechanismen die Axonschädigung in entzündlichen ZNS-Läsionen vermitteln und über welche Eintrittspforten  $\text{Ca}^{2+}$  in die Axone gelangt. Dafür sollen die folgenden Fragen detailliert betrachtet werden:

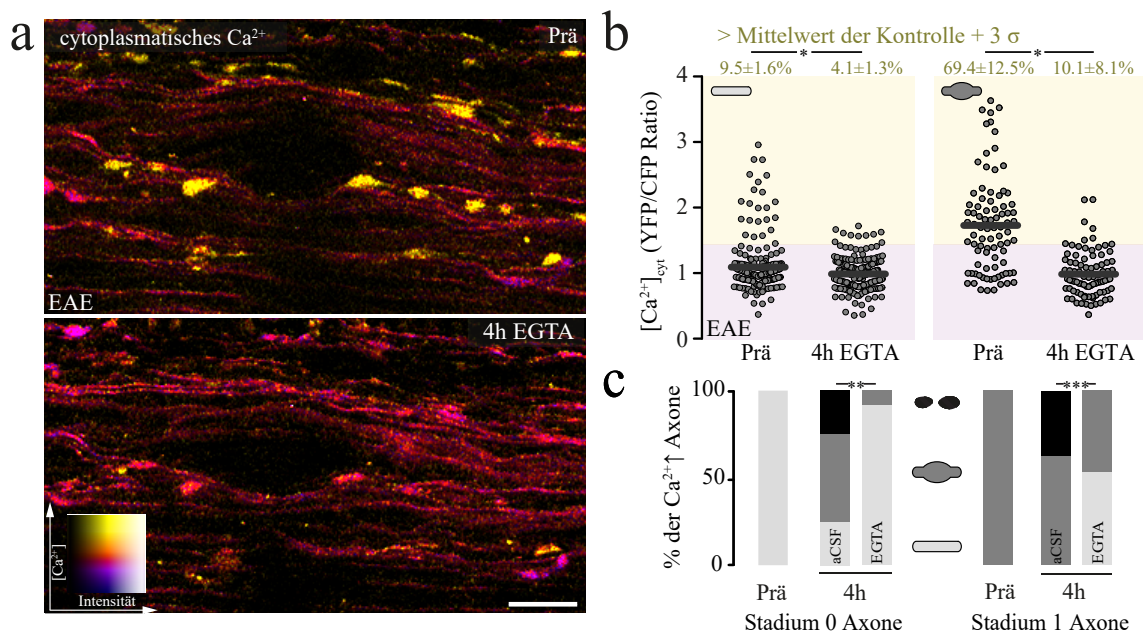
- ❖ Was sind mögliche Quellen des Anstiegs der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in Axonen?
- ❖ Welche entzündlichen Mediatoren vermitteln den Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ?
- ❖ Lassen sich die identifizierten Mechanismen pharmakologisch in gesunden Tieren inhibieren?
- ❖ Zeigen diese pharmakologischen Inhibitoren eine therapeutische Wirkungen bei EAE?

5.1 Quellen des intra-axonalen  $\text{Ca}^{2+}$

5.1.1 EGTA verzögert die fokale Axondegeneration

Wie die vorangegangenen Untersuchungen von Minh Schumacher zeigen, bestimmt die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  das Schicksal von Axonen während der FAD. Um die zentrale Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  in diesem Prozess zu prüfen und um die Quelle der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation zu untersuchen, führten wir die folgenden Experimente durch.

Wir reduzierten die extrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$  in akuten EAE Läsionen (2 oder 3 Tage nach Symptombeginn) durch Komplexierung mittels hoher EGTA-Konzentrationen (50mM) und quantifizierten die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in einzelnen Axonen sowie das Stadium der Axondegeneration (Stadium 0,1,2) über einen Zeitraum von 4 Stunden (Abbildung 9).

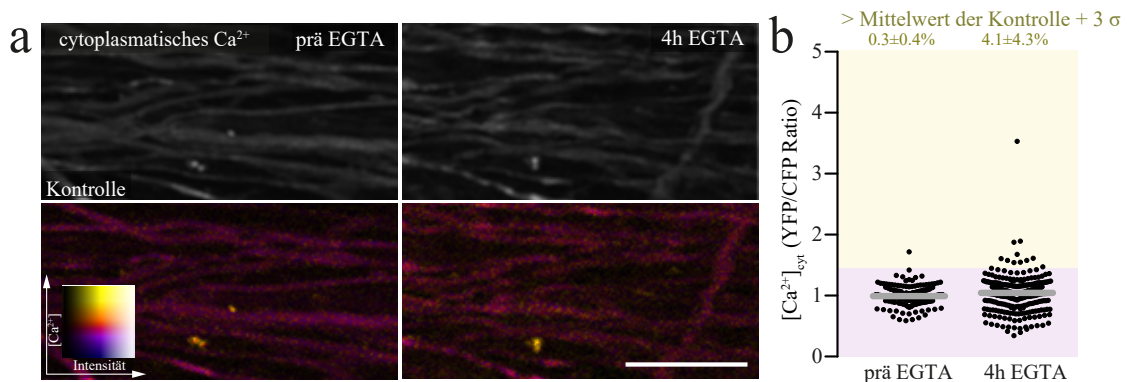


**Abbildung 9: Der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ist entscheidend für die fokale Axondegeneration (FAD).** a) *In-vivo* multiphotonen Projektionsbild einer akuten EAE Läsion (farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , oben vor EGTA-Applikation, unten nach 4h EGTA 50mM). (b)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , dargestellt als YFP/CFP Ratio einzelner Stadium 0 (n=5 Tiere) und Stadium 1 (n=5 Tiere) Axone vor („prä“) und nach („4h EGTA“) Applikation von EGTA (*paired t Test*). (c) Schicksal einzelner Stadium 0 (n=8 Tiere) und Stadium 1 (n=8 Tiere) Axone mit initial erhöhter  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  über 4h mit („EGTA“) und ohne („aCSF“) Reduktion der extrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  (*chi-square Test*). Oben: Anteil (in Prozent der Axone mit einer  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  von  $\geq 3$  Standardabweichungen ( $\sigma$ ), als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . Skala in a: 25  $\mu\text{m}$

Die Behandlung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator EGTA verhindert einerseits effektiv einen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg in Axonen und senkt andererseits pathologisch erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Werte auf ein physiologisches Niveau. Korrespondierend hat die Applikation von EGTA einen günstigen Effekt auf das Schicksal der Axone. So zeigt sich morphologisch über den betrachteten Zeitraum eine verminderte Schwellungsrate in Stadium 0 Axonen. Zusätzlich verhindert die Applikation von EGTA effektiv die Fragmentation initial geschwollener (Stadium 1) Axone. In Zusammenschau zeigen diese Befunde, dass der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  entscheidend für das Voranschreiten der fokalen Axondegeneration sein könnte.

### 5.1.2 EGTA beeinflusst $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ im gesunden Tier nicht

Um auszuschließen, dass die unter EGTA-Behandlung beobachtete Normalisierung der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  durch eine direkte Interaktion des Chelators mit dem Biosensor beeinflusst wird, kontrollierten wir die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in gesunden CerTN-L15 Tieren unter EGTA-Behandlung über vier Stunden. Im gesunden Rückenmark ist die axonale  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in engen Grenzen reguliert und es zeigt sich unter EGTA Behandlung kein Hinweis auf eine systematische Veränderung der YFP/CFP Ratio im Sinne einer direkten Sensormodulation durch EGTA.



**Abbildung 10: In gesunden Tieren verändert die Behandlung mit EGTA die axonale  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  nicht.** (a) In vivo multiphotonen Projektionsbild des Rückenmarks einer gesunden Thyl1-CerTN-L15 Maus vor (links, "prä EGTA") und nach (rechts, "4h EGTA") Applikation von EGTA 50mM (oben: Axon Morphologie, unten: farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ). (b)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  ("YFP/CFP ratio") einzelner Axone vor (links, "prä EGTA") und nach (rechts, "4h EGTA") Applikation von EGTA (n=3 Tiere, *paired t-test* nicht signifikant). Oben: Anteil (in Prozent der Axone mit einer  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  von  $\geq 3$  Standardabweichungen ( $\sigma$ ), als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. Skala in **a**: 25  $\mu\text{m}$

## 5.2 Mediatoren der fokalen Axondegeneration

Nachfolgend untersuchten wir mögliche Mediatoren eines  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstiegs im Rahmen der FAD. Basierend auf den vorangegangenen EGTA-Experimenten gingen wir dabei primär von Mechanismen aus, die einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär vermitteln.



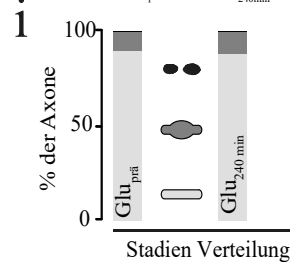
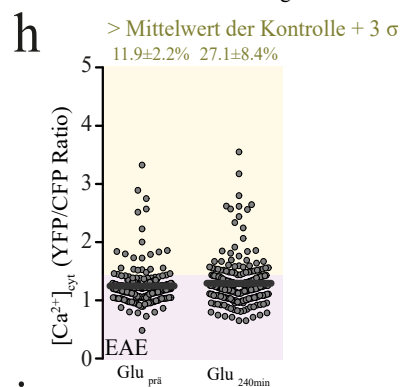
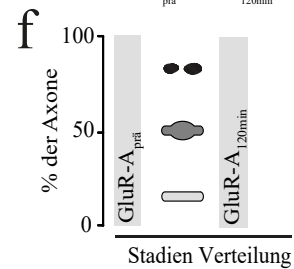
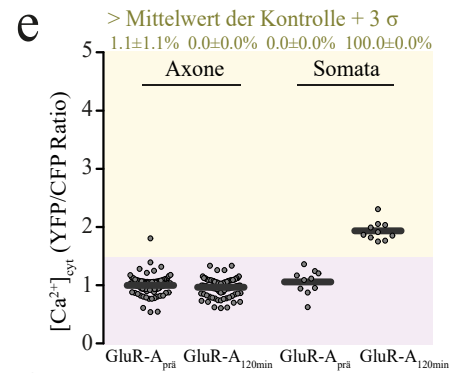
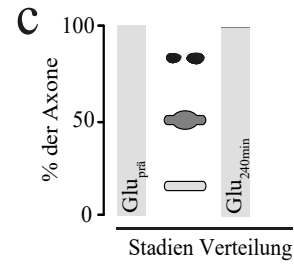
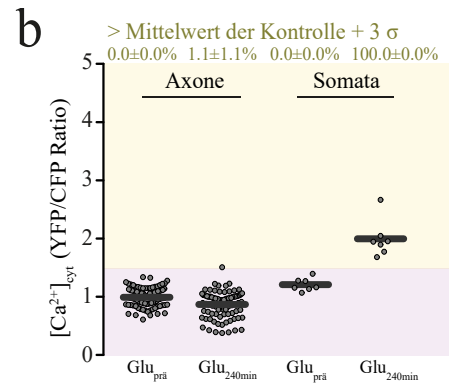
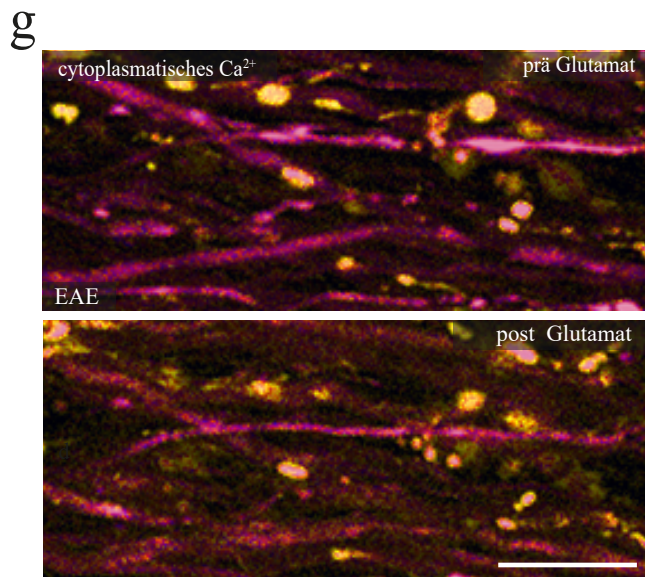
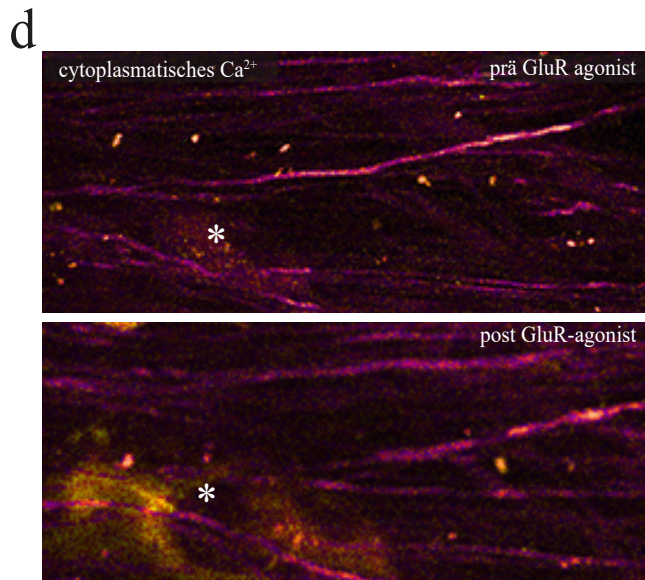
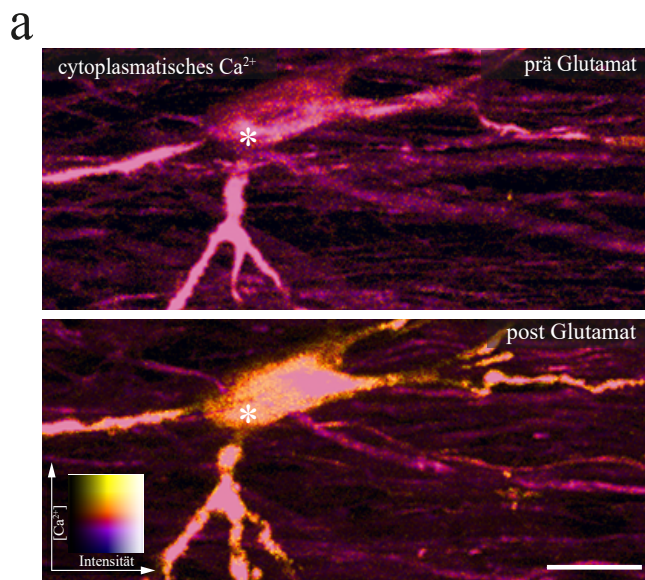
Hierfür selektierten wir basierend auf der Literatur Kandidaten, für die eine axonschädigende Wirkung in EAE beschrieben ist: (1) Glutamat und Glutamat-Agonisten (Sarchielli et al. 2003; Azevedo et al. 2014), (2) Azidose (Friese et al. 2007), (3) reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Haider et al. 2011) und (4) reaktive Stickstoffspezies (RNS) (Redford, Kapoor, and Smith 1997). In einer Serie von Experimenten untersuchten wir zunächst, ob diese Schädigungsmechanismen prinzipiell in der Lage sind, einen axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in gesunden oder an EAE erkrankten CerTN-L15-Tieren auszulösen.

### 5.2.1 Glutamat bewirkt keinen Anstieg der axonalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

Basierend auf der Hypothese, dass ionotrope Glutamatrezeptoren in Axonen einen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Einstrom vermitteln, behandelten wir oberflächliche Rückenmarksaxone über einen Zeitraum von 4 Stunden mit hochkonzentrierter Glutamat- und Glycin-Lösung (Glutamic monosodium hydrate 100mM, Glycine 10mM in aCSF) sowie mit Glutamatrezeptoragonisten (NMDA 1mM, Glycine 0,1mM, Kainate 2mM, AMPA 1mM) unter Anästhesie mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (MMF). Diese Experimente zeigten über den Beobachtungszeitraum keinen Effekt auf die axonale  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

Dagegen fanden sich einzelne neuronale Somata, die unter Glutamatexposition mit einem deutlichen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg reagierten, gewissermaßen als interne Kontrolle für eine ausreichende Glutamatkonzentration im Zielgewebe (Abbildung 11). Um auszuschließen, dass EAE-abhängige Effekte die Glutamatrezeptorexpression an Axonen beeinflussen, wiederholten wir die Applikation von Glutamat/Glycin (Glutamic monosodium hydrate 100mM, Glycine 10mM in aCSF) bei EAE Tieren. Auch bei der akuten EAE kam es hierunter zu keinem eindeutigen Effekt auf die axonale  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  und die fokale Axondegeneration (Abbildung 11).

Zusammenfassend besteht kein Anhalt für eine direkte Schädigung der betrachteten Axonpopulation durch Glutamat und andere Glutamatrezeptor-Agonisten, sowohl im gesunden Rückenmark als auch bei EAE.

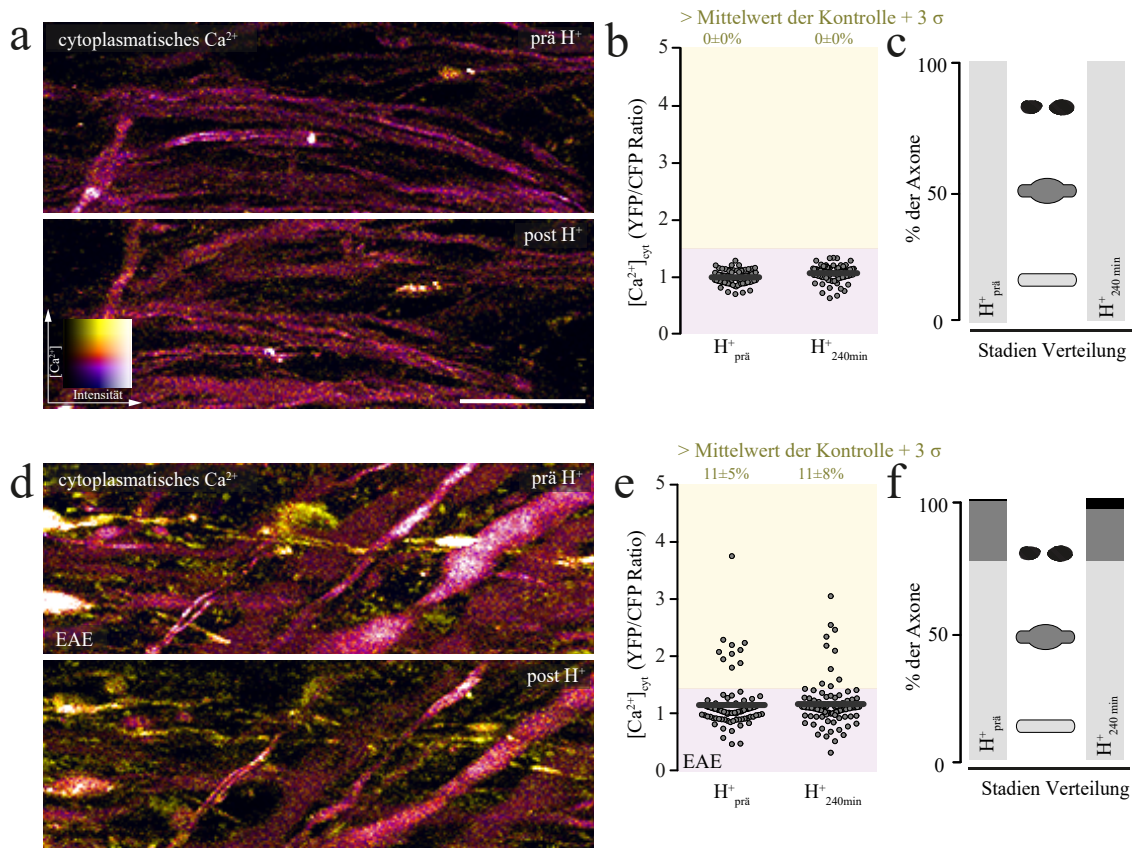


**Abbildung 11: Glutamat und Glutamatagonisten verursachen keinen Anstieg der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$**  a) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild des Rückenmarks einer gesunden Thy1-CerTN-L15 Maus vor (oben, "prä Glutamat") und nach (unten, "post Glutamat") Applikation von Glutamat 100mM und Glycin 10mM farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (Asterisk auf neuronalem Soma). b)  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  und c) Stadienverteilung einzelner Axone und Somata (nur b) vor und 240 Minuten nach Applikation von Glutamat 100mM und Glycin 10mM (n=3 Tiere, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* für Anteil  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -hohe-Axone und *chi-square test* für Stage-Verteilung nicht signifikant). d) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild des Rückenmarks einer gesunden Thy1-CerTN-L15 Maus vor (oben, "prä GluR-agonist") und nach (unten, "post GluR-agonist") Applikation von Glutamatrezeptoragonisten (NMDA 1mM, Glycine 0,1mM, Kainate 2mM, AMPA 1mM) farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . e)  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  und f) Stadienverteilung einzelner Axone und Somata (nur e) vor und 120 Minuten nach Applikation von Glutamatrezeptoragonisten (n=3 Tiere; *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* für Anteil  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -hohe-Axone und *chi-square test* für Stage-Verteilung nicht signifikant).g) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild des Rückenmarks einer akuten EAE-Läsion einer Thy1-CerTN-L15 Maus vor (oben, "prä Glutamat") und nach (unten, "post Glutamat") Applikation von Glutamat 100mM und Glycin 10mM farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . h)  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  und i) Stadienverteilung einzelner Axone vor und 240 Minuten nach Applikation von Glutamat 100mM und Glycin 10mM (n=5 Tiere, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* für Anteil  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -hohe-Axone und *chi-square test* für Stage-Verteilung nicht signifikant). Oben (b,e,h,): Anteil (in Prozent der Axone mit einer  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  von  $\geq 3$  Standardabweichungen ( $\sigma$ ), als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. Skala in **a, d, g**: 25  $\mu$ m

### 5.2.2 Azidose bewirkt keinen Anstieg der axonalen $[Ca^{2+}]_{cyt}$

Für entzündliche EAE-Läsionen sind erniedrigte pH Werte beschrieben, die eine Öffnung von pH-sensitiven Ionenkanälen (Acid-sensing ion channel-1, Asic1) auslösen können (Friese et al. 2007). Wir untersuchten, ob ein Absenken des pH-Wertes im Rückenmark gesunder CerTN-L15-Tiere einen direkten Anstieg der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  vermittelt. Zu diesem Zweck stellten wir eine stark gepufferte Lösung mit pH 6.2 (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid) her und behandelten die oberflächlichen Axone des Rückenmarks damit über einen Zeitraum von 240 Minuten. Wir quantifizierten jeweils zu Beginn und zu Ende des Experiments die axonale  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  und konnten so keinen akuten pH-medierte[n]  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstieg (Anteil  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -hohe Axone:  $0\pm 0\%$ ; Mittelwert $\pm$ Standardfehler) oder morphologische Hinweise auf eine FAD erzielen. Um auszuschließen, dass es in der EAE durch veränderte  $Ca^{2+}$ -Kanalexpressionsmuster oder durch Demyelinisierung zu einer verstärkten pH Sensitivität kommt, wiederholten wir die Experimente bei Tieren mit akuter EAE (on+2, on+3). Hier konnte über den Beobachtungszeitraum von 4h ebenfalls kein pH vermittelter Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (Anteil  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -hohe Axone pre:  $11\pm 5$ ; Mittelwert $\pm$ Standardfehler vs. post:  $11\pm 8$ ; Mittelwert $\pm$ Standardfehler) oder morphologische Zeichen einer Axonschädigung beobachtet werden.



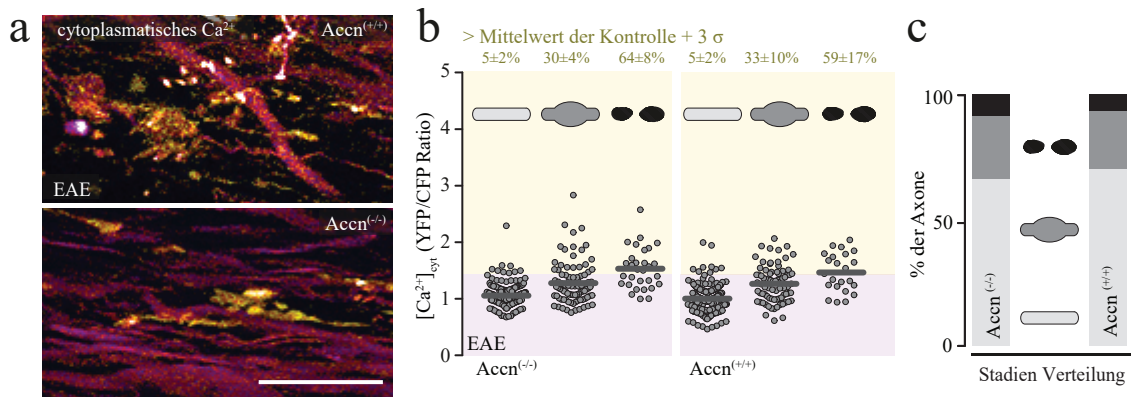


**Abbildung 12: Azidose löst keinen Anstieg der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  aus** a) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild des Rückenmarks einer gesunden Thy1-CerTN-L15 Maus vor (oben, "prä H<sup>+</sup>") und nach (unten, "post H<sup>+</sup>") Applikation von aCSF mit pH 6.2 (mit 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid-gepuffert) farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  b)  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  und c) Stadienverteilung einzelner Axone vor und 240 Minuten nach Applikation von aCSF mit pH 6.2 (n=3 Tiere; *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* für Anteil  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -hohe-Axone und *chi-square test* für Stage-Verteilung nicht signifikant). d) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild des Rückenmarks einer akuten EAE-Läsion einer Thy1-CerTN-L15 Maus vor (oben, "prä H<sup>+</sup>") und nach (unten, "post H<sup>+</sup>") Applikation von Applikation von aCSF mit pH 6.2 (mit 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid-gepuffert) farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . e)  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  und f) Stadienverteilung einzelner Axone vor und 240 Minuten nach Applikation von aCSF mit pH 6.2 (n=3 Tiere; *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* für Anteil  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -hohe-Axone und *chi-square test* für Stage-Verteilung nicht signifikant). Oben (b, e): Anteil (in Prozent) der Axone mit einer  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  von  $\geq 3$  Standardabweichungen ( $\sigma$ ), als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. Skala in **a, d**: 25  $\mu$ m

### 5.2.3 Asic1-knock-out bewirkt keine „Neuroprotektion“ in EAE

Der Asic1-Kanal (Friese et al. 2007) unterliegt unter physiologischen Bedingungen einer schnellen Desensitivierung. Daher ist es vorstellbar, dass es unter entzündlichen Bedingungen über einen längeren Zeitraum zu vermehrtem axonalen Stress kommt. Wir immunisierten je eine Gruppe Asic1<sup>-/-</sup> x Thy1-CerTN-L15 (n=7) und Asic1<sup>+/+</sup> x Thy1-CerTN-L15 (n=7) Tiere. Zum Zeitpunkt der akuten EAE (on+2, on+3) quantifizierten wir mittels *in-vivo* 2-Photonenmikroskopie den Anteil von Axonen mit hoher  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (Asic1<sup>-/-</sup>: 5 $\pm$ 2/30 $\pm$ 4/64 $\pm$ 8 vs. Asic1<sup>+/+</sup>: 5 $\pm$ 2/33 $\pm$ 10/59 $\pm$ 17; Stadium 0/Stadium 1/Stadium 2, Mittelwert $\pm$ Standardfehler) sowie die Verteilung der morphologischen Axonstadien.

Dabei zeigte sich weder für axonales  $\text{Ca}^{2+}$  noch für die Axonmorphologie ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.



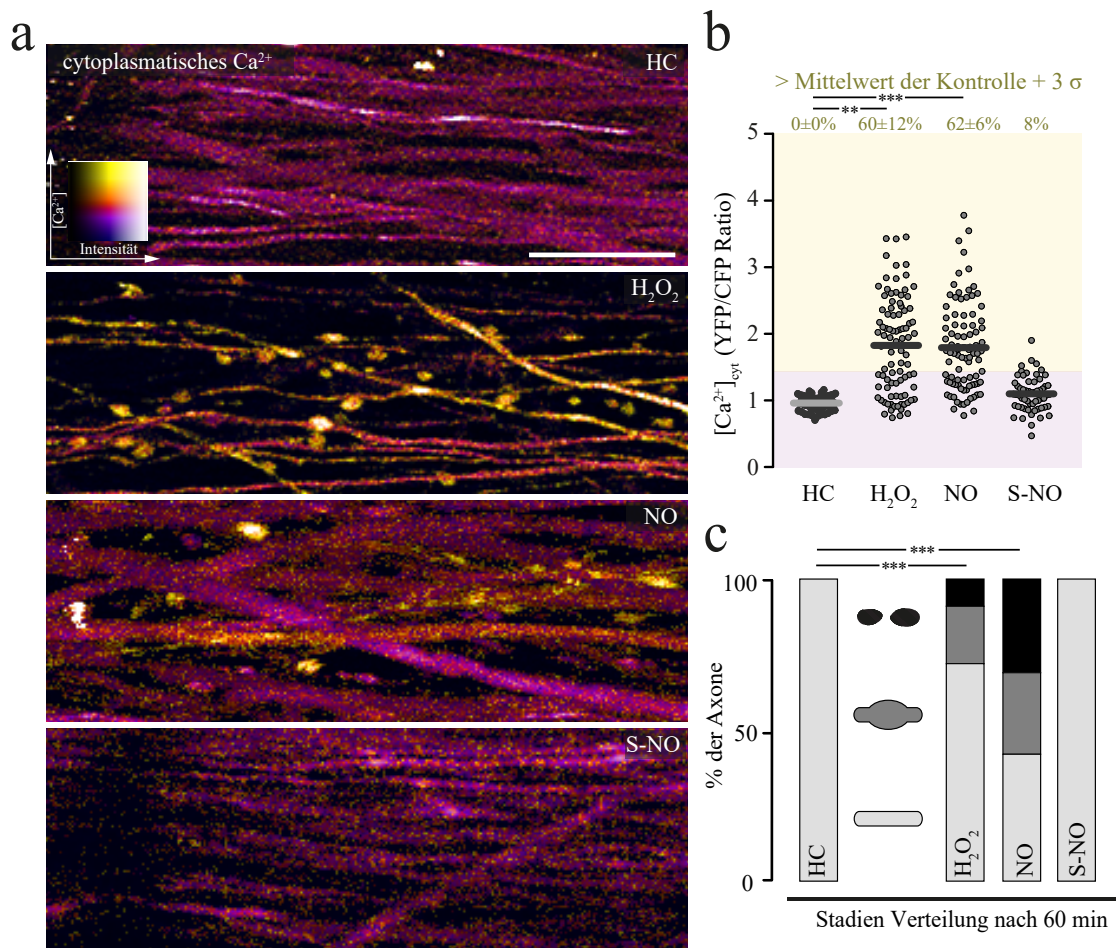
**Abbildung 13: EAE in Asic1-knock-out Tieren** a) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild des Rückenmarks akuten EAE-Läsion einer Thy1-CerTN-L15 x Accn<sup>(+/+)</sup>- (oben) und Thy1-CerTN-L15 x Accn<sup>(-/-)</sup>-Maus farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  b)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  und c) Stadienverteilung einzelner Axone in Thy1-CerTN-L15 x Accn<sup>(+/+)</sup> (n=7 Tiere) und Thy1-CerTN-L15 x Accn<sup>(-/-)</sup>-Tieren (n=7 Tiere; *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* für Anteil  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -hohe-Axone und *chi-square test* für Stage-Verteilung nicht signifikant). Oben (b): Anteil (in Prozent) der Axone mit einer  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  von  $\geq 3$  Standardabweichungen ( $\sigma$ ), als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. Skala in **a**: 25  $\mu\text{m}$

#### 5.2.4 ROS/RNS bewirkt einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

In vorausgegangenen Studien (Nikić et al. 2011) wurden mittels Wasserstoffperoxid- ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Stickstoffoxid- (NO) Indikatoren in EAE-Läsionen erhöhte Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und NO nachgewiesen. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und NO bei gesunden Tieren zu charakteristischen mitochondrialen und axonalen Schäden führt, deren Charakteristika mit der FAD vereinbar sind.

Wir untersuchten, ob diese ROS/RNS-medierte Schädigung ebenfalls mit einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , wie bereits in der FAD beobachtet einhergeht. Zu diesem Zweck applizierten wir  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder den NO-Donator Spermine-NONOate auf das Rückenmark gesunder Thy1-CerTN-L15 Tiere und quantifizierten die axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamiken über den Beobachtungszeitraum von 60 Minuten. Wir konnten zeigen (Abbildung 14), dass sowohl die Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch von NO-Donatoren hinreichend ist, um einen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg und eine Axonschädigung zu induzieren.

Um auszuschließen, dass es zu einer direkten, NO-unabhängigen Schädigung der Axone oder zu molekularen Interaktionen zwischen dem NO-Donator und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor kommt, applizierten wir ein inaktives Analogon des NO-Donators, Sulfo-NONOate auf Axone im gesunden lumbalen Rückenmark. Diese Kontrollexperimente ergaben keinen Hinweis auf eine Schädigung von Axonen und beeinflussten das axonale  $\text{Ca}^{2+}$  nicht (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Applikation von ROS/RNS in gesunden CerTN-L15 Tieren** a) *In vivo* Multiphotonen Projektionsbilder des Rückenmarks gesunder Thy1-CerTN-L15 Mäuse nach Bad-Applikation von künstlichem Liquor (aCSF, gesunde Kontrolle, "HC") sowie aCSF mit Wasserstoffperoxid 100mM ("H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>"), Stickstoffoxid-Donor 50mM ("NO") und inaktiviertem Stickstoff-Donor 50mM ("S-NO") über 60 Minuten. b) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> und c) Stadienverteilung einzelner Axone nach Applikation von künstlichem Liquor (aCSF, gesunde Kontrolle, "HC", n=3 Tiere), Wasserstoffperoxid 100mM ("H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>", n=3 Tiere), Stickstoffoxid-Donor 50mM ("NO", n=3 Tiere) und inaktiviertem Stickstoff-Donor 50mM ("S-NO", n=1 Tier) über 60 Minuten. Oben: Anteil (in Prozent der Axone mit einer [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> von  $\geq 3$  Standardabweichungen ( $\sigma$ ), als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. (a) *unpaired t Test* (b) *chi-square test* \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; Skala in **a**: 25  $\mu$ m

### 5.3 ROS/RNS als Modell der immunmedierten Axondegeneration

Basierend auf diesen Befunden etablierten wir die kontrollierte exogene Applikation von RNS als Modell, um die Mechanismen des inflammatorisch medierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs weiter zu untersuchen. Die vorausgegangen EGTA-Experimente sowie der prompte  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg nach ROS/RNS Applikation machen einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär wahrscheinlich. Aus diesem Grund führten wir die nachfolgenden Experimente durch, um mit Hilfe pharmakologischer Wirkstoffe definierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintrittsmechanismen zu modulieren.

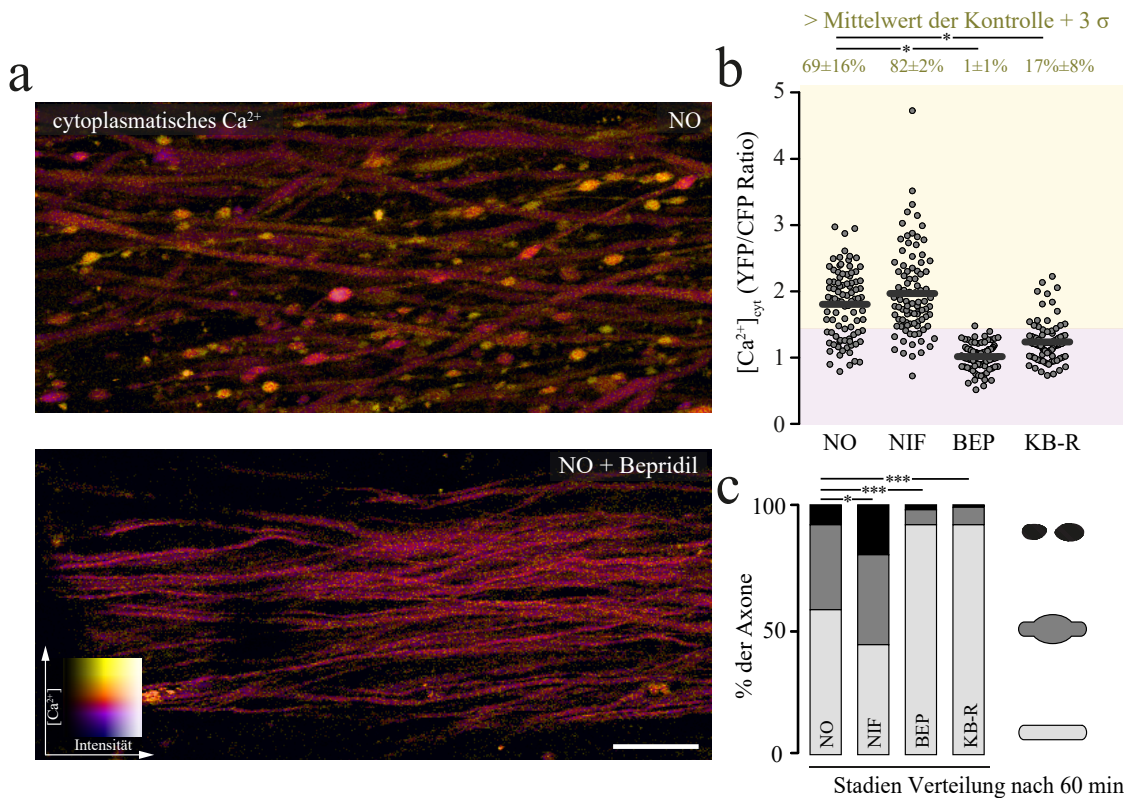


### 5.3.1 L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker

In einer ersten Serie von Experimenten untersuchten wir die pharmakologische Blockade spannungsabhängiger L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle während NO-Applikation mittels Nifedipine 1mM. Diese Experimente zeigten keinen eindeutigen Effekt auf den NO-mediierten axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  Anstieg und die Axon Morphologie (Abbildung 15).

### 5.3.2 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher in RNS-medierter Axonschädigung

Basierend auf der Hypothese, dass in EAE eine NO-mediierte Axonschädigung zu einem Mitochondrienschaden (Nikić et al. 2011) und in der Folge zu ‘virtueller Hypoxie’ mit ATP Mangel, Depolarisation der Zellmembran und Umkehr des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauschers (NCX) (Rossi et al. 2010; Kapoor et al. 2003) führt, inhibierten wir diesen Weg pharmakologisch. Hierfür behandelten wir das lumbale Myelon gesunder Thy1-CerTN-L15 Tie-



**Abbildung 15: Die NO-mediierte Axonschädigung lässt sich pharmakologisch inhibieren.**

a) In vivo Multiphotonen Projektionsbild (farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) des Rückenmarks einer gesunden Thy1-CerTN-L15 Maus nach Badapplikation von Stickstoffoxid (oben, ‘NO’, Spermine-NONOate 50mM, 60min) und Bepridil (unten, ‘NO+Bepridil’, Bepridil 0,1mM + Spermine-NONOate 50mM). b)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  einzelner Axone (dargestellt als ‘YFP/CFP ratio’) und c) Axon-Morphologie 60 Minuten nach Applikation von Stickstoffoxid (‘NO’, Spermine-NONOate 50mM, n=3 Tiere), NO+Nifedipine (‘NIF’, Spermine NONOate 50mM + Nifedipine 1mM, n=3 Tiere), NO+Bepridil (‘BEP’, Spermine NONOate 50mM + Bepridil 0,1 mM, n=3 Tiere) und NO+KB-R7943 mesylate (‘KB-R’, Spermine NONOate 50mM + KB-R7943 mesylate 0,1mM, n=3 Tiere). Oben: Anteil (in Prozent der Axone mit einer  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  von  $\geq 3$  Standardabweichungen ( $\sigma$ ), als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes. (a) unpaired t Test (b) chi-square test \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; Skala in a: 50  $\mu\text{m}$

re vor und während der Applikation des NO-Donators mit dem NCX-Inhibitor Bepridil. Die pharmakologische Blockade des Enzyms führte zu einer deutlichen Reduktion des axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Anstiegs gegenüber den Kontrollexperimenten, in denen nur der NO Donator appliziert wurde (Abbildung 15). Dieser Effekt spiegelt sich auch in der Axonmorphologie wieder (Abbildung 15).

### 5.3.3 Spezifische Blockade des Umkehrmodus des $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers

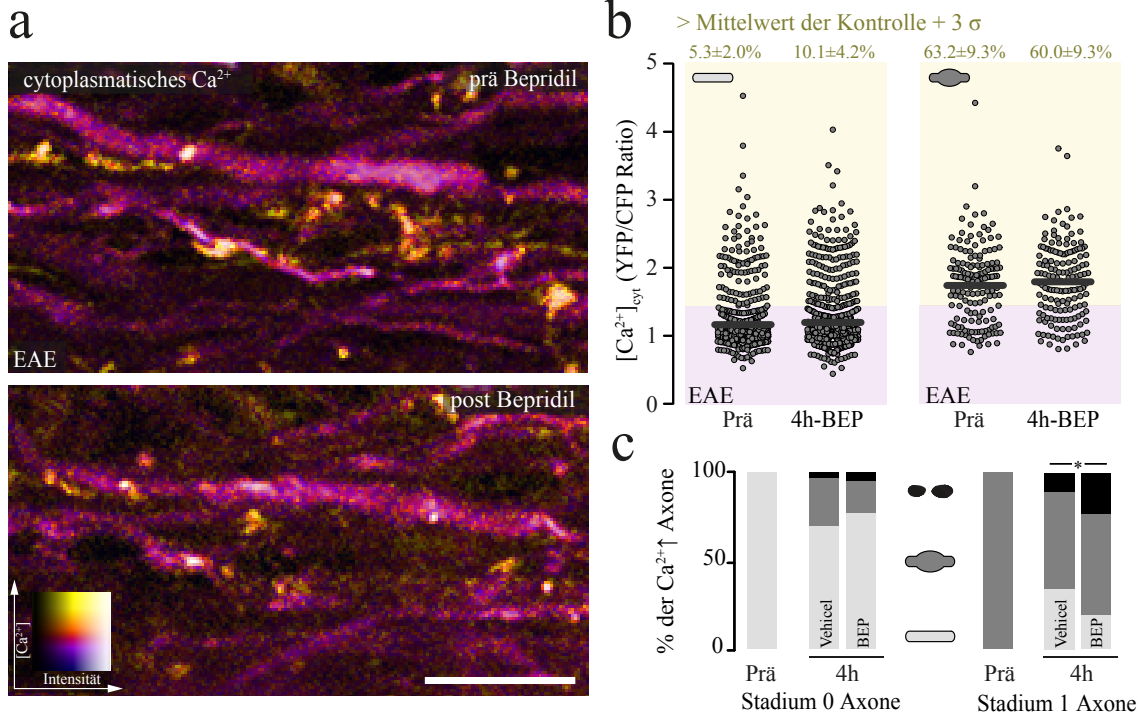
Für den Inhibitor des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers, Bepridil ist ein breites pharmakologisches Wirkspektrum beschrieben. Wir führten daher weitergehende Experimente durch, um den protektiven Effekt von Bepridil auf die NO-medierte Axondegeneration besser zu charakterisieren. Zu diesem Zweck setzten wir den selektiven Inhibitor des Umkehrmodus des NCX, KB-r7943 ein. Diese Experimente bestätigten eine entscheidende Rolle des NCX und zeigten, dass eine pharmakologische Inhibition desselben mit KB-r7943 einen vergleichbaren protektiven Effekt auf das Axonale  $Ca^{2+}$  und die morphologischen Veränderung unter NO-Applikation hat (Abbildung 15).

## 5.4 Therapiestudie mit Bepridil in EAE

Basierend auf den vorangegangenen Befunden inhibierten wir den  $Na^+/Ca^{2+}$  Austauscher pharmakologisch in EAE, um zu prüfen ob sich die fokale Axondegeneration in entzündlichen Läsionen so beeinflussen lässt, dass Axone ihr homöostatisches Gleichgewicht wiederherstellen und das intra-axonalen  $Ca^{2+}$  regulieren können.

Wir applizierten zu diesem Zweck Bepridil 50mM auf das Rückenmark von Thy1-CerTN-L15 Tieren im Stadium der akuten EAE (on+2, on+3) und behandelten die Axone damit über einen Zeitraum von 4 Stunden. Dabei verfolgten wir einzelne Axone in EAE-Läsionen und quantifizierten die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Ebenso werteten wir die morphologischen Veränderungen der Axone aus. Sowohl für die axonale  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  als auch für die morphologischen Veränderungen der Axone wurde kein protektiver therapeutischer Effekt einer pharmakologischen Blockade des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers in EAE festgestellt.

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die Applikation von NO zu einer FAD-ähnlichen Axonschädigung führt. Dieser Effekt lässt sich mittels pharmakologischer Blockade des NCX nahezu vollständig inhibieren. Allerdings hat die Behandlung von Rückenmarksaxonen mit Bepridil im Stadium der akuten EAE keinen protektiven Effekt auf die axonale  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  und die Axon-Morphologie.



**Abbildung 16: Die pharmakologische Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers hat keinen protektiven Effekt auf die axonale  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  und die FAD in EAE.** a) In vivo Multiphotonen Projektionsbild (farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) des Rückenmarks einer Thy1-CerTN-L15 Maus zum Zeitpunkt der akuten EAE (onset+2/onset +3, EAE Score  $>2$ ) vor (oben, "prä Bepridil") und 4 Stunden nach (unten, "post Bepridil") Applikation von Bepridil 0,1mM. b)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  dargestellt als YFP/CFP Ratio einzelner Axone. B) Stadium 0 und Stadium 1 Axone in EAE vor ("Prä") und nach ("4h-BEP") pharmakologischer Inhibition des NCX über 4 Stunden. Oben: Anteil (in Prozent der Axone mit einer  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  von  $\geq 3$  Standardabweichungen ( $\sigma$ ), als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes ( $n=9$  Tiere, im paired t-test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten). c) Schicksal einzelner  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -hoher Stadium 0 ( $n=17$  Tiere, im *chi-square-test* ergab sich kein signifikanter Unterschied) und Stadium 1 Axone (getestet pro Axon in  $n=184$  Axonen in 17 Tieren, *chi-square-test*) vor ("prä") und nach ("4h") Bad-Applikation von Vehicle (1%DMSO in cCSF) und Bepridil 50mM. \* $p < 0.05$ . Scale bar, 25  $\mu\text{m}$ .

In Zusammenschau mit nachfolgenden Untersuchungen Jan Bewersdorf und Maarten Witte deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der frühe  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt zumindest nicht ausschließlich auf eine ROS/RNS medierte Fehlfunktion des NCX zurückzuführen ist. In Experimenten mit extrazellulärer Applikation fluoreszent markierter Cadaverin- und Dextran-Moleküle konnten Jan Bewersdorf und Maarten Witte zeigen, dass in EAE-Läsionen kleinste Defekte der Axon-Membran den Übertritt dieser „Farbstoff-Moleküle“ und damit auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Cytoplasma erlauben.

## Kapitel 6: Diskussion

### 6.1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, (1) Ursachen der immunmedierten akuten Axonschädigung zu untersuchen, (2) zugrundeliegende Mechanismen zu identifizieren und (3) deren therapeutische Modulation an einem Tiermodell der Multiplen Sklerose zu evaluieren. Zusammengefasst konnten wir im ersten Teil der Studie zeigen, dass bei der EAE ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum notwendig für das Fortschreiten der fokalen Axondegeneration ist. Im zweiten Teil untersuchten wir die Wirkung möglicher molekularer Auslöser einer FAD.

Die *in-vivo* Applikation von Glutamat sowie ein Absenken des pH-Wertes lösen keine FAD aus und die axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) bleiben hierunter im Normalbereich. Hingegen induziert die Applikation von ROS/RNS-Spezies eine FAD-ähnliche Axonschädigung mit Anstieg der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  aus. Die pharmakologische Inhibition des NCX verhindert einen NO-medierten Axonschaden nahezu vollständig. Bei der akuten EAE war eine pharmakologische Hemmung des NCX jedoch nicht hinreichend, um eine entzündliche Schädigung von Axonen zu verhindern.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse mit weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe beruht der frühe  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in der FAD in erster Linie auf einer direkten Schädigung der axonalen Membran. Welche Faktoren dieser Membranschädigung zugrunde liegen und wie diese eventuell verhindert werden können ist Gegenstand nachfolgender Untersuchungen.

### 6.2 Stärken und Grenzen der eingesetzten Methoden

#### 6.2.1 Technische Betrachtung der $\text{Ca}^{2+}$ -2-Photonenmikroskopie

In der vorliegenden Studie setzten wir den ratiometrischen FRET CerTN-L15  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator ein, für den sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* eine stabile Expression und Funktion in Neuronen gezeigt wurde (Heim et al. 2007; Siffrin et al. 2010). Die Verwendung eines FRET-Sensors ist für die Untersuchung von axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamiken in EAE Voraussetzung, da die Ausgangsintensität der einzelnen Axone nicht vorbekannt ist.

Mittels FRET- $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren lässt sich aus dem Verhältnis der beiden Fluorophore eine semiquantitative Aussage über die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  treffen. CerTN-L15 ist aufgrund der stabilen genetische Expression in verschiedenen Zielgeweben sowie der homogenen Verteilung

ohne Aggregatbildung in Neuronen gut für unsere Studie geeignet (Heim and Griesbeck 2004).

Im Gegensatz zu Calmodulin-basierten Sensoren ist für Troponin-C außerhalb der Beteiligung an der Muskelkontraktion keine biologische Funktion bekannt, sodass der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Anteil des Sensors kaum physiologische Bindungspartner in Neuronen hat. Durch Untersuchungen zur Anatomie und zum Verhalten von TN-XXL-transgenen Tieren konnte gezeigt werden, dass diese in einzelnen Test leichte, jedoch signifikante Verhaltensvarianten aufweisen. Möglicherweise beruhen diese Effekte auf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -medierten Modulation der Plastizität bestimmter Thalamus-Amygdala Kreisläufe (Direnberger et al. 2012).

In vorangegangenen Studien etablierte Minh Schumacher die Darstellung und Quantifizierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Axonen des Rückenmarks *in-vivo* mittels 2-Photonenmikroskopie. Verschiedene Umgebungsvariablen können dabei das Verhalten des Troponin-C Moleküls beeinflussen (Grienberger and Konnerth 2012). Das Protein besteht aus einer N-terminalen regulatorischen Bindestelle mit zwei niedrig-affinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen und zwei weiteren C-terminalen Bindestellen. Letztere binden mit hoher Affinität  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (Filatov et al. 1999). Damit können Schwankungen der intrazellulären  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration die Messwerte für  $\text{Ca}^{2+}$  verfälschen.

Des Weiteren sind die eingesetzten Fluorophore, wie auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung selbst pH-abhängig. Insgesamt besteht allerdings für CerTN-L15 *in-vitro* nur eine vergleichsweise geringe pH-Abhängigkeit für pH-Werte  $\geq 6,8$ . Das non-lineare Verhalten mit Abfall der FRET-Ratio bei kleineren pH-Werten beruht in erster Linie auf der unterschiedlichen pH-Sensitivität von Citrin und CFP (Griesbeck et al. 2001; Heim and Griesbeck 2004). Da in EAE-Läsionen erniedrigte pH-Werte beschrieben sind (Friese et al. 2007), führte Minh Schumacher Kontrollexperimente in Thy1-CFP23 x Thy1-YFP16 Tieren mit EAE durch. In entzündlichen Läsionen war die YFP:CFP-Ratio bei diesen Tieren unverändert gegenüber der Kontrolle, sodass kein Hinweis auf eine pH-vermittelte Verfälschung des CerTN-L15-Signals bei EAE-Läsionen besteht.

Zusätzlich konnte durch *in-vitro* Versuchen gezeigt werden, dass CerTN-L15 kaum temperaturabhängigen Veränderungen unterliegt (Heim and Griesbeck 2004). Innerhalb dieser Limitationen ist CerTn-L15 also gut zur Messung zellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamiken geeignet (Heim and Griesbeck 2004). Unter definierten Bedingungen lässt sich für CerTN-L15 mittels Titration von  $\text{Ca}^{2+}$  eine Dosis-Wirkungskurve aufstellen und so die spezifische Dissoziationskonstante  $K_d$  des Sensors ermitteln. Diese liegt für CerTN-L15 bei  $1.2 \mu\text{M}$  (Heim and Griesbeck 2004). Da die physiologische  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in Neuronen zwischen  $50\text{nm}$  und  $100\text{nm}$  liegt (Grienberger and Konnerth 2012), werden aufgrund der durch die  $K_d$  gegebenen Affinität des Sensors Veränderungen detektiert, die deutlich über den physiologischen Schwankungen des Ruhe- $\text{Ca}^{2+}$  liegen. Diese sind damit gut geeignet, um einen biologisch signifikanten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  zu messen.



In der vorliegenden Studie unterscheiden wir entsprechend anhand eines Schwellenwertes (Mittelwert der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  gesunder Kontrollaxone + 3 Standardabweichungen) Axone mit niedriger  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  von Axonen mit hoher  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

Diese binäre Interpretation des Signals wurde gewählt, da Messungenauigkeiten durch die oben diskutierten Einflussfaktoren keinen direkten Rückschluss auf die exakte  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  erlauben. Schließlich ist es wichtig zu berücksichtigen, dass  $Ca^{2+}$ -Indikatoren Veränderungen der freien  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  messen (Grienberger and Konnerth 2012). Die freien  $Ca^{2+}$ -Ionen stehen im Gleichgewicht mit den an  $Ca^{2+}$ -Puffer wie Calretinin, Parvalbumin, Calbindin-D9k und Calbindin-D28k gebundenen Ionen (Schwaller 2010). Da  $Ca^{2+}$ -Indikatoren stets als exogene  $Ca^{2+}$ -Puffer wirken (Helmchen, Imoto, and Sakmann 1996) und so zur Gesamtmenge des verfügbaren  $Ca^{2+}$ -Puffers in der Zelle beitragen, verändern  $Ca^{2+}$ -Indikatoren auch das Gleichgewicht der freien  $Ca^{2+}$ -Ionen (Neher and Augustine 1992).

In vorangegangenen Studien konnte Minh Schumacher für den CerTN-L15 Sensor keine Abhängigkeit der FRET-Ratio von der Signalintensität (als Maß der Expression) nachweisen, sodass kein deutlicher Hinweis auf eine biologisch signifikante Auswirkung dieses Effekts auf die Axone bei EAE besteht. In meinen Experimenten detektierte ich entsprechend nach *in-vivo* Applikation  $Ca^{2+}$ -freier EGTA-Lösung bei EAE eine Normalisierung erhöhter FRET-Ratios sowie nach Stimulation von Neuronen im Rückenmark mit Glutamat einen deutlichen Anstieg der FRET-Ratio.

Zusammengefasst erfüllt der angewandte Sensor also die folgenden Voraussetzungen: (1) eine homogene und helle Darstellung einzelner Neuronen und ihrer Axone, (2) Funktionalität des exprimierten Proteins zur Messung von  $Ca^{2+}$ -Dynamiken über der natürlichen Schwankung mittels 2-Photonenmikroskopie, (Heim et al. 2007) (3) ausreichende Stabilität des  $Ca^{2+}$ -Sensors in entzündlichen EAE Läsionen.

## 6.2.2 Technische Aspekte der Wirkstoffapplikation in EAE

Für die vorliegenden Untersuchungen ist es entscheidend, pharmakologische Wirkstoffe zuverlässig und reproduzierbar an ihrer Zielstruktur im Rückenmark zu applizieren. In Experimenten mit gleichzeitig erfolgreicher lichtmikroskopischer Betrachtung der Zielstrukturen können die eingesetzten Pharmaka in Abhängigkeit von ihrer Lösbarkeit und ihren optischen Eigenschaften zur Absorption und Streuung im Lichtweg führen. Lichtsensitive Substanzen (z.B. Nifedipin) können durch Lichtexposition deaktiviert werden. Diese Eigenschaften wurden durch regelmäßiges Austauschen der Bad/Immersionlösung und wiederholte Waschschriffe berücksichtigt.

Für die *in-vivo* Mikroskopie im Rückenmark erfolgte jeweils unter Anästhesie eine Laminektomie über zwei Wirbelsegmente, die Öffnung der Dura mater sowie die Modellierung einer künstlichen Wanne aus Agarose, um die Bad/Immersionlösung zu fassen (Misgeld, Nikic, and Kerschensteiner 2007; Williams et al. 2014). Anhand von Positiv-Kontrollen

konnte in der vorliegenden Arbeit für einzelne Wirkstoffe exemplarisch gezeigt werden, dass die oberflächlich gelegenen Axone im Rückenmark nach Entfernung der Dura erreicht werden.

So führt 1) die Applikation von NO-Donatoren zu einem raschen Anstieg der axonalen  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  und in der Folge zu einer Degeneration der Axone. 2) Mittels Bepridil lässt sich dieser Effekt nahezu vollständig blocken. 3) Ebenso führt die Applikation von Glutamat an den Somata und Dendriten einzelner Neurone im Rückenmark zu einem raschen Anstieg der axonalen  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

Aussagen über die Gewebegängigkeit anderer Wirkstoffe lassen sich begrenzt aus diesen Experimenten ableiten, insbesondere zu welchem Grad diese in das Myelon diffundieren und welcher Konzentrationsgradient sich zwischen Bad-Lösung und Gewebe einstellt. Die Wirkstoffe müssen dabei einerseits die Pia mater überschreiten und andererseits durch das dichte Rückenmarks-Parenchym diffundieren, wo sie potentiell enzymatischen Abbaumechanismen und Proteinbindungen unterliegen. Chemische Eigenschaften, wie die Fettlöslichkeit beeinflussen die Diffusion dabei entscheidend (Sendelbeck and Urquhart 1985).

Bei der Applikation von Neuromodulatoren wie Glutamat ist in tieferen Regionen und insbesondere in der grauen Substanz ein rascher Abbau durch Glutamatdehydrogenase wahrscheinlich. So konnte eine vergleichbare Studie von Brumley und Kollegen (Brumley et al. 2007) zeigen, dass nach Applikation von 5-HT auf dem dorsalen Rückenmark ein steiler dorso-ventraler Konzentrationsgradient entsteht und nur ein verhältnismäßig kleiner Anteil der Ursprungskonzentration in tief gelegenen Regionen nachweisbar ist.

In den vorliegenden *in-vivo* Experimenten wurden, bedingt durch die limitierte Eindringtiefe der 2-Photonen Mikroskopie, ausschließlich Axone betrachtet, die innerhalb der oberen 50µm des Rückenmarks liegen. Bei diesen Experimenten spielen die beschriebenen Konzentrationsgradienten also nur eine geringe Rolle.

Diese kommen insbesondere dann zum tragen, wenn im Anschluss an die *in-vivo* Experimente eine Analyse des fixierten Gewebes erfolgt und tiefer gelegene Regionen betrachtet werden. Die Entstehung der Konzentrationsgradienten ist damit ein möglicher Nachteil dieser Methode gegenüber anderen Applikationsformen.

Die tatsächliche Konzentration der einzelnen Wirkstoffe im Hirngewebe wurde für die vorliegenden Untersuchungen nicht bestimmt. Basierend auf unseren eigenen Erfahrungen und publizierten Daten anderer Gruppen müssen aufgrund der physiologischen Abbaumechanismen *in-vivo* gegenüber *in-vitro* Experimenten etwa 100-1000-fach höhere Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffes eingesetzt werden, um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen (Akay, Fouad, and Pearson 2008).

Die angewandte offene Applikationsform birgt den Nachteil, dass die Tiere während der

Wirkstoffapplikation in Narkose liegen und die Dauer des Experiments typischerweise auf 4-6 h Stunden begrenzt ist. Es wird folglich nur ein kurzer Ausschnitt des entzündlichen Prozesses in einer EAE-Läsion betrachtet. Für eine länger andauernde Wirkstoffapplikation von Bepridil können Minipumpen eingesetzt werden, die über mehrere Tage den Wirkstoff kontinuierlich intrathekal abgeben (Abbildung 18)(Theeuwes and Yum 1976; Sendelbeck and Urquhart 1985).

Hierbei sind jedoch drei wichtige Einschränkungen zu berücksichtigen: (1) aufgrund der kontinuierlichen Liquorzirkulation lässt sich das chronische Konzentrationsgleichgewicht im Rückenmarks-Parenchym nur eingeschränkt kalkulieren. (2) Durch die Applikation des subduralen Katheters ist eine interindividuell unterschiedliche traumatische Gewebeschädigung möglich und muss entsprechend berücksichtigt werden. (3) Durch die technischen Eigenschaften der Pumpen sind nur begrenzte Therapiezeiträume möglich.

### 6.2.3 Stärken und Limitationen des EAE-Tiermodells

In der vorliegenden Untersuchung betrachten wir in erster Linie Mechanismen der akuten, entzündlich medierte Axondegeneration. Hierfür ist die akute EAE ein geeignetes Modell, da die Tiere bereits nach 10-14 Tagen eine schnell progrediente, von kaudal aufsteigende Paralyse entwickeln.

Histopathologisch kommt es korrespondierend im ZNS zu einer fokalen Infiltration von Leukozyten sowie zu einer Aktivierung mononukleärer Zellen. Innerhalb dieser entzündlichen Läsionen kommt es in der Folge neben einer Demyelinisierung zu einem ausgeprägten Axonverlust durch FAD, mit geschwollenen und fragmentierten Axonen. Damit bildet das Modell einen akuten klinischen Verlauf ab, wie er beispielsweise bei der ADEM oder der akut verlaufenden Multiple Sklerose (AMS) beobachtet wird.

Bei Patienten mit schubförmig verlaufender Multipler Sklerose steht während der einzelnen Schübe die demyelinisierende Komponente gegenüber dem akuten Axonverlust im Vordergrund. Dies erklärt die häufig gute Rückbildung der Schubsymptomatik durch Remyelinisierung.

Im chronischen Verlauf und überwiegend unabhängig von der Anzahl der Schübe (Cree 2017) besteht eine kontinuierliche Behinderungsprogression, die mit einem Axonverlust und einer Atrophie des Hirnparenchyms einhergeht (Steenwijk et al. 2016).

Folglich spielen bei der MS neben den betrachteten Mechanismen der akuten Axondegeneration auch Aspekte der chronischen Axonschädigung durch andauernde Demyelinisierung, diffuse Entzündung und mitochondriale Schäden eine Rolle, welche in dem untersuchten Tiermodell nicht vollständig abgebildet werden.

Neben dem unterschiedlichen zeitlichen Verlauf, bestehen auch für die Ausprägung der Immunantwort wichtige Unterschiede. So wird einerseits die EAE in Tieren induziert, die

typischerweise in Inzuchtstämmen gehalten werden und damit einen gemeinsamen genetischen Hintergrund teilen, während die Multiple Sklerose bei Menschen mit unterschiedlichen genetischen Varianten auftritt und durch diese beeinflusst wird (Tizaoui 2017).

Desweiteren bestehen wichtige Unterschiede zwischen dem menschlichen und dem murinen Immunsystem (Lublin et al. 1993; Mestas and Hughes 2004). Während humanes Blut reich an Neutrophilen ist (50–70% Neutrophile, 30–50% Lymphozyten), weisen Mäuse ein Lymphozyten-dominiertes Blutbild auf (75–90% Lymphozyten, 10–25% Neutrophile). Zusätzlich ist die murine EAE ein primär durch CD4<sup>+</sup> (Th1<sup>+</sup> und Th17<sup>+</sup>) T-Zellen vermitteltes Krankheitsmodell (Friese et al. 2006), dagegen sind in der MS zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend beteiligt (Goverman, Perchellet, and Huseby 2005).

Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der Translation von Therapien aus dem Tiermodell in humane Studien wieder. So wurde im Tiermodell beobachtet, dass neutralisierende IFN-gamma AK zu einem schwereren Verlauf der EAE führen (Lublin et al. 1993). In humanen Studien an MS-Patienten führte eine Behandlung mit IFN-gamma dagegen zu einer Zunahme der Krankheitsaktivität (Panitch et al. 2011). Andererseits liess sich die protektive Wirkung einer Blockade der VLA-4 (alpha4beta1 integrin)-VCAM-1-Interaktion (Yednock et al. 1992) auch in humanen Studien reproduzieren (Miller et al. 2003). Insbesondere bezüglich histologischer Parameter bestehen innerhalb der entzündlichen Läsionen deutliche Übereinstimmungen zwischen EAE und MS bezüglich der fokalen Infiltration von Immunzellen und den Stadien der FAD (Nikić et al. 2011).

Basierend auf diesen Beobachtungen gehen wir davon aus, dass sich mechanistische Grundlagen der entzündlichen Axondegeneration bei der MS gut anhand der EAE untersuchen lassen.

### 6.3 Die Rolle von Ca<sup>2+</sup> in der FAD

In entzündlichen Läsionen kommt es bei der akuten EAE zu einem ausgeprägten Axonverlust. In der histopathologischen Betrachtung dieser Läsionen finden sich dabei unterschiedliche Stadien der Axondegeneration mit (1) morphologisch intakten, (2) geschwollen, und (3) fragmentieren Axonen. Anhand von *in-vivo* Untersuchungen in Mauslinien mit einzelnen genetisch markierten Axonen im Rückenmark konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass diese Stadien der fokalen Axondegeneration (FAD) in entzündlichen Läsionen sequentiell und unabhängig vom Myelinisierungsstatus des Axons erfolgen.

Bemerkenswerterweise ist das erste Stadium der Axonschwellung in einem Teil der Axone reversibel und eröffnet so die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention (Nikić et al. 2011). Minh Schumacher konnte zeigen, dass es bei der FAD bereits früh zu einem Anstieg der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kommt und Axone mit hoher  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  häufiger anschwellen und fragmentieren. Diese Ergebnisse stimmen gut mit vorangegangenen Befunden über-

ein, die eine entscheidende Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  im Prozess der Axondegeneration in verschiedenen Modellen zeigen (Coleman 2005; Stirling and Stys 2010) überein.

Ein entscheidend neuer Aspekt ist dabei die Beobachtung, dass Axone in der Lage sind, die erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  wieder zu normalisieren. Damit steht  $\text{Ca}^{2+}$  gewissermaßen am Scheideweg zwischen irreversibler Degeneration und Erholung des Axons. Axone mit erhöhter  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  befinden sich für einen bestimmten Zeitraum in einem metastabilen Zustand, der Gelegenheit für eine therapeutische Intervention gibt, mit dem Ziel, die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  zu normalisieren und damit eine irreversible Degeneration des Axons zu verhindern.

In einer parallel durchgeführten *in-vivo* Untersuchung in einem Modell der traumatischen Axonschädigung im Rückenmark konnte Phil Williams ebenfalls zeigen, dass Axone mit hoher  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  mit größerer Wahrscheinlichkeit fragmentieren, während niedrigere  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  einen protektiven Effekt haben. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx von extrazellulär erfolgt, indem der Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  durch Komplexierung mittels EGTA effektiv verhindert werden konnte. Dabei verhinderte die Depletion von  $\text{Ca}^{2+}$  im Extrazellulärraum auch ein Anschwellen und Fragmentieren der Axone (Williams et al. 2014).

#### 6.4 Quellen des axonalen $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms

Während eine entscheidende Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  in Prozessen der Axondegeneration sowohl in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als auch durch die Befunde anderer Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde (William et al 2014, Vargas et al 2015) sind die zugrundeliegenden Quellen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms sowie die Mechanismen desselben weiter nur unvollständig verstanden.

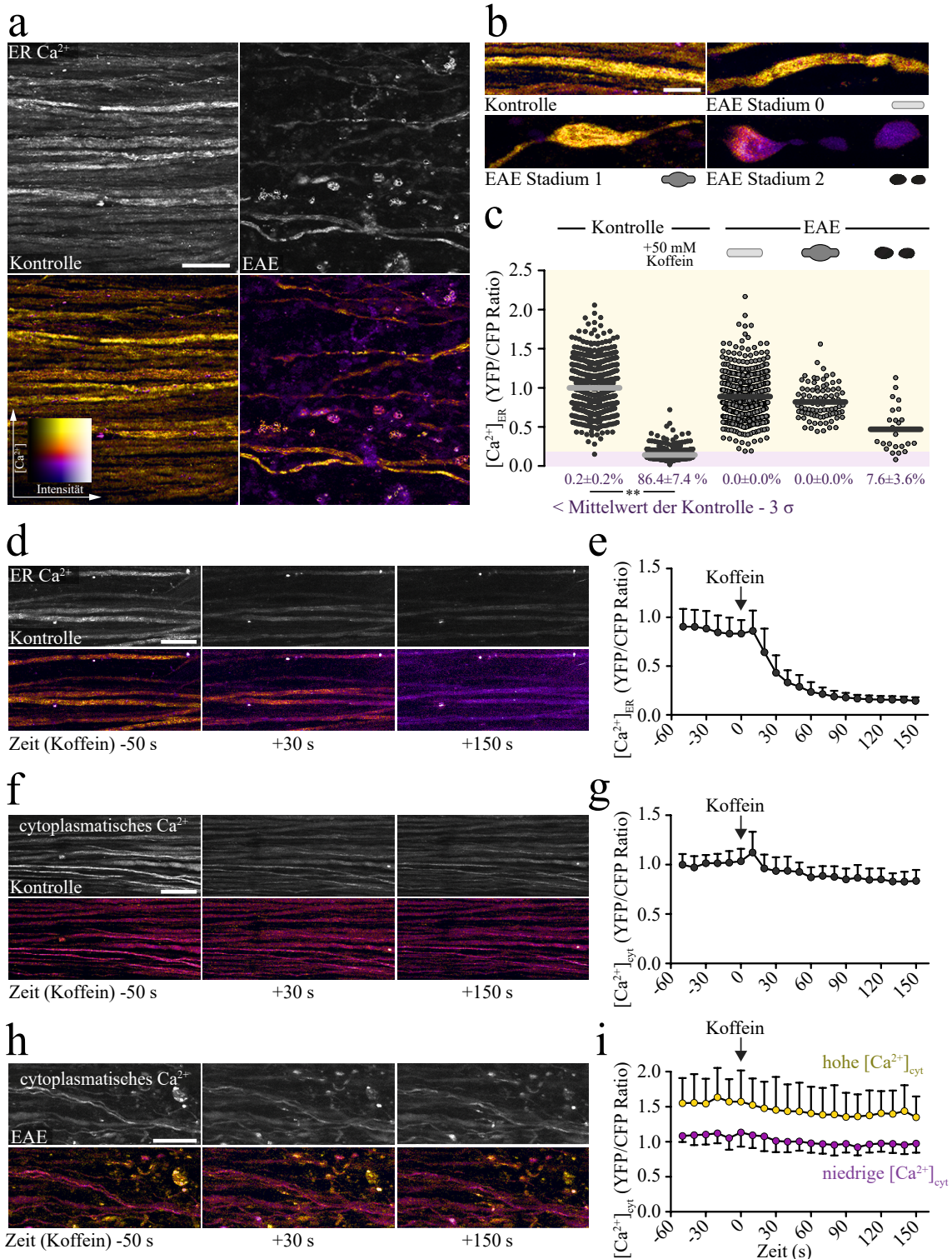
Dabei bestehen Hinweise auf eine Axonschädigung durch Mediatoren, welche aus Makrophagen und aktivierter Mikroglia freigesetzt werden (Haider et al. 2011; Zeis et al. 2009; Nikić et al. 2011) und direkt die Funktion von Ionenkanälen oder der Zellmembran beeinträchtigen. Andererseits könnten diese, gemeinsam mit einer stattgehabten Demyelinisierung und einem verstärkten, durch Glutamat mediierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu einer Schädigung von Mitochondrien mit resultierender virtueller Hypoxie und Depolarisation führen (Friese et al, 2014). In der Folge würde eine Fehlfunktion und Umverteilung von Ionenkanälen zu einem weiteren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führen (Peter K. Stys and Waxman 2005; Friese, Schattling, and Fugger 2014).

Dabei sind als Quellen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch Ionenkanäle sowohl der Extrazellulärraum als auch eine zusätzliche Freisetzung aus Inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-kontrollierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern wie dem ER (Stirling et al. 2014) und den Mitochondrien (Forte et al. 2007) beschrieben. Die erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  führt in der Folge zur Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Enzym-Komplexen (Phospholipasen, Calpain), die durch Um- und Ab-



bauvorgänge die funktionelle und strukturelle Schädigung des Axons vermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Quellen des axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in der FAD in entzündlichen EAE-Läsionen im lumbalen Rückenmark untersucht. Durch *in-vivo* Farbstoffe, welche mononukleäre Zellen darstellen, konnten entzündliche Läsionen identifiziert werden. Innerhalb dieser Läsionen wurden einzelne Axone über einen Zeitraum von 4 Stunden beobachtet und hierbei Veränderungen des FAD-Stadiums und der axonalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration evaluiert. So etablierte ich Kontrollparameter für die Raten der FAD-Stadien-Übergänge und der Übergänge zwischen hoher und niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kon-



**Abbildung 17: ER-Ca<sup>2+</sup> in EAE** a) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild (oben: Graustufen, unten: farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) des Rückenmarks einer gesunden Kontroll-Thy1-TwitchER Maus (links) und zum Zeitpunkt der akuten EAE (rechts) b) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild (farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) in verschiedenen Stadium der FAD. c) Axonale  $[Ca^{2+}]_{ER}$  dargestellt als YFP/CFP Ratio in gesunden Kontrolltieren, nach Koffeinapplikation, in EAE in Stadium 0, 1, 2 Axonen (von rechts nach links). d) Sequentielle *in vivo* multiphotonen Projektionsbilder (farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) einer gesunden Thy1-TwitchER Maus nach unter Applikation von Koffein. e) Axonale  $[Ca^{2+}]_{ER}$  dargestellt als YFP/CFP Ratio unter Applikation von Koffein. f) Sequentielle *in vivo* multiphotonen Projektionsbilder (farbkodiert für ratiometrische Darstellung der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) einer gesunden Thy1-TwitchER Maus nach unter Applikation von Koffein. g) Axonale  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  dargestellt als YFP/CFP Ratio unter Applikation von Koffein (Daten und Abbildung erstellt von Jonas Lehmitz und Alexander Scheiter).

zentration. Dabei konnte ich die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen (Nikic et al (FAD) und Minh Schumacher (FAD und Ca<sup>2+</sup>)) reproduzieren.

Basierend auf diesen Vordaten nahm ich in erster Linie pharmakologische Therapieexperimente bei EAE vor, analog zu den durch Phil Williams erfolgten Arbeiten im Modell der traumatischen Rückenmarksschädigung (Williams et al. 2014). Durch Ca<sup>2+</sup>-Komplexierung mittels EGTA konnte ich zeigen, dass die Depletion des extrazellulären Ca<sup>2+</sup> über 4 Stunden zu einer Normalisierung der intra-axonalen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt. Diese Intervention verzögert das Fortschreiten der FAD und unterbricht den Fragmentationsprozess von Axonen.

Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass die axonale  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  nicht nur eine prädiktive Aussage über das Schicksal eines Axons in der FAD erlaubt, sondern auch mechanistisch zentrale Voraussetzung für den Ablauf der akut degenerativen Prozesse in der FAD sind. Die Modulation des axonalen Ca<sup>2+</sup> bietet einen therapeutischen Angriffspunkt. Desweiteren geben diese Daten Hinweis auf einen entscheidenden Anteil des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms aus dem Extrazellulärraum, da die Ca<sup>2+</sup>-Komplexierung mittels EGTA nur die extrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  reduziert und nicht intrazellulär wirkt (Takadera, Ohtsuka, and Aoki 2010.)

Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit nachfolgenden Untersuchungen meiner Kollegen Alexander Scheiter und Jonas Lehmitz. Diese untersuchten in Tieren mit genetisch im ER exprimierten Ca<sup>2+</sup>-Indikatoren die Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen im axoplasmatischen ER ( $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) in der EAE. Diese Studien zeigen, dass einerseits in frühen Stadien FAD keine signifikanten Veränderungen der ER-Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auftreten, während diese für die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  bereits früh, vor manifesten morphologischen Veränderungen nachweisbar ist. Ebenso war eine pharmakologische Depletion des ER-Ca<sup>2+</sup> nicht hinreichend, um eine FAD hervorzurufen (Abbildung 17, Jonas Lehmitz und Alexander Scheiter).



## 6.5 Mechanismen des axonalen $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms

In dem zweiten Teil der Arbeit untersuchte ich, welche Mechanismen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Axonen bei der EAE vermitteln. Dort kommt es in entzündlichen Läsionen möglicherweise durch mitochondriale Schädigung und Demyelinisierung zur Fehlfunktion sowie Umverteilung von Ionenkanälen (Friese, Schattling, and Fugger 2014).

In vorangegangenen Studien zu verschiedenen neurologischen Erkrankungen sowie in *in-vitro* Modellen der Axondegeneration (Fern, Matute, and Stys 2014) wurden diese Veränderungen untersucht und eine Reihe von möglichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintrittswegen vorgeschlagen, beispielsweise spannungsabhängige Ionen-Kanäle (Knoferle et al. 2010; Ouardouz et al. 2003; Agrawal, Nashmi, and Fehlings 2000; Brand-Schieber and Werner 2004),  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) (P. K. Stys, Waxman, and Ransom 1992; Tomes and Agrawal 2002; Agrawal and Fehlings 1996), pH-sensitive Ionenkanäle (Friese et al. 2007) und Glutamatrezeptoren (Ouardouz, Coderre, Basak, et al. 2009; Ouardouz, Coderre, Zamponi, et al. 2009).

Um den Stellenwert dieser Mechanismen in der EAE *in-vivo* einzuordnen, führte ich eine Serie von Pilot-Experimenten durch. In diesen Versuchen testete ich, welche potentiellen entzündlichen Schädigungsmechanismen *in-vivo* einen akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in Axone vermitteln.

### 6.5.1 Glutamat

Glutamat, als wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter führt vor allem durch Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren zu einem Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Zellen und bestimmt in Abhängigkeit von Konzentration und synaptischer gegenüber extra-synaptischer Rezeptoraktivierung, ob zellerhaltende oder schädliche Zellprogramme aktiviert werden (Hardingham and Bading 2010).

Für eine Rolle von Glutamat in der MS spricht, dass sich in Gehirn und Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose erhöhte Konzentrationen dieses Neurotransmitters nachweisen lassen (Sarchielli et al. 2003; Azevedo et al. 2014), die von aktivierten mononukleären Zellen oder geschädigten Neuronen sezerniert werden (Piani et al. 1991). Entsprechend wurde für die Inhibition von AMPA- und NMDA-Rezeptoren ein protektiver Effekt in EAE gezeigt (Basso et al. 2008; Wallström et al. 1996; Smith et al. 2000; Sulkowski et al. 2014; Hollinger et al. 2016; Siffrin et al. 2010). Siffrin und Kollegen konnten durch Blockade von NMDA-Rezeptoren den Th17-medierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in Axonen hemmen (Siffrin et al. 2010).

In unseren Versuchen konnten wir durch direkte Exposition gegenüber hoch konzentriertem Glutamat weder Veränderungen der axonalen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  noch der Morphologie von

Axonon im Rückenmark auslösen. Um auszuschließen, dass EAE-spezifische Veränderungen wie Demyelinisierung oder Rezeptorverteilung notwendige Vorbedingung für eine glutamatmedierte Schädigung darstellen, wiederholten wir die Experimente in der akuten EAE und konnten auch hier keine Axonschädigung nachweisen.

Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse wäre ein unzureichender Übertritt des Glutamats in das Hirnparenchym bzw. eine ausreichend schnelle Entfernung des Glutamats durch Enzyme und Wiederaufnahmeprozesse.

Allerdings führt die Glutamatexposition in tiefer im Rückenmark liegenden Neuronen und deren Dendriten zu einem rapiden Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und es kommt rasch zur Fragmentation von Dendriten. Diese Befunde dienen damit als interne Kontrolle und belegen, dass in unseren Experimenten eine ausreichende Konzentration an der Zielstruktur vorhanden war, um Glutamatrezeptoren zu aktivieren.

In Zusammenschau der Befunde hat die Applikation von Glutamat auf neuronale Zellkörper und deren Dendriten direkte Effekte auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , während an Axonen kein akuter Effekt beobachtet wird. Möglicherweise ist dies auf unterschiedliche Rezeptorexpressionsmuster an Soma und Axon zurückzuführen. So wurde an Axonen in erster Linie eine modulatorische Wirkung auf die Depolarisationsschwelle und das Aktionspotential beschrieben (Sasaki et al. 2011). Diese beruht auf sogenannten Nanokomplexen, die entlang der Internodien begrenzt sind und dort – Glutamat-abhängig – die intra-axonalen  $\text{Ca}^{2+}$  Speicher kontrollieren (Stirling and Stys 2010). Jonas Lehmitz und Aleksander Scheiter konnten dabei zeigen, dass eine Depletion dieser intrazellulären Speicher im axoplasmatischen Retikulum nicht genügt, um die axonale  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  auf pathologisch wirksame Konzentrationen zu heben (Abbildung 17).

Grundsätzlich kann damit jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Effekte einer erhöhten Glutamatkonzentration im Extrazellulärraum aufgrund von ausgeprägten  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer-Mechanismen und Rezeptorinaktivierung erst im chronischen Verlauf beispielsweise durch Schädigung von Oligodendrozyten (Werner et al. 2000) und gemeinsam mit anderen Stressoren zu einer vermehrten Schädigung von Axonen führen, während eine akute Axonschädigung durch Regulationsvorgänge verhindert werden kann.

Basierend auf der gezeigten neurotoxischen Wirkung hoher Glutamatkonzentrationen an Neuronen und deren Dendriten ist möglicherweise der Einsatz von Glutamat-Antagonisten günstig, um Neurone in der grauen Substanz zu schützen und den Verlust von Dendriten und Synapsen zu verhindern.

Des Weiteren wird es in Zukunft wichtig sein, zu zeigen, ob sich Effekte einer Inhibition von Glutamatrezeptoren auch auf klinische Studien übertragen lassen und inwiefern diese Effekte spezifisch neuroprotektiver Natur sind, bzw. welchen Anteil daran eine reduzierte Infiltration mononukleärer Zellen hat (Basso et al. 2008). Bei MS-Patienten konnte eine Phase II Studie zur Wirksamkeit von Riluzol, einem Inhibitor der Glutamatfreisetzung

an Nervenendigungen, und einem NMDA-Rezeptor-Modulator (Peluffo et al. 1997) bei früher MS keinen signifikanten Effekt auf die Hirnatrophie nachweisen (Waubant et al. 2014). Eine weitere Phase II Studie zur Behandlung der progredienten MS läuft aktuell ("MS-SMART: Multiple Sclerosis-Secondary Progressive Multi-Arm Randomisation Trial - ClinicalTrials.gov" n.d.).

### 6.5.2 pH-sensitive Ionenkanäle

In entzündlichen Läsionen kommt es durch metabolische Anpassungsvorgänge in Immunzellen und hypoxischem Gewebe zur Ausbildung eines sauren Milieus (Frieese et al. 2007; Vergo et al. 2011). Die in der Folge erhöhte Protonenkonzentration stellt somit einen weiteren möglichen Schädigungsmechanismus an Axonen dar, in dessen Rahmen Säure-sensitive Ionenkanäle (ASICs) aktiviert werden. Einer dieser Rezeptoren (ASIC1a) wird auf Axonen exprimiert und ist neben erniedrigten pH-Werten auch durch Arachidonsäure, Lactat und verminderte extrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  aktivierbar. ASIC1a vermittelt den Eintritt von Natrium-, wie auch  $Ca^{2+}$ -Ionen (Yermolaieva et al. 2004). In *in-vitro*- und EAE-Studien wurde für die pharmakologische Blockade dieses Rezeptors sowie in Asic1-KO Tieren ein protektiver Effekt auf Axone im ZNS beobachtet (Frieese et al. 2007; Vergo et al. 2011).

Analog zu den vorangegangenen Experimenten mit erhöhter Glutamatkonzentration konnten in der vorliegenden Arbeit durch eine Behandlung von Rückenmarksaxonen bei gesunden und EAE-Tieren mit stark gepuffertem künstlichen Liquor bei einem pH-Wert von 6,5 keine schädigenden Effekte auf Morphologie und  $Ca^{2+}$ -Konzentration der oberflächlichen Axone nachgewiesen werden.

Dabei ist zu beachten, dass ausgeprägte Puffermechanismen im Hirnparenchym *in-vivo* möglicherweise eine ausreichende Absenkung des pH-Werts im Zielbereich verhindern. Des Weiteren kann es grundsätzlich durch pH-Werte  $<6,8$  zu einem (nicht  $Ca^{2+}$ -abhängigen) Abfall der FRET-Ratio kommen, sodass ein Effekt möglicherweise nicht detektiert wird. Wir kreuzten daher CerTNL-15-Tiere mit Asic1-KO-Tieren. Im Falle einer entscheidenden Rolle des Asic1-Kanals für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom bei EAE wäre eine reduzierte Axondegeneration in diesen Tieren zu erwarten. Nach Quantifizierung des Anteils von  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -hohen Axonen sowie der Verteilung der morphologischen FAD-Stadien war auch in diesen Experimenten bei der akuten EAE (Onset +2-+3) kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar.

Diese Ergebnisse sind grundsätzlich mit den vorangegangenen Studien (Frieese et al. 2007) vereinbar, da sich auch hier erst im späteren Verlauf der EAE ein signifikant günstigerer Verlauf manifestierte. Einen eindeutigen akuten Effekt auf die axonale  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  und die Axonmorphologie durch Absenken des extrazellulären pH-Wertes konnten wir in unseren Experimenten jedoch nicht nachweisen.

In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob es beispielsweise in chronisch progredienten EAE-Modellen durch erniedrigte pH-Werte zu einem erhöhten Energiebedarf der Axone kommt und ob sich langfristig durch eine entsprechende Hemmung von ASIC-Kanälen protektive Effekte erzielen lassen.

Bei MS-Patienten konnte in einer klinischen Phase II Studie zur Wirksamkeit von Amilorid bei Neuritis N. optici kein signifikanter neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden (McKee et al. 2017). Eine weitere Phase II Studie zu Amilorid bei Patienten mit progredienter MS läuft aktuell ("MS-SMART: Multiple Sclerosis-Secondary Progressive Multi-Arm Randomisation Trial- ClinicalTrials.gov" n.d.).

### 1.1.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Vorangegangene Studien zu Mechanismen des axonalen Schadens bei EAE zeigen, dass in entzündlichen Läsionen deutlich erhöhte Konzentrationen von ROS/RNS vorkommen und eine pharmakologische Therapie mit Radikalfängern sich günstig auf die FAD auswirkt (Nikić et al. 2011). Weitere Studien zur MS unterstreichen diese Befunde. So treten erhöhte Konzentrationen oxidiertes Phospholipide in axonalen Schwellungen und Bereichen mit gestörtem axonalen Transport auf und sind mit dem Maß der Inflammation korreliert (Haider et al. 2011). Diese Daten lassen auf eine bedeutende Rolle oxidativer Schädigungen bei der axonalen Degeneration im Rahmen der MS schließen.

Die Quelle der ROS/RNS, wie Superoxide, Hydroxyradikale,  $H_2O_2$  und NO in entzündlichen Läsionen sind in erster Linie aktivierte mononukleäre Zellen, die diese Moleküle im Rahmen eines „oxidative burst“ freisetzen, um Pathogene zu eliminieren (van Horssen et al. 2011). In diesen Zellen kommt es durch ROS-produzierende Enzyme wie Myeloperoxidasen, Xanthinoxidasen und NADPH-Oxidasen zur Freisetzung großer Mengen von ROS. Diese ROS wie Superoxid ( $O_2^-$ ),  $OH^\cdot$ ,  $H_2O_2$  sind aufgrund unpaarer Elektronen besonders reaktive Moleküle und können schnell weitere Radikale generieren.

Die beiden häufigsten ROS sind Hydroxylradikale und Hydroperoxyl. Hydroxylradikale sind kleine, relativ kurzlebige und hochreaktive Moleküle. Diese entstehen typischerweise durch die Fenton-Reaktion, bei der  $Fe^{2+}$  mit  $H_2O_2$  reagiert, sowie in der Haber-Weiss Reaktion, bei der aus  $Fe^{3+}$  und Superoxid  $Fe^{2+}$  entsteht (Ayala, Muñoz, and Argüelles 2014). So können Superoxide mit NO reagieren, welches durch die NO-Synthase (NOS) erzeugt wird und so hochreaktives Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) bilden.

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Befunden, die bereits morphologische Veränderungen, ähnlich der FAD nach Applikation von  $H_2O_2$  und NO beschrieben (Nikić et al. 2011), konnte ich zeigen, dass die Applikation von  $H_2O_2$  und NO-Donatoren auf das Rückenmark rasch zu einem Anstieg der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  führt, gefolgt von axonaler Schwellung und Fragmentation. Diese Axonschädigung betrifft sowohl dicke ( $>1,5 \mu M$ ) als auch dünne ( $<1,5 \mu M$ ) Axone und spiegelt die Veränderung der FAD in EAE gut wie-

der. Sie stellt somit ein geeignetes Modell dar, um mögliche Axon-protective Wirkstoffe zu untersuchen.

In weiteren Experimenten konnte ich nachweisen, dass die Applikation des Ca<sup>2+</sup>-Kanal/NCX Blockers Bepridil *in-vivo* im Rückenmark die NO-mediierte Axon-Degeneration nahezu vollständig verhindert. NCX Proteine können in Abhängigkeit des elektrochemischen Gradienten von Na<sup>+</sup> über die Membran einen Ca<sup>2+</sup>-Eflux („*forward mode*“) oder Ca<sup>2+</sup>-Influx („*reverse mode*“) über die Membran vermitteln. Der „*forward-mode*“ stellt die typische physiologische Arbeitsweise des NCX dar. Im Rahmen von synaptischer-Übertragung sowie in pathologischen Gewebeeränderungen dominiert der *reverse-mode* (Khananashvili 2014).

Um eine entscheidende Rolle des „*NCX-reverse-mode*“ in NO-mediiertem Axonschädigung zu prüfen, setzte ich in einer weiteren Serie von Experimenten den selektiven NCX-reverse mode Inhibitor KB-R7943 ein und konnte auch damit eine NO-mediierte Axonschädigung deutlich reduzieren. Diese Befunde lassen die Hypothese als möglich erscheinen, dass es durch die Applikation von NO-Donatoren zu einer Depolarisation der Membran und in der Folge zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup> in das axonale Cytoplasma kommt.

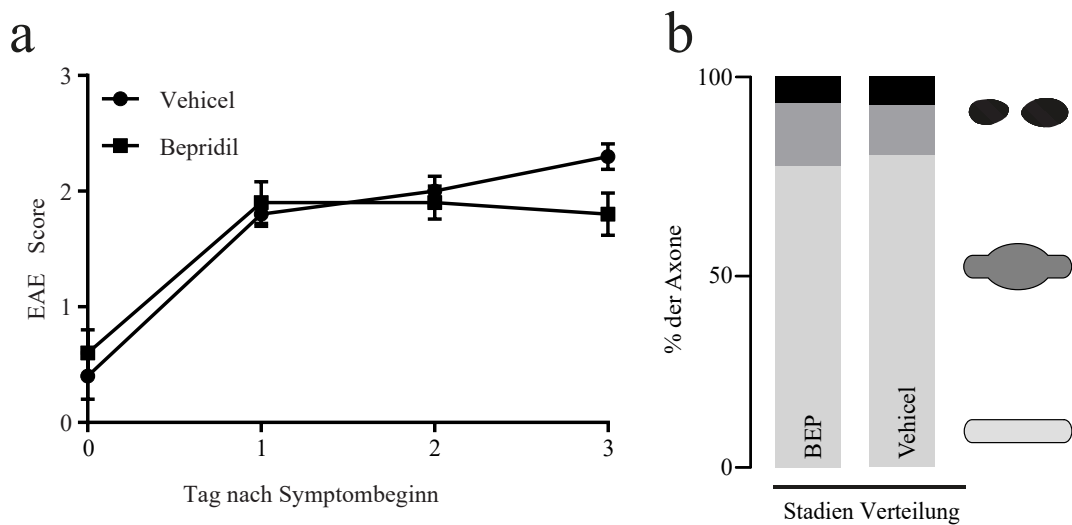
In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Kapoor und Kollegen zeigen, dass die Applikation von NO-Donatoren an Hinterwurzel-Axonon zu einem Leitungsblock führt. Diese wird durch Applikation von Na-Kanal- (Flecainid) und NCX Blockern (Bepridil) nahezu vollständig verhindert (Kapoor et al. 2003). Zusätzlich konnte durch *in-vitro* Untersuchungen an Astrozyten gezeigt werden, dass NO einen direkten Effekt auf den NCX ausübt und hierdurch einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom vermittelt (Kitao et al. 2010). Brand-Schieber et al. konnten in einem Modell mit akuter adoptive-transfer EAE in SJL/J-Tieren zeigen, dass eine subkutane Behandlung mit Bepridil von Beginn des Lymphozyten-Transfers an den EAE-Verlauf günstig beeinflusst.

Basierend auf diesen Befunden im „NO-Modell“ wurden in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit einer NCX-Inhibition an Axonen im Rückenmark bei EAE untersucht. Um immunmodulierende Effekte möglichst auszuschließen, wählten wir einen Ansatz, bei dem Bepridil an Tieren mit akuter EAE (onset+2/+3) direkt auf dem Rückenmark appliziert wurde und einzelne Axone über einen Zeitraum von 4 Stunden verfolgt werden konnten. Anhand dieser Daten konnten die Ca<sup>2+</sup>-Dynamiken und Stadienübergänge einzelner Axone über diesen Zeitraum verglichen werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontroll-Gruppe.

Parallel untersuchten mein Kollege Minh Schumacher und ich die intrathekale Applikation von Bepridil anhand osmotischer Minipumpen während der akuten EAE.

Die Auswertung der Axonstadien im fixierten Gewebe ergab ebenfalls keinen eindeutigen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Diese Befunde sprechen gegen einen hinrei-

chend protektiven Effekt von Bepridil in der FAD in EAE.



**Abbildung 18: Intrathekale Applikation von Bepridil versus Trägerlösung mittels osmotischer Minipumpen (ALZET®)** a) Klinischer EAE Score an Tag 0-3 nach Symptombeginn b) Verteilung der Axonstadien im fixierten Gewebe (perfundiert an Tag 3 nach Symptombeginn) (Bepridil n=7 Tiere, Vehicle n=6 Tiere, Experimente gemeinsam mit Minh Schumacher durchgeführt, die Auswertung im fixierten Gewebe erfolgte durch Minh Schumacher).

### 1.1.2 Mitochondrien und virtuelle Hypoxie

Verschiedene Studien deuten auf eine zentrale Rolle einer mitochondrialen Schädigung in Axonen bei der Progression der MS hin (D. J. Mahad et al. 2009; Witte et al. 2009). Dabei kommt es durch chronische Inflammation zu einem Funktionsdefizit und einer Transportstörung mit resultierendem Energie-Mangel in den Axonen (Witte et al. 2010). Entscheidende Funktion der Mitochondrien ist die Herstellung von ATP durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS).

Dabei fallen physiologischerweise ROS und NO an. Diese werden durch antioxidative Enzym-Systeme (SOD, Glutathion) neutralisiert (Witte et al. 2014). Sind diese Prozesse gestört oder überlastet, kommt es zu einer Akkumulation von ROS in den Mitochondrien. Aufgrund eines fehlenden Schutzes der mitochondrialen DNA (mtDNA) durch Histone entstehen zunehmend DNA-Mutationen (Wei et al. 1998).

Diese Mutationen führen zu einem progredienten Funktionsdefizit der Komplexe der Atmungskette. So ist die Aktivität des Komplex I der Atmungskette mit zunehmenden mtDNA Mutationen reduziert (Lu et al. 2000). Die Aktivität des Komplex IV der Atmungskette ist gesteigert (Witte et al. 2009; D. J. Mahad et al. 2009), möglicherweise kompensatorisch, um den elektrochemischen Gradienten über der Membran aufrechtzuerhalten (Witte et al. 2010). Es kommt hierdurch zu einem weiteren Anstieg der ROS Produktion in den Mitochondrien. Dieser selbstverstärkende Zyklus der mitochondrialen Schädigung ist in Tiermodellen durch Mutationen der mtDNA-Polymerase (Trifunovic et



al. 2004) reproduzierbar. Zusätzlich kommt es durch die Freisetzung von ROS/RNS aus Immunzellen zu einer Nitrierung mitochondrialer Proteine und damit zu einer zusätzlichen Schädigung der Mitochondrien (Qi et al. 2007). Auch im humanen Hirnparenchym finden sich sowohl in entzündlichen Läsionen (Lu et al. 2000), als auch in der normal erscheinenden weißen Substanz (NAGM) (Blokhin et al. 2008) von MS-Patienten Hinweise auf eine mitochondriale Schädigung (D. Mahad, Lassmann, and Turnbull 2008).

Durch den resultierenden ATP-Mangel bricht die Pumpleistung der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ein und es kommt zum Einstrom von Natrium sowie zur Depolarisation des Axons (Waxman 2006). Um den Natrium-Einstrom zu kompensieren, wird der „*reverse-mode*“ des NCX aktiviert. Dies führt zur Reduktion der Natriumkonzentration auf Kosten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Kornek et al. 2001). Die Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  in Axonen führt zur Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cystein-Proteasen, die zum Abbau des Zytoskeletts führen. Es kommt zur Schwellung bzw. Fragmentation des Axons (Kornek et al. 2001).

In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurden diese Mechanismen untersucht. So führt (1) bei EAE die virale Überexpression von SOD2 im N. opticus zu einer deutlichen Reduktion des neuronalen Zelltods bei unveränderter Immunzellinfiltration (Qi et al. 2007). Diese Ergebnisse werden gestützt durch (2) Untersuchungen in Cyclophilin D knock-out Tieren. Cyclophilin D ist ein Regulator der mitochondrialen transition pore (MPTP). Eine Öffnung der MPTP führt zur Depolarisation von Mitochondrien. Bei Cyclophilin D knock-out Tieren kommt es zu einem mildereren Verlauf der EAE und Neuronen aus diesen Tieren sind *in-vitro* resistenter gegenüber oxidativem Stress (Forte et al. 2007).

Neben einer direkten ROS/NO mediierten Schädigung von Mitochondrien kommt es bei EAE bereits früh zu einer Störung des axonalen Transports von Mitochondrien, welche in einer „Penumbra“ der entzündlichen Läsion in der Remissionsphase wieder reversibel ist. Bemerkenswerterweise lässt sich dieser Prozess einerseits durch NO-Donatoren in gesunden Tieren induzieren, andererseits führt die Applikation des NO-Scavengers cTPIO bei EAE zu einer Verbesserung des axonalen Mitochondrien-Transports (Sorbara et al. 2014).

### 1.1.3 Membranschädigung

Nachfolgende Untersuchungen von Jan Bewersdorf und Maarten Witte zeigen, dass es in entzündlichen EAE-Läsionen bereits in frühen Stadien der FAD zu Lecks in der Axonmembran (*Nanopores*) kommt, durch die kleine Farbstoffmoleküle in das Axoninnere gelangen. Möglicherweise stellen diese „Nanoporen“ damit eine entscheidende Eintrittsprorte für extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dar. Diese axonalen Membran-Lecks wurden erstmals in einem Modell der milden Hirnschädigung bei Katzen beschrieben. Eine plötzliche Erhöhung des Hirndrucks führte dabei zur intra-axonalen Akkumulation von Meerrettichpero-

xidase (HRP). Bemerkenswerterweise kommt es in eben diesen Axonen im Zeitverlauf zu fokalen Schwellungen und zur Fragmentation (Povlishock et al. 1983). Mein Kollege Philip Williams beschrieb, dass es in einem murinen Modell der traumatischen Rückenmarksverletzung zu einem teils reversiblen Anstieg der axonalen  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kommt.

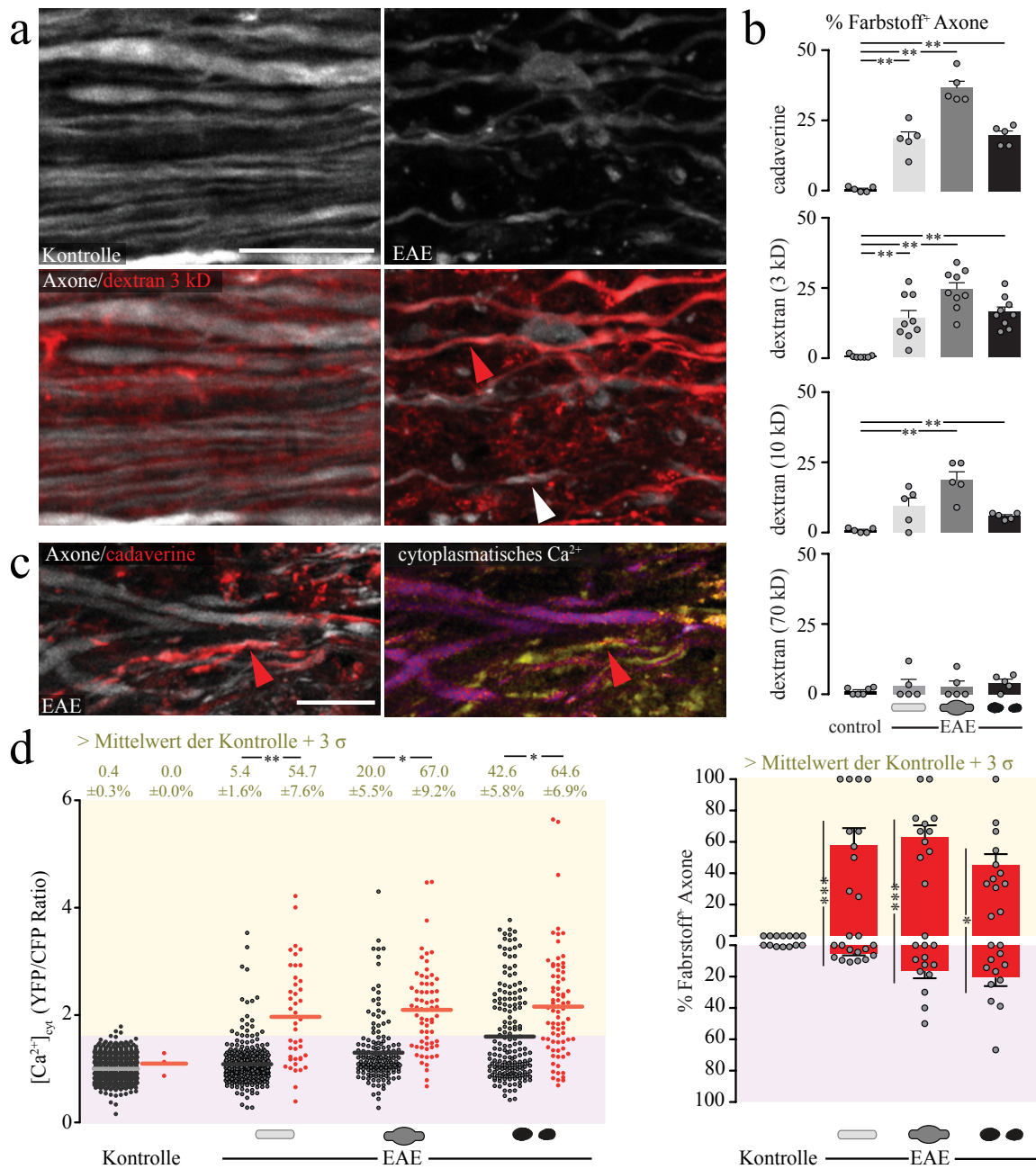
Gleichzeitig kommt es zur Aufnahme von Dextranmolekülen in die Axone durch Mechanoporen. Diese Mechanoporen tragen maßgeblich zum  $Ca^{2+}$ -Eintritt in Axone bei und die Dauer bis zum Wiederversiegeln dieser Membran-Poren beeinflusst über die Regulation  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  das Überleben der Axone (Williams et al. 2014). In analogen Farbstoff-Ausschluss-Experimenten konnten Jan Bewersdorf und Maarten Witte einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch axonale Membran-Lecks auch bei der akuten EAE nachweisen.

Dabei war die Aufnahme der Farbstoffmoleküle abhängig von deren Größe und dem Myelinisierungsstatus der Axone. Untersuchungen in Perforin-knock-out und Complement-knock-out Tieren zeigen, dass diese Mechanismen keinen direkten Effekt auf die Farbstoff-Aufnahme bei EAE haben. Diese Befunde werden gestützt durch aktuelle Berichte anderer Arbeitsgruppen, die mittels HRP-Ausschluss-Experimenten zeigen konnten, dass es zum Zeitpunkt der akuten EAE, wie auch in der prä-symptomatischen Phase zu Veränderungen der axonalen Membran kommt (Leung et al. 2017).

Welche Mechanismen der Entstehung von Nanoporen bei der EAE zugrunde liegen ist Gegenstand aktueller Studien. Es lässt sich spekulieren, dass die Infiltration von Leukozyten und die Aktivierung von Mikrogliazellen Veränderungen der Zell-Membran hervorrufen, die dann weitere biologische Prozesse der Axondegeneration anstoßen. Diese Überlegungen stützen sich auf zum Teil alte Studien (Hirata and Axelrod 1980; Farooqui et al. 2004), die zeigen, dass es durch die damit verbundene Ausschüttung von Neurotransmittern und Cytokinen zur Methylierung von Phospholipiden und Aktivierung von Phospholipasen kommt. Diese führen zum  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle sowie zur Freisetzung von Arachidonsäure.

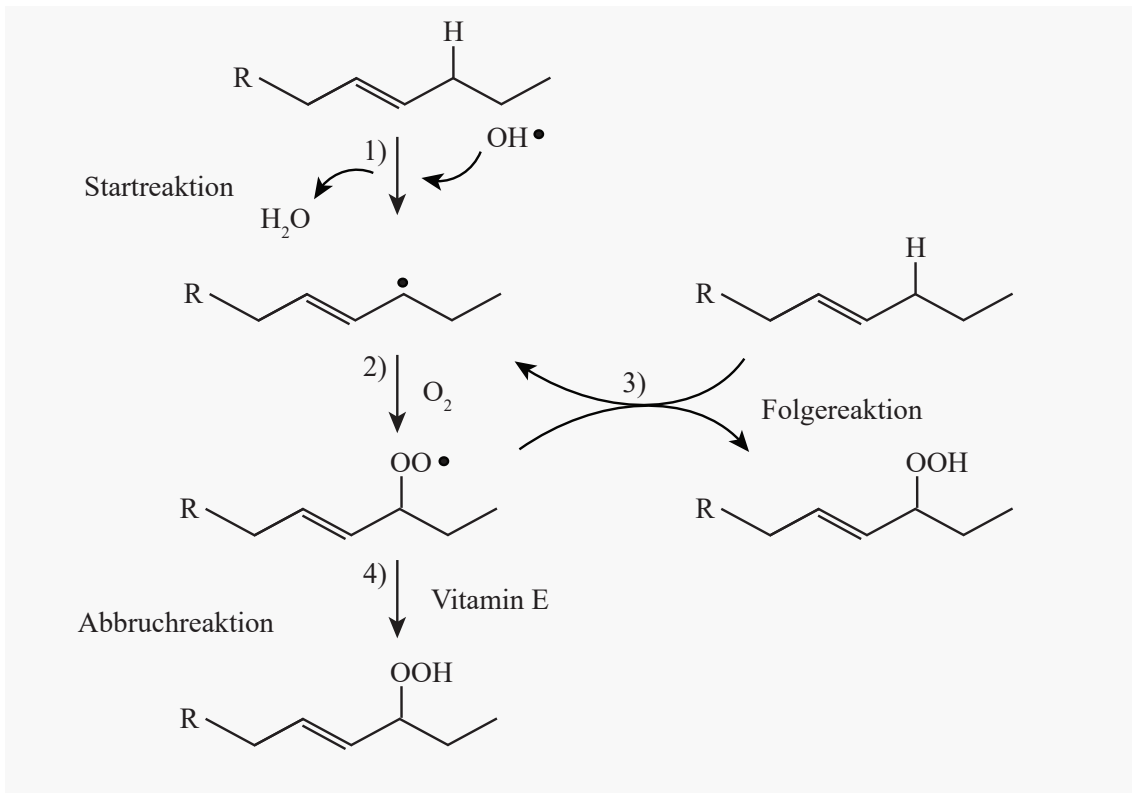
Arachidonsäure ist die Vorläufersubstanz von Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen. Cyclooxygenasen katalysieren die Bildung von Prostaglandinen, Lipoxygenasen die von Hydroxy- und Hydroxyperoxy-lipiden (Hirata and Axelrod 1980). Zusätzlich kommt es im Rahmen der enzymatischen Reaktionen der Prostaglandinsynthese zur Entstehung weiterer ROS und einem positiven Feedbackmechanismus (Halliwell 2007; Zaleska and Wilson 1989; Farooqui, Ong, and Horrocks 2004). Korrespondierend finden sich auch im Liquor von MS Patienten erhöhte Prostaglandin-Spiegel als Ausdruck von oxidativem Stress (Greco et al. 1999).

In der Lipidoxidation werden 3 Phasen unterschieden: Initiation, Propagation und Termination (Ayala, Muñoz, and Argüelles 2014). Kommt es zur Initiation durch ein Prooxidans, beispielsweise einem Hydroxylradikal, so entsteht eine Kettenreaktion, die durch Reaktion mit Sauerstoff zur Entstehung von Lipidradikalen führt (Propagation). Diese



**Abbildung 19: Nachweis von Nanoporen in EAE mittels Applikation von Farbstoffmolekülen** a) Konfokal-mikroskopisches Projektionsbild in fixiertem Gewebe (oben: Graustufen, unten: Fehlfarbandarstellung der Axonmorphologie (grau) und Dextran 3 kD (rot) einer gesunden Kontroll-Thy1-CerTNL15 Maus (links) und zum Zeitpunkt der akuten EAE (rechts). b) Anteil Farbstoff-positiver Axone nach Applikation inerte fluoreszenter Farbstoffe unterschiedlicher Molekülgröße in Kontrolltieren (links) und in Stadium 0, 1, 2 Axonen in EAE (rechts). c) *In vivo* multiphotonen Projektionsbild des Rückenmarks einer Thy1-CerTNL15-Maus zum Zeitpunkt der akuten EAE. Links: Fehlfarbandarstellung der Axonmorphologie (grau) und von Cadaverin (rot). Ratiometrische Darstellung der axonalen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>. Rote Pfeilspitzen: Axon mit Farbstoffaufnahme und hoher [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>. d) Links: [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> dargestellt als YFP/CFP Ratio in Farbstoff-negativen (schwarze Punkte) und Farbstoff-positiven (rote Punkte) Axonen in Kontrolltieren, Stadium 0, Stadium 1 und Stadium 2 Axonen in EAE-Tieren (von links nach rechts). Rechts: Anteil der Farbstoff-positiven Axone für [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>-hohe (oben) und [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>-niedrigen Axone in Kontrolltieren, Stadium 0, Stadium 1 und Stadium 2 Axonen in EAE-Tieren (von links nach rechts) (Daten und Abbildung erstellt von Maarten Witte und Jan Bewersdorf).

Phase setzt sich solange fort, bis ein Antioxidans wie Tocopherol ein Wasserstoff-Atom abgibt und die Reaktion damit beendet (Termination) (Ayala, Muñoz, and Argüelles 2014).



**Abbildung 20: Schema der Kettenreaktion der Lipidoxidation** (Basierend auf Ayala, Muñoz, and Argüelles 2014).

Basierend auf diesen Überlegungen ist es vorstellbar, dass es bei EAE zur Veränderung der Membranfluidität und in der Folge zu Lipidstrukturdefekten und der Entstehung von Nanoporen kommt, die den unkontrollierten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen erlauben (Hermann et al. 2014). Die Prävention solcher Nanoporen wären damit eine wichtige Zielstruktur neuer Therapiestrategien zur Behandlung der Multiplen Sklerose. Insbesondere die Inhibition und Reduktion der überschießenden Lipidoxidation wäre dabei ein vielversprechender Ansatz, um eine irreversible fokale Axondegeneration in MS-Patienten zu verhindern.

## Kapitel 7: Schlussfolgerung und Ausblick

In Zusammenschau der aktuellen Befunde bei EAE und MS bestehen fundierte Hinweise darauf, dass durch die autoimmune Inflammation freigesetzte reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und in der Folge durch (Per-)Oxidation von Phospholipiden Defekte in der Axon-Membran entstehen. Diese Membran-Lecks ermöglichen einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und spielen dabei eine zentrale Rolle bei der fokalen Axondegeneration.

Damit sind Therapien, die das ROS/RNS Gleichgewicht im Hirnparenchym wiederherstellen, eine attraktive Alternative zu den derzeit verfügbaren immunsuppressiven Therapiestrategien. Dabei sind grundsätzlich verschiedene Ansatzebenen denkbar. (1) So könnte auf der Ebene der Mitochondrien und des Metabolismus die Produktion von ROS/RNS und andere durch eine „virtuelle Hypoxie“ ausgelöste Prozesse gehemmt und dadurch die initial durch Neuroinflammation angestoßene Spirale unterbrochen werden.

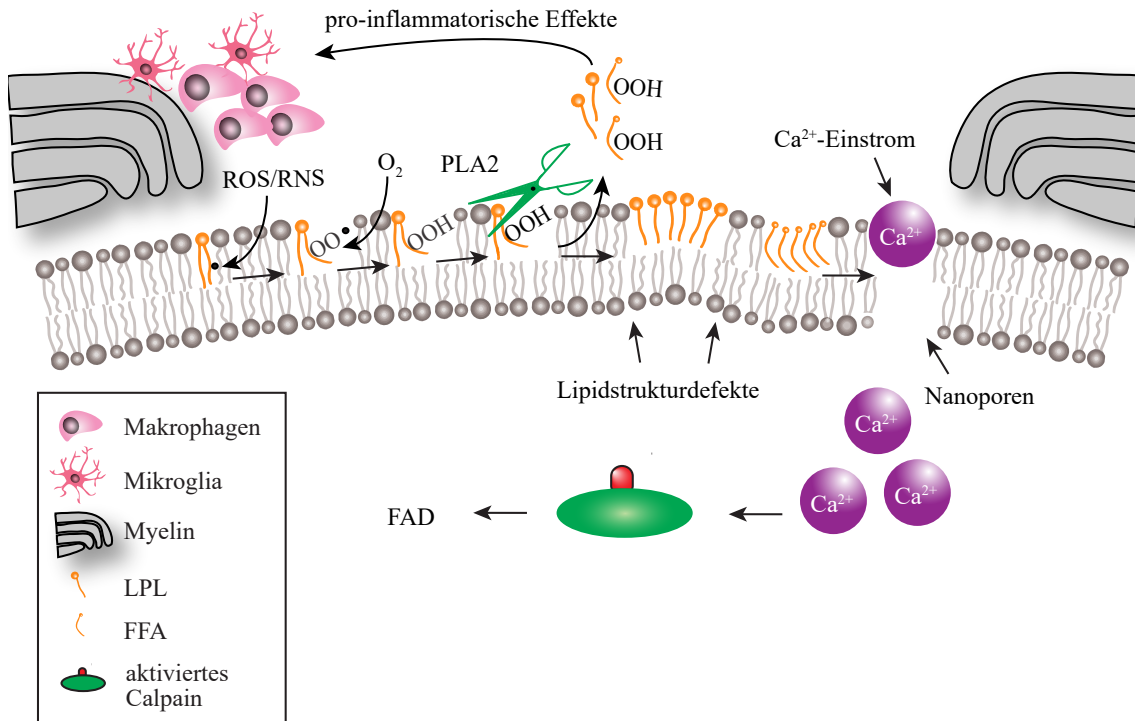
Hier setzten möglicherweise aktuelle Therapiestudien zu Biotin (MD1003) an. Biotin ist essentiell für die Synthese von Fettsäuren und den Energiemetabolismus. Die hochdosierte Gabe dieses Vitamins soll die „virtuelle Hypoxie“ in Neuronen durch eine gesteigerte Energieproduktion verhindern (Sedel et al. 2016; Birnbaum and Stulc 2017). Erste klinische Studien geben Hinweise auf eine anhaltende Verbesserung des EDSS als Maß der motorischen Defizite von MS Patienten, sodass bereits basierend auf der Phase II Studie (Tourbah et al. 2016) eine Zulassung in Frankreich erfolgte. Eine Phase III Studie in Europa und USA rekrutiert aktuell Patienten („Effect of MD1003 in Progressive Multiple Sclerosis (SPI2)- ClinicalTrials.gov“ n.d.). In einer weiteren Therapiestudie mit MitoQ werden basierend auf positiven Effekten (Mao et al. 2013) bei EAE direkt antioxidative Effekte an Mitochondrien untersucht. Hierzu wird aktuell eine Phase II Studie zur Behandlung der Fatigue bei MS Patienten durchgeführt („MitoQ for Fatigue in Multiple Sclerosis - ClinicalTrials.gov“ n.d.).

(2) Nrf2/ARE sind antioxidative Enzyme, die bei EAE und MS kompensatorisch verstärkt exprimiert werden (van Horssen et al. 2011). Unter der Annahme, dass eine weitere Überexpression anti-oxidative Effekte auf Neuronen ausübt, wurde bei mit dem NRF2 Induktor Sulforaphan behandelten Tieren nach LPS-Injektion eine reduzierte Mikroglia-Aktivierung beobachtet. Möglicherweise ist auch ein Teil der Effekte der Therapie mit Dimethylfumarat (Tecfidera) auf antioxidative Effekte über eine vermehrte Expression von Nrf2 zurückzuführen (Bomprezzi 2015; Kappos et al. 2012; van Horssen et al. 2011, Chen et al. 2014).

3) Um die Bedeutung von ROS/RNS für ein Auslösen der Axondegeneration bei EAE zu untersuchen, sind weitere tierexperimentelle Studien notwendig. Ein mögliches Design wäre die selektive Überexpression von antioxidativen Enzymen (beispielsweise SOD (Qi et al. 2007), Nrf2 (Shih et al. 2005), Glutathion Peroxidase 4, Gpx4 (Ran et al. 2006)



). Mittels Injektion viraler Vektoren in Hinterwurzelganglien (Kohro et al. 2015) oder Ventrikel (Watson et al. 2006) könnte so das antioxidative Potential einzelner Neuronen selektiv verbessert werden. Diese Neuronen sollten innerhalb entzündlicher Läsionen besser gegen FAD durch oxidativen Stress geschützt sein.



**Abbildung 21: Putativer Mechanismus der Axonschädigung in entzündlichen Läsionen:** Durch die Infiltration und Aktivierung von Phagozyten kommt es zur Freisetzung großer Mengen reaktiver Sauerstoff-/Stickstoffspezies (ROS/RNS). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*poly unsaturated fatty acids, PUFAs*) in der Axonmembran sind anfällig für Lipidoxidation. Peroxidierte PUFAs werden von der Phospholipase A<sub>2</sub> erkannt und aus der Lipidmembran „geschnitten“. Die Produkte (freie Fettsäure (FFAs) und Lysophospholipide(LPLs)) werden freigesetzt und führen zu einer Reihe von Effekten. Einerseits wirken diese pro-inflammatorisch und treiben die Entzündungsreaktion weiter an, andererseits führt der Einbau derselben in die Lipidmembran zu Defekten in der Mikroarchitektur der Axonmembran und schließlich zur Entstehung von Nanoporen, die den Einstrom von fluoreszent markierten Dextran-Molekülen und Ca<sup>2+</sup>-Ionen ermöglichen. Dieser unkontrollierte Calcium-Einstrom führt schließlich zur Aktivierung von Calpain und zur fokalen Axondegeneration.



## Kapitel 8: Abschließender Kommentar

Die Multiple Sklerose, eines der großen neurologischen Krankheitsbilder, bleibt – auch 150 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung durch Jean-Martin Charcot – in ihrem Kern rätselhaft.

Zwar haben die letzten Dekaden durch eine breite Förderung der MS-Forschung und einzelne herausragende Forscherpersönlichkeiten bedeutende Fortschritte im Verständnis der zugrundeliegenden neuroimmunologischen Prozesse erbracht. Auch verzeichnen wir mittlerweile eine breite Palette therapeutischer Optionen in der Behandlung des schubförmigen Verlaufs der MS – zuletzt ein erstes zugelassenes Präparat für die primär-progrediente MS. Und dennoch bedeutet die Diagnose MS für den Patienten weiterhin einen Einschnitt mit folgenschwerer Tragweite, bleibt doch der tatsächliche Verlauf der Erkrankung beim Einzelnen unvorhersagbar.

Bei einem Teil der Patienten kommt es zu einem schleichenden Voranschreiten der klinisch-neurologischen Funktionsstörung, dessen Ursprung wir weiterhin nur unvollständig verstehen, und dem wir noch weniger mit effektiven Therapien entgegentreten können.

Eingangs stellte ich die grundlegenden Konzepte zur Immunologie der MS als primär autoimmune Erkrankung des zentralen Nervensystems dar. Ich erörterte die kennzeichnenden pathologischen Eckpunkte und zeigte auf, weshalb die Mechanismen axonaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamiken als entscheidende Weiche des axonalen Schicksals einen attraktiven Ansatzpunkt für neuroprotektive Therapiestrategien darstellen.

Aus den berichteten experimentellen Untersuchungen folgerten wir, basierend auf den Vorarbeiten von Minh Schumacher, dass der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen primär aus dem Extrazellulärraum erfolgt. Wir prüften verschiedene Hypothesen zu Auslösern axonaler Schädigung in entzündlichen Läsionen und fanden, dass durch die Applikation von ROS/RNS – in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Nikic et al. 2011) – eine „FAD-ähnliche“ axonale Schädigung ausgelöst werden kann.

In diesem vereinfachten Modell der FAD verhinderte Bepridil und somit die pharmakologische Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers effektiv eine NO-medierte Axonschädigung. In den nachfolgenden Therapiestudien zur EAE ließ sich jedoch kein protektiver Effekt einer Behandlung von Axonen mit Bepridil nachweisen.

In Zusammenschau mit den nachfolgenden Arbeiten von Jan Bewersdorf und Maarten Witte könnte dieses Ergebnis dadurch erklärbar sein, dass der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei der immunvermittelten Axondegeneration in erster Linie durch Defekte in der Axonmembran - im Sinne von Nanoporen - erfolgt. Möglicherweise führen große Mengen freigesetzter ROS/RNS zu einer unkontrollierten Lipidoxidation und in der Folge zu „Brüchen“ der Axonmembran - experimentell durch die Aufnahme von Farbstoffmolekülen

nachweisbar – die einen unkontrollierten Übertritt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ermöglichen.

Diese neue Hypothese zu den Mechanismen axonaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamiken bedarf weiterer Verfeinerung durch anschließende Arbeiten mit der Frage nach der Beschaffenheit der postulierten Nanoporen und den auslösenden Mediatoren.

Eine weitere Entschlüsselung dieser Fragen könnte attraktive neue Therapieansätze eröffnen, mit dem Ziel, die axonale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu stabilisieren und so die Degeneration von Axonen und damit irreversible klinisch-neurologische Schäden zu verhindern.

Der Aufbruch zur Erforschung des Kerns der MS – der progredienten, autoimmun vermittelten Neurodegeneration – ist erfolgt. Die Dynamik und Aktualität der Fragestellung wird eindrücklich verdeutlicht durch die Gründung multinationaler Forschungsnetzwerke wie der *Progressive MS Alliance*. Noch sind grundlegende Fragen ungelöst und das letzte Ziel der Forschung nicht erreicht: Das Fortschreiten der Erkrankung zu unterbrechen und damit die schwerwiegenden Folgen der Diagnose MS zu verringern.

## Kapitel 9: Literaturverzeichnis

- Agrawal, S. K., and M. G. Fehlings. 1996a. "Mechanisms of Secondary Injury to Spinal Cord Axons in Vitro: Role of Na<sup>+</sup>, Na(+)-K(+)-ATPase, the Na(+)-H<sup>+</sup> Exchanger, and the Na(+)-Ca<sup>2+</sup> Exchanger." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (2): 545–52.
- Agrawal, S. K., R. Nashmi, and M. G. Fehlings. 2000. "Role of L- and N-Type Calcium Channels in the Pathophysiology of Traumatic Spinal Cord White Matter Injury." *Neuroscience* 99 (1): 179–88.
- Akay, Turgay, Karim Fouad, and Keir G. Pearson. 2008. "New Technique for Drug Application to the Spinal Cord of Walking Mice." *Journal of Neuroscience Methods* 171 (1): 39–47.
- Anhoque, Carolina Fiorin, Simone Cristina Aires Domingues, Antônio Lúcio Teixeira, and Renan Barros Domingues. 2010. "Cognitive Impairment in Clinically Isolated Syndrome: A Systematic Review." *Dementia & Neuropsychologia* 4 (2): 86–90.
- Antel, Jack, Samson Antel, Zografos Caramanos, Douglas L. Arnold, and Tanja Kuhlmann. 2012. "Primary Progressive Multiple Sclerosis: Part of the MS Disease Spectrum or Separate Disease Entity?" *Acta Neuropathologica* 123 (5): 627–38.
- Ayala, Antonio, Mario F. Muñoz, and Sandro Argüelles. 2014. "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014 (May): 360438.
- Azevedo, Christina J., John Kornak, Philip Chu, Mehul Sampat, Darin T. Okuda, Bruce A. Cree, Sarah J. Nelson, Stephen L. Hauser, and Daniel Pelletier. 2014a. "In Vivo Evidence of Glutamate Toxicity in Multiple Sclerosis." *Annals of Neurology* 76 (2): 269–78.
- Banik, Naren L., and Donald C. Shields. n.d. "The Role of Calpain in Neurofilament Protein Degradation Associated With Spinal Cord Injury." In *Calpain Methods and Protocols*, 195–201.
- Baranzini, Sergio E., and Jorge R. Oksenberg. 2017. "The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years." *Trends in Genetics: TIG* 33 (12): 960–70.
- Barnett, Michael H., and John W. Prineas. 2004. "Relapsing and Remitting Multiple Sclerosis: Pathology of the Newly Forming Lesion." *Annals of Neurology* 55 (4): 458–68.
- Basso, Alexandre S., Dan Frenkel, Francisco J. Quintana, Frederico A. Costa-Pinto, Sanja Petrovic-Stojkovic, Lindsay Puckett, Alon Monsonego, et al. 2008.

- “Reversal of Axonal Loss and Disability in a Mouse Model of Progressive Multiple Sclerosis.” *The Journal of Clinical Investigation* 118 (4): 1532–43.
- Bechmann, Ingo, Ian Galea, and V. Hugh Perry. 2007. “What Is the Blood–brain Barrier (not)?” *Trends in Immunology* 28 (1): 5–11.
- Berer, Kerstin, Lisa Ann Gerdes, Egle Cekanaviciute, Xiaoming Jia, Liang Xiao, Zhongkui Xia, Chuan Liu, et al. 2017. “Gut Microbiota from Multiple Sclerosis Patients Enables Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis in Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (40): 10719–24.
- Bernitsas, Evanthia, Fen Bao, Navid Seraji-Bozorgzad, Jessica Chorostecki, Carla Santiago, Alexandros Tselis, Christina Caon, Imad Zak, Scott Millis, and Omar Khan. 2015. “Spinal Cord Atrophy in Multiple Sclerosis and Relationship with Disability across Clinical Phenotypes.” *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 4 (1): 47–51.
- Berridge, M. J., P. Lipp, and M. D. Bootman. 2000. “The Versatility and Universality of Calcium Signalling.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 11–21.
- Bigazzi, Pierluigi E. 1995. “Animal Models of Multiple Sclerosis.” *Clinical Immunology and Immunopathology* 77 (1): 3.
- Birnbaum, Gary, and Jessica Stulc. 2017. “High Dose Biotin as Treatment for Progressive Multiple Sclerosis.” *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 18: 141–43.
- Bishop, Derron, Ivana Nikić, Mary Brinkoetter, Sharmon Knecht, Stephanie Potz, Martin Kerschensteiner, and Thomas Misgeld. 2011. “Near-Infrared Branding Efficiently Correlates Light and Electron Microscopy.” *Nature Methods* 8 (7): 568–70.
- Bitsch, A. 2000. “Acute Axonal Injury in Multiple Sclerosis: Correlation with Demyelination and Inflammation.” *Brain: A Journal of Neurology* 123 (6): 1174–83.
- Bjartmar, C., G. Kidd, S. Mörk, R. Rudick, and B. D. Trapp. 2000. “Neurological Disability Correlates with Spinal Cord Axonal Loss and Reduced N-Acetyl Aspartate in Chronic Multiple Sclerosis Patients.” *Annals of Neurology* 48 (6): 893–901.
- Black, Joel A., Jia Newcombe, Bruce D. Trapp, and Stephen G. Waxman. 2007. “Sodium Channel Expression Within Chronic Multiple Sclerosis Plaques.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66 (9): 828–37.
- Blauth, Kevin, John Soltys, Adeline Matschulat, Cory R. Reiter, Alanna Ritchie, Nicholas L. Baird, Jeffrey L. Bennett, and Gregory P. Owens. 2015. “Antibodies

Produced by Clonally Expanded Plasma Cells in Multiple Sclerosis Cerebrospinal Fluid Cause Demyelination of Spinal Cord Explants.” *Acta Neuropathologica* 130 (6): 765–81.

- Blokhin, Andrei, Tamara Vyshkina, Samuel Komoly, and Bernadette Kalman. 2008. “Variations in Mitochondrial DNA Copy Numbers in MS Brains.” *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 35 (3): 283–87.
- Bolaños, J. P., A. Almeida, V. Stewart, S. Peuchen, J. M. Land, J. B. Clark, and S. J. Heales. 1997. “Nitric Oxide-Mediated Mitochondrial Damage in the Brain: Mechanisms and Implications for Neurodegenerative Diseases.” *Journal of Neurochemistry* 68 (6): 2227–40.
- Bomprezzi, Roberto. 2015. “Dimethyl Fumarate in the Treatment of Relapsing–remitting Multiple Sclerosis: An Overview.” *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 8 (1): 20–30.
- Brand-Schieber, Elimor, and Peter Werner. 2004. “Calcium Channel Blockers Ameliorate Disease in a Mouse Model of Multiple Sclerosis.” *Experimental Neurology* 189 (1): 5–9.
- Brex, P. A., S. M. Leary, J. I. O’Riordan, K. A. Miszkiel, G. T. Plant, A. J. Thompson, and D. H. Miller. 2001. “Measurement of Spinal Cord Area in Clinically Isolated Syndromes Suggestive of Multiple Sclerosis.” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 70 (4): 544–47.
- Browne, Paul, Dhia Chandraratna, Ceri Angood, Helen Tremlett, Chris Baker, Bruce V. Taylor, and Alan J. Thompson. 2014. “Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A Growing Global Problem with Widespread Inequity.” *Neurology* 83 (11): 1022–24.
- Brumley, Michele R., Ian D. Hentall, Alberto Pinzon, Brijesh H. Kadam, Anthony Blythe, Francisco J. Sanchez, Annette M. Taberner, and Brian R. Noga. 2007. “Serotonin Concentrations in the Lumbosacral Spinal Cord of the Adult Rat Following Microinjection or Dorsal Surface Application.” *Journal of Neurophysiology* 98 (3): 1440–50.
- Buck, Dorothea, Annette Förschler, Constantin Lapa, Tibor Schuster, Patrick Vollmar, Thomas Korn, Stefan Nessler, et al. 2012. “<sup>18</sup>F-FDG PET Detects Inflammatory Infiltrates in Spinal Cord Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Lesions.” *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 53 (8): 1269–76.
- Campbell, Graham R., and Don J. Mahad. 2012a. “Mitochondrial Changes Associated with Demyelination: Consequences for Axonal Integrity.” *Mitochondrion* 12 (2): 173–79.

- Campbell, Graham R., and Don J. Mahad 2012b. “Clonal Expansion of Mitochondrial DNA Deletions and the Progression of Multiple Sclerosis.” *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 11 (5): 589–97.
- Charcot, Jean-Martin. 1868. *Histologie de La Sclérose En Plaques*.
- Chen, Hui, Julian C. Assmann, Antje Krenz, Mahbubur Rahman, Myriam Grimm, Christian M. Karsten, Jörg Köhl, Stefan Offermanns, Nina Wettschureck, and Markus Schwaninger. 2014. “Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2 Mediates Dimethyl Fumarate’s Protective Effect in EAE.” *The Journal of Clinical Investigation* 124 (5): 2188–92.
- Coleman, Michael. 2005. “Axon Degeneration Mechanisms: Commonality amid Diversity.” *Nature Reviews. Neuroscience* 6 (11): 889–98.
- Coleman, Michael P., and Marc R. Freeman. 2010. “Wallerian Degeneration, Wld(s), and Nmnat.” *Annual Review of Neuroscience* 33: 245–67.
- Coleman, M. P., L. Conforti, E. A. Buckmaster, A. Tarlton, R. M. Ewing, M. C. Brown, M. F. Lyon, and V. H. Perry. 1998. “An 85-Kb Tandem Triplication in the Slow Wallerian Degeneration (Wlds) Mouse.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (17): 9985–90.
- Compston, Alastair, and Alasdair Coles. 2008. “Multiple Sclerosis.” *The Lancet* 372 (9648): 1502–17.
- Confavreux, C. 2003. “Early Clinical Predictors and Progression of Irreversible Disability in Multiple Sclerosis: An Amnesic Process.” *Brain: A Journal of Neurology* 126 (4): 770–82.
- Confavreux, C. 2006. “Age at Disability Milestones in Multiple Sclerosis.” *Brain: A Journal of Neurology* 129 (3): 595–605.
- Confavreux, Christian, and Alastair Compston. 2006. “The Natural History of Multiple Sclerosis.” In *McAlpine’s Multiple Sclerosis*, 183–272.
- Conforti, L., A. Tarlton, T. G. Mack, W. Mi, E. A. Buckmaster, D. Wagner, V. H. Perry, and M. P. Coleman. 2000. “A Ufd2/D4Cole1e Chimeric Protein and Overexpression of Rbp7 in the Slow Wallerian Degeneration (WldS) Mouse.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (21): 11377–82.
- Cordiglieri, Chiara, and Cinthia Farina. 2010. “Astrocytes Exert and Control Immune Responses in the Brain.” *Current Immunology Reviews* 6 (3): 150–59.
- Cree, Bruce. 2017. “Long Term Disease Progression in Disease Activity-Free Relapsing MS.” *ECTRIMS Online Library*, October. <https://doi.org/199879>.
- Croxford, Andrew L., Florian C. Kurschus, and Ari Waisman. 2011. “Mouse Models



for Multiple Sclerosis: Historical Facts and Future Implications.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1812 (2): 177–83.

- Das, Arabinda, M. Guyton, Jonathan Butler, Swapan Ray, and Naren Banik. 2008. “Activation of Calpain and Caspase Pathways in Demyelination and Neurodegeneration in Animal Model of Multiple Sclerosis.” *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 7 (3): 313–20.
- Denk, Winfried, David W. Piston, and Watt W. Webb. 1995. “Two-Photon Molecular Excitation in Laser-Scanning Microscopy.” In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 445–58.
- Denk, W., J. Strickler, and W. Webb. 1990. “Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy.” *Science* 248 (4951): 73–76.
- Direnberger, Stephan, Marsilius Mues, Vincenzo Micale, Carsten T. Wotjak, Steffen Dietzel, Michael Schubert, Andreas Scharr, et al. 2012. “Biocompatibility of a Genetically Encoded Calcium Indicator in a Transgenic Mouse Model.” *Nature Communications* 3: 1031.
- Dutta, Ranjan, Jennifer McDonough, Xinghua Yin, John Peterson, Ansi Chang, Thalia Torres, Tatyana Gudz, et al. 2006. “Mitochondrial Dysfunction as a Cause of Axonal Degeneration in Multiple Sclerosis Patients.” *Annals of Neurology* 59 (3): 478–89.
- “Effect of MD1003 in Progressive Multiple Sclerosis (SPI2) - ClinicalTrials.gov.” n.d. Accessed November 28, 2017. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02936037>.
- Evangelou, N. 2004. “Pathological Study of Spinal Cord Atrophy in Multiple Sclerosis Suggests Limited Role of Local Lesions.” *Brain: A Journal of Neurology* 128 (1): 29–34.
- Farooqui, Akhlaq A., Wei-Yi Ong, and Lloyd A. Horrocks. 2004. “Biochemical Aspects of Neurodegeneration in Human Brain: Involvement of Neural Membrane Phospholipids and Phospholipases A2.” *Neurochemical Research* 29 (11): 1961–77.
- Feng, G., R. H. Mellor, M. Bernstein, C. Keller-Peck, Q. T. Nguyen, M. Wallace, J. M. Nerbonne, J. W. Lichtman, and J. R. Sanes. 2000. “Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP.” *Neuron* 28 (1): 41–51.
- Fern, Robert F., Carlos Matute, and Peter K. Stys. 2014. “White Matter Injury: Ischemic and Nonischemic.” *Glia* 62 (11): 1780–89.
- Fern, R., B. R. Ransom, and S. G. Waxman. 1995. “Voltage-Gated Calcium Channels in CNS White Matter: Role in Anoxic Injury.” *Journal of Neurophysiology* 74 (1): 369–77.

- Filatov, V. L., A. G. Katrukha, T. V. Bulargina, and N. B. Gusev. 1999. "Troponin: Structure, Properties, and Mechanism of Functioning." *Biochemistry. Biokhimiia* 64 (9): 969–85.
- Fischer, Marie Therese, Isabella Wimmer, Romana Höftberger, Susanna Gerlach, Lukas Haider, Tobias Zrzavy, Simon Hametner, et al. 2013. "Disease-Specific Molecular Events in Cortical Multiple Sclerosis Lesions." *Brain: A Journal of Neurology* 136 (Pt 6): 1799–1815.
- Fischer, Marie T., Rakhi Sharma, Jamie L. Lim, Lukas Haider, Josa M. Frischer, Joost Drexhage, Don Mahad, Monika Bradl, Jack van Horssen, and Hans Lassmann. 2012. "NADPH Oxidase Expression in Active Multiple Sclerosis Lesions in Relation to Oxidative Tissue Damage and Mitochondrial Injury." *Brain: A Journal of Neurology* 135 (Pt 3): 886–99.
- Fisher, E., R. A. Rudick, J. H. Simon, G. Cutter, M. Baier, J-C Lee, D. Miller, et al. 2002. "Eight-Year Follow-up Study of Brain Atrophy in Patients with MS." *Neurology* 59 (9): 1412–20.
- Fisniku, Leonora K., Declan T. Chard, Jonathan S. Jackson, Valerie M. Anderson, Daniel R. Altmann, Katherine A. Miszkiel, Alan J. Thompson, and David H. Miller. 2008. "Gray Matter Atrophy Is Related to Long-Term Disability in Multiple Sclerosis." *Annals of Neurology* 64 (3): 247–54.
- Forte, Michael, Bruce G. Gold, Gail Marracci, Priya Chaudhary, Emy Basso, Dustin Johnsen, Xiaolin Yu, et al. 2007. "Cyclophilin D Inactivation Protects Axons in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, an Animal Model of Multiple Sclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18): 7558–63.
- Friese, Manuel A., Matthew J. Craner, Ruth Etzensperger, Sandra Vergo, John A. Wemmie, Michael J. Welsh, Angela Vincent, and Lars Fugger. 2007a. "Acid-Sensing Ion Channel-1 Contributes to Axonal Degeneration in Autoimmune Inflammation of the Central Nervous System." *Nature Medicine* 13 (12): 1483–89.
- Friese, Manuel A., Xavier Montalban, Nick Willcox, John I. Bell, Roland Martin, and Lars Fugger. 2006a. "The Value of Animal Models for Drug Development in Multiple Sclerosis." *Brain: A Journal of Neurology* 129 (Pt 8): 1940–52.
- Friese, Manuel A., Benjamin Schattling, and Lars Fugger. 2014. "Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in Multiple Sclerosis." *Nature Reviews. Neurology* 10 (4): 225–38.
- Frischer, Josa M., Stephan Bramow, Assunta Dal-Bianco, Claudia F. Lucchinetti, Helmut Rauschka, Manfred Schmidbauer, Henning Laursen, Per Soelberg Sorensen, and Hans Lassmann. 2009. "The Relation between Inflammation and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis Brains." *Brain: A Journal of Neurology*

- Frischer, Josa M., Stephen D. Weigand, Yong Guo, Nilufer Kale, Joseph E. Parisi, Istvan Pirko, Jay Mandrekar, et al. 2015. “Clinical and Pathological Insights into the Dynamic Nature of the White Matter Multiple Sclerosis Plaque.” *Annals of Neurology* 78 (5): 710–21.
- Galea, Ian, Ingo Bechmann, and V. Hugh Perry. 2007. “What Is Immune Privilege (not)?” *Trends in Immunology* 28 (1): 12–18.
- Ganter, P., C. Prince, and M. M. Esiri. 1999. “Spinal Cord Axonal Loss in Multiple Sclerosis: A Post-Mortem Study.” *Neuropathology and Applied Neurobiology* 25 (6): 459–67.
- George, E. B., J. D. Glass, and J. W. Griffin. 1995. “Axotomy-Induced Axonal Degeneration Is Mediated by Calcium Influx through Ion-Specific Channels.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15 (10): 6445–52.
- Givre, Syndee. 2003. “Sim FJ, Zhao C, Penderis J, Franklin RJM. The Age-Related Decrease in CNS Remyelination Efficiency Is Attributable to an Impairment of Both Oligodendrocyte Progenitor Recruitment and Differentiation.” *Journal of Neuro-Ophthalmology: The Official Journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 23 (2): 168.
- Gold, Ralf, Christopher Linington, and Hans Lassmann. 2006. “Understanding Pathogenesis and Therapy of Multiple Sclerosis via Animal Models: 70 Years of Merits and Culprits in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Research.” *Brain: A Journal of Neurology* 129 (Pt 8): 1953–71.
- Goto, Noboru. 1987. “Discriminative Staining Methods for the Nervous System: Luxol Fast Blue–Periodic Acid-Schiff– Hematoxylin Triple Stain and Subsidiary Staining Methods.” *Stain Technology* 62 (5): 305–15.
- Goverman, Joan, Antoine Perchellet, and Eric Huseby. 2005. “The Role of CD8 T Cells in Multiple Sclerosis and Its Animal Models.” *Current Drug Target -Inflammation & Allergy* 4 (2): 239–45.
- Greco, A., L. Minghetti, G. Sette, C. Fieschi, and G. Levi. 1999. “Cerebrospinal Fluid Isoprostane Shows Oxidative Stress in Patients with Multiple Sclerosis.” *Neurology* 53 (8): 1876–79.
- Grienberger, Christine, and Arthur Konnerth. 2012a. “Imaging Calcium in Neurons.” *Neuron* 73 (5): 862–85.
- Griesbeck, O., G. S. Baird, R. E. Campbell, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien. 2001. “Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein. Mechanism and Applications.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (31):

29188–94.

- Gwinn, Maureen R., and Val Vallyathan. 2006. “Respiratory Burst: Role in Signal Transduction in Alveolar Macrophages.” *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 9 (1): 27–39.
- Haider, Lukas, Marie T. Fischer, Josa M. Frischer, Jan Bauer, Romana Höftberger, Gergö Botond, Harald Esterbauer, Christoph J. Binder, Joseph L. Witztum, and Hans Lassmann. 2011a. “Oxidative Damage in Multiple Sclerosis Lesions.” *Brain: A Journal of Neurology* 134 (Pt 7): 1914–24.
- Håkansson, I., A. Tisell, P. Cassel, K. Blennow, H. Zetterberg, P. Lundberg, C. Dahle, M. Vrethem, and J. Ernerudh. 2017. “Neurofilament Light Chain in Cerebrospinal Fluid and Prediction of Disease Activity in Clinically Isolated Syndrome and Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis.” *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies* 24 (5): 703–12.
- Halliwell, B. 2007. “Biochemistry of Oxidative Stress: Figure 1.” *Biochemical Society Transactions* 35 (5): 1147–50.
- Hametner, Simon, Isabella Wimmer, Lukas Haider, Sabine Pfeifenbring, Wolfgang Brück, and Hans Lassmann. 2013. “Iron and Neurodegeneration in the Multiple Sclerosis Brain.” *Annals of Neurology* 74 (6): 848–61.
- Handunnetthi, Lahiru, Adam E. Handel, and Sreeram V. Ramagopalan. 2010. “Contribution of Genetic, Epigenetic and Transcriptomic Differences to Twin Discordance in Multiple Sclerosis.” *Expert Review of Neurotherapeutics* 10 (9): 1379–81.
- Hansen, Anna M., and Rachel R. Caspi. 2010. “Glutamate Joins the Ranks of Immunomodulators.” *Nature Medicine* 16 (8): 856–58.
- Hanson, James V. M., Sebastian C. Lukas, Misha Pless, and Sven Schippling. 2016. “Optical Coherence Tomography in Multiple Sclerosis.” *Seminars in Neurology* 36 (2): 177–84.
- Hardingham, Giles E., and Hilmar Bading. 2010. “Synaptic versus Extrasynaptic NMDA Receptor Signalling: Implications for Neurodegenerative Disorders.” *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (10): 682–96.
- Heim, Nicola, Olga Garaschuk, Michael W. Friedrich, Marco Mank, Ruxandra I. Milos, Yury Kovalchuk, Arthur Konnerth, and Oliver Griesbeck. 2007a. “Improved Calcium Imaging in Transgenic Mice Expressing a Troponin C–based Biosensor.” *Nature Methods* 4 (2): 127–29.
- Heim, Nicola, and Oliver Griesbeck. 2004a. “Genetically Encoded Indicators of Cellular Calcium Dynamics Based on Troponin C and Green Fluorescent Protein.”

- The Journal of Biological Chemistry 279 (14): 14280–86.
- Helmchen, F., K. Imoto, and B. Sakmann. 1996. “Ca<sup>2+</sup> Buffering and Action Potential-Evoked Ca<sup>2+</sup> Signaling in Dendrites of Pyramidal Neurons.” *Biophysical Journal* 70 (2): 1069–81.
- Helmchen, Fritjof, and Winfried Denk. 2005. “Deep Tissue Two-Photon Microscopy.” *Nature Methods* 2 (12): 932–40.
- Hemmer, Bernhard, Martin Kerschensteiner, and Thomas Korn. 2015. “Role of the Innate and Adaptive Immune Responses in the Course of Multiple Sclerosis.” *Lancet Neurology* 14 (4): 406–19.
- Hermann, Petra M., Shawn N. Watson, and Willem C. Wildering. 2014. “Phospholipase A2 - Nexus of Aging, Oxidative Stress, Neuronal Excitability, and Functional Decline of the Aging Nervous System? Insights from a Snail Model System of Neuronal Aging and Age-Associated Memory Impairment.” *Frontiers in Genetics* 5 (December): 419.
- Herrero-Herranz, Eva, Luis A. Pardo, Ralf Gold, and Ralf A. Linker. 2008. “Pattern of Axonal Injury in Murine Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Implications for Multiple Sclerosis.” *Neurobiology of Disease* 30 (2): 162–73.
- Hindson, Jordan. 2017. “Multiple Sclerosis: A Possible Link between Multiple Sclerosis and Gut Microbiota.” *Nature Reviews. Neurology* 13 (12): 705.
- Hirata, F., and J. Axelrod. 1980. “Phospholipid Methylation and Biological Signal Transmission.” *Science* 209 (4461): 1082–90.
- Hohlfeld, R., and H. Wekerle. 2001. “Immunological Update on Multiple Sclerosis.” *Current Opinion in Neurology* 14 (3): 299–304.
- Hollinger, Kristen R., Jesse Alt, Alison M. Riehm, Barbara S. Slusher, and Adam I. Kaplin. 2016. “Dose-Dependent Inhibition of GCPII to Prevent and Treat Cognitive Impairment in the EAE Model of Multiple Sclerosis.” *Brain Research* 1635 (March): 105–12.
- Horsssen, Jack van, Maarten E. Witte, Gerty Schreibelt, and Helga E. de Vries. 2011. “Radical Changes in Multiple Sclerosis Pathogenesis.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1812 (2): 141–50.
- Jares-Erijman, Elizabeth A., and Thomas M. Jovin. 2003. “FRET Imaging.” *Nature Biotechnology* 21 (11): 1387–95.
- Jarius, S., P. Eichhorn, D. Franciotta, H. F. Petereit, G. Akman-Demir, M. Wick, and B. Wildemann. 2017. “The MRZ Reaction as a Highly Specific Marker of Multiple Sclerosis: Re-Evaluation and Structured Review of the Literature.” *Journal of Neurology* 264 (3): 453–66.



- Jones, Kelly A., Ji Eun Han, Jason P. DeBruyne, and Benjamin D. Philpot. 2016. "Persistent Neuronal Ube3a Expression in the Suprachiasmatic Nucleus of Angelman Syndrome Model Mice." *Scientific Reports* 6 (June): 28238.
- Junker, A., J. Ivanidze, J. Malotka, I. Eiglmeier, H. Lassmann, H. Wekerle, E. Meinl, R. Hohlfeld, and K. Dornmair. 2007. "Multiple Sclerosis: T-Cell Receptor Expression in Distinct Brain Regions." *Brain: A Journal of Neurology* 130 (11): 2789–99.
- Kapoor, Raju, Meirion Davies, Paul A. Blaker, Susan M. Hall, and Kenneth J. Smith. 2003a. "Blockers of Sodium and Calcium Entry Protect Axons from Nitric Oxide-Mediated Degeneration." *Annals of Neurology* 53 (2): 174–80.
- Kappos, Ludwig, Ralf Gold, David H. Miller, David G. MacManus, Eva Havrdova, Volker Limmroth, Chris H. Polman, et al. 2012. "Effect of BG-12 on Contrast-Enhanced Lesions in Patients with Relapsing--Remitting Multiple Sclerosis: Subgroup Analyses from the Phase 2b Study." *Multiple Sclerosis* 18 (3): 314–21.
- Kerschensteiner, Martin, Martin E. Schwab, Jeff W. Lichtman, and Thomas Misgeld. 2005. "In Vivo Imaging of Axonal Degeneration and Regeneration in the Injured Spinal Cord." *Nature Medicine* 11 (5): 572–77.
- Khananshvili, Daniel. 2014. "Sodium-Calcium Exchangers (NCX): Molecular Hallmarks Underlying the Tissue-Specific and Systemic Functions." *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 466 (1): 43–60.
- Kipp, Markus, Stella Nyamoya, Tanja Hochstrasser, and Sandra Amor. 2017. "Multiple Sclerosis Animal Models: A Clinical and Histopathological Perspective." *Brain Pathology* 27 (2): 123–37.
- Kitao, Tatsuya, Kazuhiro Takuma, Toshiyuki Kawasaki, Yuriko Inoue, Aki Ikehara, Tetsuaki Nashida, Yukio Ago, and Toshio Matsuda. 2010. "The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger-Mediated Ca<sup>2+</sup> Influx Triggers Nitric Oxide-Induced Cytotoxicity in Cultured Astrocytes." *Neurochemistry International* 57 (1): 58–66.
- Kleinfeld, D., P. P. Mitra, F. Helmchen, and W. Denk. 1998. "Fluctuations and Stimulus-Induced Changes in Blood Flow Observed in Individual Capillaries in Layers 2 through 4 of Rat Neocortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15741–46.
- Knier, Benjamin, Veit Rothhammer, Sylvia Heink, Oliver Puk, Jochen Graw, Bernhard Hemmer, and Thomas Korn. 2015. "Neutralizing IL-17 Protects the Optic Nerve from Autoimmune Pathology and Prevents Retinal Nerve Fiber Layer Atrophy during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of Autoimmunity* 56 (January): 34–44.
- Knoferle, J., J. C. Koch, T. Ostendorf, U. Michel, V. Planchamp, P. Vutova, L. Tonges,

- et al. 2010. “Mechanisms of Acute Axonal Degeneration in the Optic Nerve in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (13): 6064–69.
- Koch-Henriksen, Nils, and Per Soelberg Sørensen. 2010. “The Changing Demographic Pattern of Multiple Sclerosis Epidemiology.” *Lancet Neurology* 9 (5): 520–32.
- Koch, Marcus W., Luanne M. Metz, Smriti M. Agrawal, and V. Wee Yong. 2013. “Environmental Factors and Their Regulation of Immunity in Multiple Sclerosis.” *Journal of the Neurological Sciences* 324 (1-2): 10–16.
- Kohro, Yuta, Emi Sakaguchi, Ryoichi Tashima, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Hideyuki Okano, Kazuhide Inoue, and Makoto Tsuda. 2015. “A New Minimally-Invasive Method for Microinjection into the Mouse Spinal Dorsal Horn.” *Scientific Reports* 5 (September): 14306.
- Koritschoner RS, Schweinburg F. 1925. “Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe.” *Zeitschrift Für Immunitätsforschung und Experimentelle Therapie* 42. [https://books.google.com/books/about/Zeitschrift\\_F%C3%BCr\\_Immunit%C3%A4tsforschung\\_un.html?hl=&id=GGgJAQAIAAJ](https://books.google.com/books/about/Zeitschrift_F%C3%BCr_Immunit%C3%A4tsforschung_un.html?hl=&id=GGgJAQAIAAJ).
- Kornek, B., M. K. Storch, R. Weissert, E. Wallstroem, A. Stefferl, T. Olsson, C. Linington, M. Schmidbauer, and H. Lassmann. 2000. “Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis: A Comparative Quantitative Study of Axonal Injury in Active, Inactive, and Remyelinated Lesions.” *The American Journal of Pathology* 157 (1): 267–76.
- Korn, Thomas, and Axel Kallies. 2017. “T Cell Responses in the Central Nervous System.” *Nature Reviews. Immunology* 17 (3): 179–94.
- Kremenutzky, M., G. P. A. Rice, J. Baskerville, D. M. Wingerchuk, and G. C. Ebers. 2006. “The Natural History of Multiple Sclerosis: A Geographically Based Study 9: Observations on the Progressive Phase of the Disease.” *Brain: A Journal of Neurology* 129 (Pt 3): 584–94.
- Kreutzer, Mihaela, Frauke Seehusen, Robert Kreutzer, Kidsadagorn Pringproa, Maren Kummerfeld, Peter Claus, Ulrich Deschl, et al. 2012. “Axonopathy Is Associated with Complex Axonal Transport Defects in a Model of Multiple Sclerosis.” *Brain Pathology* 22 (4): 454–71.
- Krishnamoorthy, Gurumoorthy, and Hartmut Wekerle. 2009. “EAE: An Immunologist’s Magic Eye.” *European Journal of Immunology* 39 (8): 2031–35.
- Kutzelnigg, A. 2005. “Cortical Demyelination and Diffuse White Matter Injury in Multiple Sclerosis.” *Brain: A Journal of Neurology* 128 (11): 2705–12.
- Laser, Heike, Laura Conforti, Giacomo Morreale, Till G. M. Mack, Molly Heyer, Jane E. Haley, Thomas M. Wishart, et al. 2006. “The Slow Wallerian Degeneration

Protein, WldS, Binds Directly to VCP/p97 and Partially Redistributes It within the Nucleus.” *Molecular Biology of the Cell* 17 (3): 1075–84.

- Lassmann, H. 2003. “Axonal Injury in Multiple Sclerosis.” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 74 (6): 695–97.
- Lassmann, Hans, Jack van Horssen, and Don Mahad. 2012. “Progressive Multiple Sclerosis: Pathology and Pathogenesis.” *Nature Reviews. Neurology* 8 (11): 647–56.
- Leary, S. M., D. H. Miller, V. L. Stevenson, P. A. Brex, D. T. Chard, and A. J. Thompson. 2003. “Interferon -1a in Primary Progressive MS: An Exploratory, Randomized, Controlled Trial.” *Neurology* 60 (1): 44–51.
- Leung, Gary, Melissa Tully, Jonathan Tang, Shengxi Wu, and Riyi Shi. 2017. “Elevated Axonal Membrane Permeability and Its Correlation with Motor Deficits in an Animal Model of Multiple Sclerosis.” *Translational Neurodegeneration* 6 (February): 5.
- Levin, Lynn I., Cassandra L. Munger, Eilis J. O’Reilly, Kerstin I. Falk, and Alberto Ascherio. 2010. “Primary Infection with the Epstein-Barr Virus and Risk of Multiple Sclerosis.” *Annals of Neurology* 67 (6): 824–30.
- Lublin, F. D., R. L. Knobler, B. Kalman, M. Goldhaber, J. Marini, M. Perrault, C. D’Imperio, J. Joseph, S. S. Alkan, and R. Korngold. 1993. “Monoclonal Anti-Gamma Interferon Antibodies Enhance Experimental Allergic Encephalomyelitis.” *Autoimmunity* 16 (4): 267–74.
- Lublin, Fred D., Stephen C. Reingold, Jeffrey A. Cohen, Gary R. Cutter, Per Soelberg Sørensen, Alan J. Thompson, Jerry S. Wolinsky, et al. 2014. “Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: The 2013 Revisions.” *Neurology* 83 (3): 278–86.
- Lucchinetti, C., W. Brück, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, and H. Lassmann. 2000. “Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination.” *Annals of Neurology* 47 (6): 707–17.
- Lu, F., M. Selak, J. O’Connor, S. Croul, C. Lorenzana, C. Butunoi, and B. Kalman. 2000. “Oxidative Damage to Mitochondrial DNA and Activity of Mitochondrial Enzymes in Chronic Active Lesions of Multiple Sclerosis.” *Journal of the Neurological Sciences* 177 (2): 95–103.
- Lunn, E. R., V. H. Perry, M. C. Brown, H. Rosen, and S. Gordon. 1989. “Absence of Wallerian Degeneration Does Not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve.” *The European Journal of Neuroscience* 1 (1): 27–33.
- Mack, T. G., M. Reiner, B. Beirowski, W. Mi, M. Emanuelli, D. Wagner, D. Thomson, et al. 2001. “Wallerian Degeneration of Injured Axons and Synapses Is Delayed by a Ube4b/Nmnat Chimeric Gene.” *Nature Neuroscience* 4 (12): 1199–1206.

- Madsen, L. S., E. C. Andersson, L. Jansson, M. Krogsgaard, C. B. Andersen, J. Engberg, J. L. Strominger, et al. 1999. "A Humanized Model for Multiple Sclerosis Using HLA-DR2 and a Human T-Cell Receptor." *Nature Genetics* 23 (3): 343–47.
- Mahad, D., H. Lassmann, and D. Turnbull. 2008. "Review: Mitochondria and Disease Progression in Multiple Sclerosis." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34 (6): 577–89.
- Mahad, Don J., Iryna Ziabreva, Graham Campbell, Nichola Lax, Katherine White, Peter S. Hanson, Hans Lassmann, and Douglass M. Turnbull. 2009. "Mitochondrial Changes within Axons in Multiple Sclerosis." *Brain: A Journal of Neurology* 132 (Pt 5): 1161–74.
- Mahad, Don, Iryna Ziabreva, Hans Lassmann, and Douglas Turnbull. 2008. "Mitochondrial Defects in Acute Multiple Sclerosis Lesions." *Brain: A Journal of Neurology* 131 (Pt 7): 1722–35.
- Mank, Marco, Alexandre Ferrão Santos, Stephan Drenth, Thomas D. Mrsic-Flogel, Sonja B. Hofer, Valentin Stein, Thomas Hendel, et al. 2008. "A Genetically Encoded Calcium Indicator for Chronic in Vivo Two-Photon Imaging." *Nature Methods* 5 (9): 805–11.
- Mao, Peizhong, Maria Manczak, Ulziibat P. Shirendeb, and P. Hemachandra Reddy. 2013. "MitoQ, a Mitochondria-Targeted Antioxidant, Delays Disease Progression and Alleviates Pathogenesis in an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model of Multiple Sclerosis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1832 (12): 2322–31.
- Matute, C., M. Domercq, D. J. Fogarty, M. Pascual de Zulueta, and M. V. Sánchez-Gómez. 1999. "On How Altered Glutamate Homeostasis May Contribute to Demyelinating Diseases of the CNS." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 468: 97–107.
- Mayer, Marie Cathrin, and Edgar Meinl. 2012. "Glycoproteins as Targets of Autoantibodies in CNS Inflammation: MOG and More." *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 5 (3): 147–59.
- McAlpine, Douglas, and Alastair Compston. 2005. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Elsevier Health Sciences.
- McKee, Justin B., Charles L. Cottrill, John Elston, Simon Epps, Nikos Evangelou, Stephen Gerry, Christopher Kennard, et al. 2017. "Amiloride Does Not Protect Retinal Nerve Fibre Layer Thickness in Optic Neuritis in a Phase 2 Randomised Controlled Trial." *Multiple Sclerosis*, November, 1352458517742979.
- Mestas, J., and C. C. W. Hughes. 2004. "Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology." *The Journal of Immunology* 172 (5): 2731–38.

- Miller, Bradley R., Craig Press, Richard W. Daniels, Yo Sasaki, Jeffrey Milbrandt, and Aaron DiAntonio. 2009. "A Dual Leucine Kinase-dependent Axon Self-Destruction Program Promotes Wallerian Degeneration." *Nature Neuroscience* 12 (4): 387–89.
- Miller, David H., Omar A. Khan, William A. Sheremata, Lance D. Blumhardt, George P. A. Rice, Michele A. Libonati, Allison J. Willmer-Hulme, Catherine M. Dalton, Katherine A. Miszkiel, and Paul W. O'Connor. 2003. "A Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis." *The New England Journal of Medicine* 348 (1): 15–23.
- Misgeld, Thomas, Ivana Nikic, and Martin Kerschensteiner. 2007a. "In Vivo Imaging of Single Axons in the Mouse Spinal Cord." *Nature Protocols* 2 (2): 263–68.
- "MitoQ for Fatigue in Multiple Sclerosis - ClinicalTrials.gov." n.d. Accessed November 28, 2017. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03166800>.
- Moutsianas, Loukas, Luke Jostins, Ashley H. Beecham, Alexander T. Dilthey, Dionysia K. Xifara, Maria Ban, Tejas S. Shah, et al. 2015. "Class II HLA Interactions Modulate Genetic Risk for Multiple Sclerosis." *Nature Genetics* 47 (10): 1107–13.
- "MS-SMART: Multiple Sclerosis-Secondary Progressive Multi-Arm Randomisation Trial - ClinicalTrials.gov." n.d. Accessed November 29, 2017. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01910259>.
- Munger, Kassandra L., and Alberto Ascherio. 2007. "Risk Factors in the Development of Multiple Sclerosis." *Expert Review of Clinical Immunology* 3 (5): 739–48.
- M., Zachary, and Jacob A. 2012. "Mechanisms and Patterns of Axonal Loss in Multiple Sclerosis." In *Neurodegeneration*, edited by L. Miguel Martins. InTech.
- Nakai, J., M. Ohkura, and K. Imoto. 2001. "A High Signal-to-Noise Ca(2+) Probe Composed of a Single Green Fluorescent Protein." *Nature Biotechnology* 19 (2): 137–41.
- Neher, E. 1995. "The Use of Fura-2 for Estimating ca Buffers and ca Fluxes." *Neuropharmacology* 34 (11): 1423–42.
- Neher, E., and G. J. Augustine. 1992. "Calcium Gradients and Buffers in Bovine Chromaffin Cells." *The Journal of Physiology* 450 (May): 273–301.
- Neumann, Harald, Isabelle M. Medana, Jan Bauer, and Hans Lassmann. 2002. "Cytotoxic T Lymphocytes in Autoimmune and Degenerative CNS Diseases." *Trends in Neurosciences* 25 (6): 313–19.
- Nikić, Ivana, Doron Merkler, Catherine Sorbara, Mary Brinkoetter, Mario Kreutzfeldt, Florence M. Bareyre, Wolfgang Brück, Derron Bishop, Thomas Misgeld, and Martin Kerschensteiner. 2011. "A Reversible Form of Axon Damage in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis." *Nature*



Medicine 17 (4): 495–99.

- Nyska, Abraham, Miri Horowitz, Debbie Anaby, Alon Sabban, Ilit Leizerman, Eran Blaugrund, Adi Mayk, and Vered Behar. 2006. “A New Method of Wet Scanning Electron Microscopy for the Analysis of Myelination in EAE Mouse Model of Multiple Sclerosis.” *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 57 (4): 291–97.
- Oheim, M., E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, and S. Charpak. 2001. “Two-Photon Microscopy in Brain Tissue: Parameters Influencing the Imaging Depth.” *Journal of Neuroscience Methods* 111 (1): 29–37.
- Oliver, A. E., G. A. Baker, R. D. Fugate, F. Tablin, and J. H. Crowe. 2000. “Effects of Temperature on Calcium-Sensitive Fluorescent Probes.” *Biophysical Journal* 78 (4): 2116–26.
- Ontaneda, Daniel, Robert J. Fox, and Jeremy Chataway. 2015. “Clinical Trials in Progressive Multiple Sclerosis: Lessons Learned and Future Perspectives.” *Lancet Neurology* 14 (2): 208–23.
- Ontaneda, Daniel, Megan Hyland, and Jeffrey A. Cohen. 2012. “Multiple Sclerosis: New Insights in Pathogenesis and Novel Therapeutics.” *Annual Review of Medicine* 63 (1): 389–404.
- Orrenius, Sten, Boris Zhivotovsky, and Pierluigi Nicotera. 2003. “Regulation of Cell Death: The Calcium-Apoptosis Link.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7): 552–65.
- Osterloh, Jeannette M., Jing Yang, Timothy M. Rooney, A. Nicole Fox, Robert Adalbert, Eric H. Powell, Amy E. Sheehan, et al. 2012. “dSarm/Sarm1 Is Required for Activation of an Injury-Induced Axon Death Pathway.” *Science* 337 (6093): 481–84.
- Ostermann, E., N. H. Sternberger, and L. A. Sternberger. 1983. “Immunocytochemistry of Brain-Reactive Monoclonal Antibodies in Peripheral Tissues.” *Cell and Tissue Research* 228 (3): 459–73.
- Ouardouz, Mohamed, Elaine Coderre, Ajoy Basak, Andrew Chen, Gerald W. Zamponi, Shameed Hameed, Renata Rehak, Xinghua Yin, Bruce D. Trapp, and Peter K. Stys. 2009. “Glutamate Receptors on Myelinated Spinal Cord Axons: I. GluR6 Kainate Receptors.” *Annals of Neurology* 65 (2): 151–59.
- Ouardouz, Mohamed, Elaine Coderre, Gerald W. Zamponi, Shameed Hameed, Xinghua Yin, Bruce D. Trapp, and Peter K. Stys. 2009. “Glutamate Receptors on Myelinated Spinal Cord Axons: II. AMPA and GluR5 Receptors.” *Annals of Neurology* 65 (2): 160–66.
- Ouardouz, Mohamed, Maria A. Nikolaeva, Elaine Coderre, Gerald W. Zamponi, John

- E. McRory, Bruce D. Trapp, Xinghua Yin, Weili Wang, John Woulfe, and Peter K. Stys. 2003. "Depolarization-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in Ischemic Spinal Cord White Matter Involves L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Activation of Ryanodine Receptors." *Neuron* 40 (1): 53–63.
- Panitch, H. S., R. L. Hirsch, J. Schindler, and K. P. Johnson. 2011. "Treatment of Multiple Sclerosis with Gamma Interferon: Exacerbations Associated with Activation of the Immune System." *Neurology* 76 (20): 1734–1734.
- Paula Alves Sousa, Alessandra de, Kory R. Johnson, Richard Nicholas, Sam Darko, David A. Price, Daniel C. Douek, Steven Jacobson, and Paolo A. Muraro. 2016. "Intrathecal T-Cell Clonal Expansions in Patients with Multiple Sclerosis." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 3 (6): 422–33.
- Paz Soldán, M. Mateo, Martina Novotna, Nuhad Abou Zeid, Nilufer Kale, Melih Tutuncu, Daniel J. Crusan, Elizabeth J. Atkinson, et al. 2015. "Relapses and Disability Accumulation in Progressive Multiple Sclerosis." *Neurology* 84 (1): 81–88.
- Peluffo, H., A. Estevez, L. Barbeito, and J. M. Stutzmann. 1997. "Riluzole Promotes Survival of Rat Motoneurons in Vitro by Stimulating Trophic Activity Produced by Spinal Astrocyte Monolayers." *Neuroscience Letters* 228 (3): 207–11.
- Pérez-Miralles, F., J. Sastre-Garriga, M. Tintoré, G. Arrambide, C. Nos, H. Perkal, J. Río, et al. 2013. "Clinical Impact of Early Brain Atrophy in Clinically Isolated Syndromes." *Multiple Sclerosis* 19 (14): 1878–86.
- Petersen, G., R. Wittmann, V. Arndt, and D. Göppfarth. 2014. "Epidemiologie Der Multiplen Sklerose in Deutschland." *Der Nervenarzt* 85 (8): 990–98.
- Peterson, J. W., L. Bö, S. Mörk, A. Chang, and B. D. Trapp. 2001. "Transected Neurites, Apoptotic Neurons, and Reduced Inflammation in Cortical Multiple Sclerosis Lesions." *Annals of Neurology* 50 (3): 389–400.
- Petrova, Natalia, Daniele Carassiti, Daniel R. Altmann, David Baker, and Klaus Schmierer. 2017. "Axonal Loss in the Multiple Sclerosis Spinal Cord Revisited." *Brain Pathology*, April. <https://doi.org/10.1111/bpa.12516>.
- Petzold, Axel, Djordje Gveric, Mike Groves, Klaus Schmierer, Donna Grant, Miles Chapman, Geoffrey Keir, Louise Cuzner, and Edward J. Thompson. 2008. "Phosphorylation and Compactness of Neurofilaments in Multiple Sclerosis: Indicators of Axonal Pathology." *Experimental Neurology* 213 (2): 326–35.
- Piani, D., K. Frei, K. Q. Do, M. Cuénod, and A. Fontana. 1991. "Murine Brain Macrophages Induced NMDA Receptor Mediated Neurotoxicity in Vitro by Secreting Glutamate." *Neuroscience Letters* 133 (2): 159–62.
- Piani, D., M. Spranger, K. Frei, A. Schaffner, and A. Fontana. 1992. "Macrophage-

Induced Cytotoxicity of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Positive Neurons Involves Excitatory Amino Acids rather than Reactive Oxygen Intermediates and Cytokines.” *European Journal of Immunology* 22 (9): 2429–36.

Popescu, Bogdan F. Gh, and Claudia F. Lucchinetti. 2012. “Pathology of Demyelinating Diseases.” *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7 (1): 185–217.

Popescu, V., R. Klaver, P. Voorn, Y. Galis-de Graaf, D. L. Knol, J. W. R. Twisk, A. Versteeg, et al. 2015. “What Drives MRI-Measured Cortical Atrophy in Multiple Sclerosis?” *Multiple Sclerosis* 21 (10): 1280–90.

Povlishock, J. T., D. P. Becker, C. L. Cheng, and G. W. Vaughan. 1983. “Axonal Change in Minor Head Injury.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 42 (3): 225–42.

Price, M. P., G. R. Lewin, S. L. McIlwrath, C. Cheng, J. Xie, P. A. Heppenstall, C. L. Stucky, et al. 2000. “The Mammalian Sodium Channel BNC1 Is Required for Normal Touch Sensation.” *Nature* 407 (6807): 1007–11.

Prousek, Josef. 2007. “Fenton Chemistry in Biology and Medicine.” *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* 79 (12). <https://doi.org/10.1351/pac200779122325>.

Qi, Xiaoping, Alfred S. Lewin, Liang Sun, William W. Hauswirth, and John Guy. 2007. “Suppression of Mitochondrial Oxidative Stress Provides Long-Term Neuroprotection in Experimental Optic Neuritis.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (2): 681–91.

Quandt, Jacqueline A., Mirza Baig, Karen Yao, Kazuyuki Kawamura, Jaebong Huh, Samuel K. Ludwin, Hong-Jin Bian, et al. 2004. “Unique Clinical and Pathological Features in HLA-DRB1\*0401–restricted MBP 111–129–specific Humanized TCR Transgenic Mice.” *The Journal of Experimental Medicine* 200 (2): 223–34.

Quandt, Jacqueline A., Jaebong Huh, Mirza Baig, Karen Yao, Naoko Ito, Mark Bryant, Kazuyuki Kawamura, et al. 2012. “Myelin Basic Protein-Specific TCR/HLA-DRB5\*01:01 Transgenic Mice Support the Etiologic Role of DRB5\*01:01 in Multiple Sclerosis.” *Journal of Immunology* 189 (6): 2897–2908.

Ramagopalan, Sreeram V., Ruth Dobson, Ute C. Meier, and Gavin Giovannoni. 2010. “Multiple Sclerosis: Risk Factors, Prodromes, and Potential Causal Pathways.” *Lancet Neurology* 9 (7): 727–39.

Redford, E. J., R. Kapoor, and K. J. Smith. 1997. “Nitric Oxide Donors Reversibly Block Axonal Conduction: Demyelinated Axons Are Especially Susceptible.” *Brain: A Journal of Neurology* 120 ( Pt 12) (December): 2149–57.

Reich, Daniel S., Claudia F. Lucchinetti, and Peter A. Calabresi. 2018. “Multiple Sclerosis.” *The New England Journal of Medicine* 378 (2): 169–80.

- Rivers, T. M., D. H. Sprunt, and G. P. Berry. 1933. "OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS." *The Journal of Experimental Medicine* 58 (1): 39–53.
- Rossi, Barbara, and Gabriela Constantin. 2016. "Live Imaging of Immune Responses in Experimental Models of Multiple Sclerosis." *Frontiers in Immunology* 7 (November): 506.
- Rossi, Silvia, Valentina De Chiara, Roberto Furlan, Alessandra Musella, Francesca Cavasinni, Luca Muzio, Giorgio Bernardi, Gianvito Martino, and Diego Centonze. 2010. "Abnormal Activity of the Na/Ca Exchanger Enhances Glutamate Transmission in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (8): 1379–85.
- Saab, Aiman S., Iva D. Tzvetavona, Andrea Trevisiol, Selva Baltan, Payam Dibaj, Kathrin Kusch, Wiebke Möbius, et al. 2016. "Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism." *Neuron* 91 (1): 119–32.
- Salou, Marion, Bryan Nicol, Alexandra Garcia, and David-Axel Laplaud. 2015. "Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis." *Frontiers in Immunology* 6 (November): 604.
- Sarchielli, Paola, Laura Greco, Ardesio Floridi, Alessandro Floridi, and Virgilio Gallai. 2003a. "Excitatory Amino Acids and Multiple Sclerosis: Evidence from Cerebrospinal Fluid." *Archives of Neurology* 60 (8): 1082–88.
- Sasaki, Takuya, Norio Matsuki, and Yuji Ikegaya. 2011. "Action-Potential Modulation during Axonal Conduction." *Science* 331 (6017): 599–601.
- Schirmer, Lucas, Rajneesh Srivastava, and Bernhard Hemmer. 2014. "To Look for a Needle in a Haystack: The Search for Autoantibodies in Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis* 20 (3): 271–79.
- Schlaeger, Regina, Nico Papinutto, Alyssa H. Zhu, Iryna V. Lobach, Carolyn J. Bevan, Monica Bucci, Antonella Castellano, et al. 2015. "Association Between Thoracic Spinal Cord Gray Matter Atrophy and Disability in Multiple Sclerosis." *JAMA Neurology* 72 (8): 897–904.
- Schumacher, Adrian-Minh, Christoph Mahler, and Martin Kerschensteiner. 2017. "Pathologie Und Pathogenese Der Progredienten Multiplen Sklerose: Konzepte Und Kontroversen." *Aktuelle Neurologie* 44 (07): 476–88.
- Schwaller, B. 2010. "Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Buffers." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11): a004051–a004051.
- Scott, Thomas F. 2017. "Understanding the Impact of Relapses in the Overall Course of MS; Refinement of the 2 Stage Natural History Model." *Journal of*

- Neuroimmunology 305 (April): 162–66.
- Sedal, L., I. B. Wilson, and E. A. McDonald. 2014. “Current Management of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis.” *Internal Medicine Journal* 44 (10): 950–57.
- Sedel, Frédéric, Delphine Bernard, Donald M. Mock, and Ayman Tourbah. 2016. “Targeting Demyelination and Virtual Hypoxia with High-Dose Biotin as a Treatment for Progressive Multiple Sclerosis.” *Neuropharmacology* 110 (Pt B): 644–53.
- Sendelbeck, S. L., and J. Urquhart. 1985. “Spatial Distribution of Dopamine, Methotrexate and Antipyrine during Continuous Intracerebral Microperfusion.” *Brain Research* 328 (2): 251–58.
- Sherriff, F. E., L. R. Bridges, and S. Sivaloganathan. 1994. “Early Detection of Axonal Injury after Human Head Trauma Using Immunocytochemistry for Beta-Amyloid Precursor Protein.” *Acta Neuropathologica* 87 (1): 55–62.
- Shih, Andy Y., Sophie Imbeault, Vilte Barakauskas, Heidi Erb, Lei Jiang, Ping Li, and Timothy H. Murphy. 2005. “Induction of the Nrf2-Driven Antioxidant Response Confers Neuroprotection during Mitochondrial Stress in Vivo.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (24): 22925–36.
- Shimomura, Osamu, Frank H. Johnson, and Yo Saiga. 1962. “Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, Aequorea.” *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (3): 223–39.
- Siffrin, Volker, Helena Radbruch, Robert Glumm, Raluca Niesner, Magdalena Paterka, Josephine Herz, Tina Leuenberger, et al. 2010a. “In Vivo Imaging of Partially Reversible th17 Cell-Induced Neuronal Dysfunction in the Course of Encephalomyelitis.” *Immunity* 33 (3): 424–36.
- Simons, Mikael, Thomas Misgeld, and Martin Kerschensteiner. 2014. “A Unified Cell Biological Perspective on Axon–myelin Injury.” *The Journal of Cell Biology* 206 (3): 335–45.
- Simpson, Steve, Jr, Leigh Blizzard, Petr Otahal, Ingrid Van der Mei, and Bruce Taylor. 2011. “Latitude Is Significantly Associated with the Prevalence of Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis.” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 82 (10): 1132–41.
- Simpson, Steve, Bruce Taylor, Leigh Blizzard, Anne-Louise Ponsonby, Fotini Pittas, Helen Tremlett, Terence Dwyer, Peter Gies, and Ingrid van der Mei. 2010. “Higher 25-Hydroxyvitamin D Is Associated with Lower Relapse Risk in MS.” *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.22043>.
- Singh, Shailender, Tobias Dallenga, Anne Winkler, Shanu Roemer, Brigitte Maruschak,



- Heike Siebert, Wolfgang Brück, and Christine Stadelmann. 2017. "Relationship of Acute Axonal Damage, Wallerian Degeneration, and Clinical Disability in Multiple Sclerosis." *Journal of Neuroinflammation* 14 (1): 57.
- Smith, Kenneth J., and Hans Lassmann. 2002. "The Role of Nitric Oxide in Multiple Sclerosis." *Lancet Neurology* 1 (4): 232–41.
- Smith, T., A. Groom, B. Zhu, and L. Turski. 2000. "Autoimmune Encephalomyelitis Ameliorated by AMPA Antagonists." *Nature Medicine* 6 (1): 62–66.
- Sorbara, Catherine Diamante, Naomi Elizabeth Wagner, Anne Ladwig, Ivana Nikić, Doron Merkler, Tatjana Kleele, Petar Marinković, et al. 2014a. "Pervasive Axonal Transport Deficits in Multiple Sclerosis Models." *Neuron* 84 (6): 1183–90.
- Soulika, Athena M., Eunyoung Lee, Erica McCauley, Laird Miers, Peter Bannerman, and David Pleasure. 2009. "Initiation and Progression of Axonopathy in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (47): 14965–79.
- Stark, G. 2005. "Functional Consequences of Oxidative Membrane Damage." *The Journal of Membrane Biology* 205 (1): 1–16.
- Steenwijk, Martijn D., Jeroen J. G. Geurts, Marita Daams, Betty M. Tijms, Alle Meije Wink, Lisanne J. Balk, Prejaas K. Tewarie, et al. 2016. "Cortical Atrophy Patterns in Multiple Sclerosis Are Non-Random and Clinically Relevant." *Brain: A Journal of Neurology* 139 (Pt 1): 115–26.
- Steri, Maristella, Valeria Orrù, M. Laura Idda, Maristella Pitzalis, Mauro Pala, Ilenia Zara, Carlo Sidore, et al. 2017. "Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk." *The New England Journal of Medicine* 376 (17): 1615–26.
- Stirling, David P., Karen Cummins, S. R. Wayne Chen, and Peter Stys. 2014. "Axoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release Causes Secondary Degeneration of Spinal Axons." *Annals of Neurology* 75 (2): 220–29.
- Stirling, David P., and Peter K. Stys. 2010. "Mechanisms of Axonal Injury: Internodal Nanocomplexes and Calcium Deregulation." *Trends in Molecular Medicine* 16 (4): 160–70.
- Stys, Peter K., and Stephen G. Waxman. 2005. "Molecular Mechanisms of Calcium Influx in Axonal Degeneration." In *Multiple Sclerosis As A Neuronal Disease*, 275–92.
- Stys, P. K., and R. M. Lopachin. 1998. "Mechanisms of Calcium and Sodium Fluxes in Anoxic Myelinated Central Nervous System Axons." *Neuroscience* 82 (1): 21–32.
- Stys, P. K., S. G. Waxman, and B. R. Ransom. 1991. "Reverse Operation of the Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger Mediates Ca<sup>2+</sup> Influx during Anoxia in Mammalian CNS White Matter." *Annals of the New York Academy of Sciences* 639: 328–32.

- Stys, P. K., S. G. Waxman, and B. R. Ransom. 1992. "Ionic Mechanisms of Anoxic Injury in Mammalian CNS White Matter: Role of Na<sup>+</sup> Channels and Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 12 (2): 430–39.
- Sulkowski, Grzegorz, Beata Dąbrowska-Bouta, Elżbieta Salińska, and Lidia Strużyńska. 2014. "Modulation of Glutamate Transport and Receptor Binding by Glutamate Receptor Antagonists in EAE Rat Brain." *PloS One* 9 (11): e113954.
- Széles, Lajos, Gábor Keresztes, Dániel Töröcsik, Zoltán Balajthy, László Krenács, Szilárd Póliska, Andreas Steinmeyer, et al. 2009. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is an Autonomous Regulator of the Transcriptional Changes Leading to a Tolerogenic Dendritic Cell Phenotype." *Journal of Immunology* 182 (4): 2074–83.
- Takadera, Tsuneo, Megumi Ohtsuka, and Haruka Aoki. 2010. "Chelation of Extracellular Calcium-Induced Cell Death Was Prevented by Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitors in PC12 Cells." *Cellular and Molecular Neurobiology* 30 (2): 193–98.
- Thakurela, Sudhir, Angela Garding, Ramona B. Jung, Christina Müller, Sandra Goebels, Robin White, Hauke B. Werner, and Vijay K. Tiwari. 2016. "The Transcriptome of Mouse Central Nervous System Myelin." *Scientific Reports* 6 (May): 25828.
- Theeuwes, F., and S. I. Yum. 1976. "Principles of the Design and Operation of Generic Osmotic Pumps for the Delivery of Semisolid or Liquid Drug Formulations." *Annals of Biomedical Engineering* 4 (4): 343–53.
- Thompson, Alan J., Brenda L. Banwell, Frederik Barkhof, William M. Carroll, Timothy Coetzee, Giancarlo Comi, Jorge Correale, et al. 2017. "Diagnosis of Multiple Sclerosis: 2017 Revisions of the McDonald Criteria." *Lancet Neurology*, December. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2).
- Tizaoui, Kalthoum. 2017. "Multiple Sclerosis Genetics: Results from Meta-Analyses of Candidate-Gene Association Studies." *Cytokine*, November. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.024>.
- Tomes, Daniel J., and Sandeep K. Agrawal. 2002. "Role of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger after Traumatic or Hypoxic/ischemic Injury to Spinal Cord White Matter." *The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society* 2 (1): 35–40.
- Tourbah, Ayman, Christine Lebrun-Frenay, Gilles Edan, Michel Clanet, Caroline Papeix, Sandra Vukusic, Jerome De Sèze, et al. 2016. "MD1003 (high-Dose Biotin) for the Treatment of Progressive Multiple Sclerosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study." *Multiple Sclerosis* 22 (13): 1719–31.

- Trapp, B. D., J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mörk, and L. Bö. 1998. "Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis." *The New England Journal of Medicine* 338 (5): 278–85.
- Trifunovic, Aleksandra, Anna Wredenberg, Maria Falkenberg, Johannes N. Spelbrink, Anja T. Rovio, Carl E. Bruder, Mohammad Bohlooly-Y, et al. 2004. "Premature Ageing in Mice Expressing Defective Mitochondrial DNA Polymerase." *Nature* 429 (6990): 417–23.
- Tur, Carmen, and Xavier Montalban. 2017. "Progressive MS Trials: Lessons Learned." *Multiple Sclerosis* 23 (12): 1583–92.
- Uchihara, Toshiki. 2007. "Silver Diagnosis in Neuropathology: Principles, Practice and Revised Interpretation." *Acta Neuropathologica* 113 (5): 483–99.
- Vallejo-Illarramendi, Ainara, María Domercq, Fernando Pérez-Cerdá, Rivka Ravid, and Carlos Matute. 2006. "Increased Expression and Function of Glutamate Transporters in Multiple Sclerosis." *Neurobiology of Disease* 21 (1): 154–64.
- Vergo, Sandra, Matthew J. Craner, Ruth Etzensperger, Kathrine Attfield, Manuel A. Friese, Jia Newcombe, Margaret Esiri, and Lars Fugger. 2011. "Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Involved in Both Axonal Injury and Demyelination in Multiple Sclerosis and Its Animal Model." *Brain: A Journal of Neurology* 134 (Pt 2): 571–84.
- Wakatsuki, Shuji, Fuminori Saitoh, and Toshiyuki Araki. 2011. "ZNR1 Promotes Wallerian Degeneration by Degrading AKT to Induce GSK3B-Dependent CRMP2 Phosphorylation." *Nature Cell Biology* 13 (12): 1415–23.
- Wallström, Erik, Per Diener, Åke Ljungdahl, Mohsen Khademi, Carl-Gustaf Nilsson, and Tomas Olsson. 1996. "Memantine Abrogates Neurological Deficits, but Not CNS Inflammation, in Lewis Rat Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of the Neurological Sciences* 137 (2): 89–96.
- Wang, Jack T., Zachary A. Medress, and Ben A. Barres. 2012. "Axon Degeneration: Molecular Mechanisms of a Self-Destruction Pathway." *The Journal of Cell Biology* 196 (1): 7–18.
- Watson, G., J. Bastacky, P. Belichenko, M. Buddhikot, S. Jungles, M. Vellard, W. C. Mobley, and E. Kakkis. 2006a. "Intrathecal Administration of AAV Vectors for the Treatment of Lysosomal Storage in the Brains of MPS I Mice." *Gene Therapy* 13 (11): 917–25.
- Waubant, Emmanuelle, Amir-Hadi Maghzi, Nisha Revirajan, Rebecca Spain, Laura Julian, Ellen M. Mowry, Jacqueline Marcus, et al. 2014. "A Randomized Controlled Phase II Trial of Riluzole in Early Multiple Sclerosis." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 1 (5): 340–47.

- Weinshenker, B. G., D. Bulman, W. Carriere, J. Baskerville, and G. C. Ebers. 1990. "A Comparison of Sporadic and Familial Multiple Sclerosis." *Neurology* 40 (9): 1354–1354.
- Wei - Proceedings of the Society for Experimental, Y. H., and 1998. 1998. "Oxidative Stress and Mitochondrial DNA Mutations in Human Aging." *Journals.sagepub.com*. <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-217-44205>.
- Werner, H., M. Jung, M. Klugmann, M. Sereda, I. R. Griffiths, and K. A. Nave. 1998. "Mouse Models of Myelin Diseases." *Brain Pathology* 8 (4): 771–93.
- Werner, P., D. Pitt, and C. S. Raine. 2000. "Glutamate Excitotoxicity--a Mechanism for Axonal Damage and Oligodendrocyte Death in Multiple Sclerosis?" *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, no. 60: 375–85.
- Wilkins, Alastair, and Alastair Compston. 2005. "Trophic Factors Attenuate Nitric Oxide Mediated Neuronal and Axonal Injury in Vitro: Roles and Interactions of Mitogen-Activated Protein Kinase Signalling Pathways." *Journal of Neurochemistry* 92 (6): 1487–96.
- Williams, K. A., D. N. Hart, J. W. Fabre, and P. J. Morris. 1980. "Distribution and Quantitation of HLA-ABC and DR (Ia) Antigens on Human Kidney and Other Tissues." *Transplantation* 29 (4): 274–79.
- Williams, Philip R., Bogdan-Nicolae Marincu, Catherine D. Sorbara, Christoph F. Mahler, Adrian-Minh Schumacher, Oliver Griesbeck, Martin Kerschensteiner, and Thomas Misgeld. 2014. "A Recoverable State of Axon Injury Persists for Hours after Spinal Cord Contusion in Vivo." *Nature Communications* 5 (December): 5683.
- Witte, Maarten E., Lars Bø, Richard J. Rodenburg, Jeroen A. Belien, Rene Musters, Thierry Hazes, Liesbeth T. Wintjes, et al. 2009. "Enhanced Number and Activity of Mitochondria in Multiple Sclerosis Lesions." *The Journal of Pathology* 219 (2): 193–204.
- Witte, Maarten E., Jeroen J. G. Geurts, Helga E. de Vries, Paul van der Valk, and Jack van Horssen. 2010. "Mitochondrial Dysfunction: A Potential Link between Neuroinflammation and Neurodegeneration?" *Mitochondrion* 10 (5): 411–18.
- Witte, Maarten E., Don J. Mahad, Hans Lassmann, and Jack van Horssen. 2014. "Mitochondrial Dysfunction Contributes to Neurodegeneration in Multiple Sclerosis." *Trends in Molecular Medicine* 20 (3): 179–87.
- Wundes, Annette, James D. Bowen, George H. Kraft, Kenneth R. Maravilla, Bernadette McLaughlin, Gloria von Geldern, George Georges, Richard A. Nash, and Jian-Qiang Lu. 2017. "Brain Pathology of a Patient 7years after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis." *Journal of the*

Neurological Sciences 373 (February): 339–41.

- Yaroslavsky, A. N., P. C. Schulze, I. V. Yaroslavsky, R. Schober, F. Ulrich, and H. J. Schwarzmaier. 2002. “Optical Properties of Selected Native and Coagulated Human Brain Tissues in Vitro in the Visible and near Infrared Spectral Range.” *Physics in Medicine and Biology* 47 (12): 2059–73.
- Yednock, Ted A., Catherine Cannon, Lawrence C. Fritz, Francisco Sanchez-Madrid, Lawrence Steinman, and Nathan Karin. 1992. “Prevention of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Antibodies against  $\alpha 4\beta 1$  Integrin.” *Nature* 356 (6364): 63–66.
- Yermolaieva, Olena, A. Soren Leonard, Mikael K. Schnizler, Francois M. Abboud, and Michael J. Welsh. 2004. “Extracellular Acidosis Increases Neuronal Cell Calcium by Activating Acid-Sensing Ion Channel 1a.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17): 6752–57.
- Zaleska, M. M., and D. F. Wilson. 1989. “Lipid Hydroperoxides Inhibit Reacylation of Phospholipids in Neuronal Membranes.” *Journal of Neurochemistry* 52 (1): 255–60.
- Zeis, Thomas, Alfonse Probst, Andreas Johann Steck, Christine Stadelmann, Wolfgang Brück, and Nicole Schaeren-Wiemers. 2009. “Molecular Changes in White Matter Adjacent to an Active Demyelinating Lesion in Early Multiple Sclerosis.” *Brain Pathology* 19 (3): 459–66.



## Kapitel 10: Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Christoph Mahler, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Mechanismen axonaler Kalziumdynamiken im Tiermodell der Multiplen Sklerose

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

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

München, den 30.05.2018

.....

Christoph Mahler

## Kapitel 11: Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner für die Überlassung des Themas und die unermüdliche, aufopferungsvolle und exzellente Betreuung danken. Durch seine Begeisterung für die neuroimmunologische Forschung und den stets wohlabgewogenen Rat ermöglichte er mir unter besten Bedingungen den Einstieg in die Neuroimmunologie.

Mein uneingeschränkter Dank gebührt Prof. Dr. med. Thomas Misgeld (TUM) für die hervorragende Mitbetreuung des Projekts, die fortwährende Unterstützung sowie die bedingungslose und großzügige Bereitstellung von Räumlichkeiten und aufwendigsten Untersuchungsgeräten.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinen Mitarbeitern am Institut für klinische Neuroimmunologie für die wertvollen Ratschläge und Unterstützung bei meinen Experimenten, in erster Linie bei meinem Kollegen Dr. med. Minh Schumacher, dem ich zahlreiche Anregungen verdanke, der mich in die verwendeten Methoden einwies und wichtige Vorarbeiten zu diesem Projekt leistete.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden meinen Dank für die Förderung und Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg und das Gegenlesen der vorliegenden Arbeit aussprechen. Ihr habt mich immer unterstützt und mir mein Studium und diese Dissertation erst ermöglicht.

## Kapitel 12: Lebenslauf

Name: Christoph Friedrich Mahler

Geburtsdatum/-ort: 12.11.1988, Stuttgart

### Schulbildung und Hochschulstudium

06/2008 Allgemeine Hochschulreife, Parler Gymnasium Schwäbisch Gmünd

10/2008-10/2015 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität

11/2015 Ärztliche Prüfung und Approbation

### Praktisches Jahr

11/2014-3/2015 Erstes Tertial (Chirurgie) des Praktischen Jahres: Chirurgische Klinik Innenstadt Nussbaumstraße (Universitätsklinikum LMU München)

03/2015-5/2015 Zweites Tertial (Innere Medizin) des Praktischen Jahres: erste Hälfte am Weill Cornell Medical College, New York City, USA

05/2015-7/2015 Zweites Tertial (Innere Medizin) des Praktischen Jahres: zweite Hälfte am University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, USA

07/2015-10/2015 Drittes Tertial (Wahlfach) des Praktischen Jahres: Neurologie am National Hospital for Neurology and Neurosurgery, University College London, London, GB

### Klinische Weiterbildung

Seit 01/2016 Assistenzarzt in der Facharztweiterbildung am Institut für klinische Neuroimmunologie, Universitätsklinikum der LMU, München

### Stipendium

03/2009-11/2015 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

### Wissenschaftliche Tätigkeit

Seit 3/2011 Doktorarbeit am Institut für klinische Neuroimmunologie bei Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner; Thema: Mechanismen axonaler Kalziumdynamiken im Tiermodell der Multiplen Sklerose

## Publikationen

- Mahler, Christoph\***; Witte, Maarten\*; Schumacher, Adrian-Minh\*; Bewersdorf, Jan P.; Lehmitz, Jonas; Scheiter, Alexander; Williams, Philip R.; Griesbeck, Oliver; Naumann, Ronald; Misgeld, Thomas; Kerschensteiner, Martin. Calcium influx through plasma-membrane nanoruptures drives axon degeneration in a model of multiple sclerosis. \*These authors contributed equally to this work, order of Shared first authors inverted (Manuscript under review at Neuron - Cell Press, Manuscript number: NEURON-D-18-00832)
- Deussing, Maximilian, Tanja Blume, Lena Vomacka, **Christoph Mahler**, Carola Focke, Andrei Todica, Marcus Unterrainer, et al. 2018. "Coupling between Physiological TSPO Expression in Brain and Myocardium Allows Stabilization of Late-Phase Cerebral [F]GE180 PET Quantification." *NeuroImage* 165 (January): 83–91.
- Schumacher, Adrian-Minh, **Christoph Mahler**, and Martin Kerschensteiner. 2017a. "Pathologie Und Pathogenese Der Progredienten Multiplen Sklerose: Konzepte Und Kontroversen." *Aktuelle Neurologie* 44 (07): 476–88.
- Schumacher, Adrian-Minh, **Christoph Mahler**, and Martin Kerschensteiner. 2017b. "Pathology and Pathogenesis of Progressive Multiple Sclerosis: Concepts and Controversies." *Neurology International Open* 01 (03): E171–81.
- Unterrainer, Marcus, **C. Mahler**, L. Vomacka, S. Lindner, J. Havla, M. Brendel, G. Böning, et al. 2018. "TSPO PET with [F]GE-180 Sensitive Detects Focal Neuroinflammation in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, March. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-3974-7>.
- Vomacka, Lena, Nathalie Lisa Albert, Simon Lindner, Marcus Unterrainer, **Christoph Mahler**, Matthias Brendel, Larissa Ermoschkin, et al. 2017. "TSPO Imaging Using the Novel PET Ligand [F]GE-180: Quantification Approaches in Patients with Multiple Sclerosis." *EJNMMI Research* 7 (1): 89.
- Williams, Philip R., Bogdan-Nicolae Marincu, Catherine D. Sorbara, **Christoph Mahler**, Adrian-Minh Schumacher, Oliver Griesbeck, Martin Kerschensteiner, and Thomas Misgeld. 2014. "A Recoverable State of Axon Injury Persists for Hours after Spinal Cord Contusion in Vivo." *Nature Communications* 5 (December): 5683.

München, den 31.05.2018