Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

## Zytoprotektive Wirkung von Laquinimod in einem neuen Multiple Sklerose-Mausmodell

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Philipp Alexander Riedler

aus

Melbourne

2022

# Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Martin Kerschensteiner Prof. Dr. Frank Weber
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Tanja Hochstrasser
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	07.04.2022

## I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	
II. Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1. Multiple Sklerose	7
1.2. Laquinimod	10
1.3. Dendriten und ihre Dornenfortsätze (engl. Spines)	11
1.4. Verwendete Tiermodelle	13
1.4.1. Das Cuprizone-Modell (Cup)	13
1.4.2. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	14
1.4.3. Das Cup/EAE-Modell	15
1.5. Arbeitshypothesen	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Versuchstiere	18
2.2. Versuchsaufbau und -durchführung	18
2.3. Materialgewinnung für die HE-Färbung/Immunhistochemie	20
2.4. Färbungen	21
2.4.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	21
2.4.2. Immunhistochemische Färbungen (IHC)	22
2.4.3. Golgi-Färbung	27
2.5. Methoden der Auswertung	30
2.6. Anhang	36
2.6.1. Puffer-, Serum-, Perfusions- und Färbelösungen (SOPs)	36
2.6.2. Chemikalien und Materialien	37
3. Ergebnisse	43
3.1. Verminderte Astrogliose im Corpus callosum von	
Laquinimod-behandelten Mäusen	43
3.2. Laquinimod hemmt sekundäre Rekrutierung von Immunzellen	
ins Großhirn im Cup/EAE-Modell	48
3.3. Histopathologische Eigenschaften eines perivaskulären Infiltrats (PVCs	) 51
3.4. Protektion von dendritischen Dornenfortsätzen durch	
Laquinimod im Cup/EAE-Modell	52
4. Diskussion	55
4.1. Mausmodelle zur Erforschung der Multiplen Sklerose	55
4.2. Hemmung der Astrozyten-Aktivierung durch Laquinimod	56

4.3. Protektive Wirkung von Laquinimod und sekundäre Hemmung der	
Immunzellrekrutierung	58
4.4. Wirkung von Laquinimod auf dendritische Dornenfortsätze	59
4.5. Immunmodulatorische, neuroprotektive und neurorestaurative	
Wirkungen von Laquinimod	60
5. Zusammenfassung	
III. Abbildungsverzeichnis	
IV. Tabellenverzeichnis	
V. Literaturverzeichnis	
VI. Eidesstattliche Versicherung	
VII. Danksagung	
VIII. Publikationsliste	

### II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
§	Paragraf
%	Prozent
AK	Antikörper
ALDH1L1	Aldehyd-Dehydrogenase-1-Familie, Typ L1
Aqua dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BLBP	brain lipid binding protein
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD4	cluster of differentiation 4
Сир	Cuprizone
Cup/EAE	(Kombination) Cuprizone und experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
DAB	Diaminobenzidin
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
engl.	englisch
et al.	et alia
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	heat induced epitope retrieval
IHC	Immunhistochemie
I	Liter
Laq	Laquinimod
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PPMS	primär progrediente Multiple Sklerose (engl. primary-progressive MS)
PVC	perivaskuläres Infiltrat (engl. perivascular cuff)
R215	Region 215 (nach Sidman et al., 1971)
R265	Region 265 (nach Sidman et al., 1971)
ROI	region of interest

RRMS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose (engl. relapsing-remitting MS)
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler (engl. standard error of the mean)
SPMS	sekundär progrediente Multiple Sklerose (engl. secondary-progressive MS)
Tris-EDTA	Triethanolamin-Ethylendiamintetraessigsäure
u.a.	unter anderem/n
Veh	vehicle
ZNS	Zentralnervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

#### 1. Einleitung

#### **1.1. Multiple Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS), auch Encephalomyelitis disseminata (ED) genannt, ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) und wird zu den Autoimmunerkrankungen gezählt. Weltweit sind schätzungsweise mehr als 2,5 Millionen Menschen erkrankt (Runia, van Pelt-Gravesteijn, & Hintzen, 2012). Frauen sind häufiger betroffen als Männer (~1.6:1) und das Manifestationsalter der Erkrankung liegt meist zwischen dem 20. Und 40. Lebensjahr (Keegan & Noseworthy, 2002; Nicholas & Rashid, 2013). Die Verbreitung entlang der Breitengrade der nördlichen und südlichen Hemisphären nimmt mit der Entfernung vom Äquator zu, wobei hauptsächlich Nordeuropäer und Nordamerikaner erkrankt sind (Keegan & Noseworthy, 2002). Dort handelt es sich um die häufigste neurologische Erkrankung bei jungen Erwachsenen.

Es wird klinisch zwischen drei verschiedenen Verlaufsformen unterschieden: schubförmigremittierende MS (RRMS), primär-progrediente MS (PPMS) und sekundär-progrediente MS (SPMS). Bei der RRMS handelt es sich um die häufigste Form mit rund 85% der Erstdiagnosen, die PPMS hat einen Anteil von rund 15% (Keegan & Noseworthy, 2002). Bei der RRMS kommt es zum Auftreten von neurologischen Defiziten in Form von Schüben, die sich vollständig oder unvollständig zurückbilden. Diese können sich - je nach Lokalisation im ZNS beispielsweise als Sehstörungen, Sensibilitätsstörungen, -Paresen oder Zwischen Koordinationsstörungen manifestieren. den Schüben wird keine Behinderungsprogression beobachtet. Hier unterscheidet sich die RRMS von der PPMS, bei welcher anstatt von Schüben eine stetige Progression der Symptomatik stattfindet. Die SPMS ist eine progrediente Form der Multiplen Sklerose, die definitionsgemäß aus einer RRMS entsteht. Werden die Diagnosekriterien der MS bei Vorliegen einer klinischen, MStypischen Symptomatik (wie z.B. einer Optikusneuritis) nicht erfüllt, so spricht man von einem klinisch-isolierten Syndrom (KIS). Hieraus entwickelt sich häufig das Vollbild einer Multiplen Sklerose. Im Verlauf der Erkrankung sind eine ZNS-Atrophie sowie klinisch eine Behinderungsprogression zu beobachten, welche mittels des sogenannten "Expanded Disability Status Scale (EDSS)" erfasst wird. Diese beschreibt den Schweregrad der Behinderung in Hinblick auf die Gehstrecke und in acht Funktionssystemen und reicht von 0 (keine neurologischen Defizite) bis 10 (Tod durch MS)(Kurtzke, 1983, 2015).

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie der Multiplen Sklerose weiterhin nicht ausreichend geklärt und die Erkrankung somit nicht heilbar. Es wird vermutet, dass eine Gen-Umwelt-Interaktion mit speziellem Lebensstil zur Entstehung der MS beiträgt. Eine Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion, Tabak in Form von Rauchen, niedrige Vitamin-D Spiegel und der Mangel an UV-Exposition zählen zu den gut untersuchten und etablierten Risikofaktoren. Außerdem wurde gezeigt, dass auch organische Lösungsmittel, Schichtarbeit und Adipositas in der Adoleszenz das Risiko erhöhen. Zytomegalievirus-Infektionen und der Konsum von Oraltabak, Alkohol und Kaffee sind mit einem erniedrigten Risiko assoziiert (Marrie, 2004; Olsson, Barcellos, & Alfredsson, 2017). Die Identifizierung weiterer Risikofaktoren ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

Auch genetischen Faktoren scheinen eine wesentliche Rolle in der Krankheitsentstehung zu spielen. So kommt hierbei beispielsweise der HLA-Region des Chromosoms 6, wie bei vielen Autoimmunerkrankungen, eine besondere Bedeutung zu (Shiina, Inoko, & Kulski, 2004). Die MS ist mit dem Serotyp HLA-DR2 assoziiert (Jersild, Svejgaard, & Fog, 1972). Träger des HLA DRB1\*15:01 Allels haben ein etwa 3-fach erhöhtes Risiko an Multiple Sklerose zu erkranken als Nicht-Träger (Patsopoulos et al., 2013). Die Konkordanz für MS bei eineiigen Zwillingen beträgt 25-30%, bei zweieiigen Zwillingen 3-5% (Keegan & Noseworthy, 2002).

Die Erkrankung betrifft sowohl die weiße als auch die graue Substanz des ZNS (Di Filippo, Portaccio, Mancini, & Calabresi, 2018; Kipp, van der Valk, & Amor, 2012; Schmierer et al., 2018). Eine ZNS-Invasion autoreaktiver, peripherer T-Lymphozyten zählt zu den wesentlichen Pathologien (Harting, Sellner, Meyding-Lamadé, & Sartor, 2003). Auf histopathologischer Ebene kommt es neben einer Störung der Blut-Hirn-Schranke zu Inflammation, De- und Remyelinisierung, Untergang von Oligodendrozyten, axonalem Schaden und reaktiver Gliose (Dutta & Trapp, 2014). Prädilektionsstellen der Läsionen sind das Rückenmark, das Kleinhirn, der Hirnstamm, das periventrikuläre Marklager sowie die Mark-Rinden-Grenze (Harting et al., 2003).

Der genaue Pathomechanismus der Multiplen Sklerose ist noch nicht ausreichend verstanden. Zur Entstehung der Erkrankung gibt es zwei verschiedene Theorien. Einerseits das sogenannte "outside-in"-Modell, andererseits das "inside-out"-Modell (siehe Abbildung 1). Laut dem "outside-in"-Modell handelt es sich um eine klassische Autoimmunerkrankung, bei welcher aufgrund einer Dysregulation des Immunsystems Immunzellen in das ZNS gelangen und dort die MS-typischen Pathologien hervorrufen (C. Lucchinetti et al., 2000; C. F. Lucchinetti et al., 2011; Reich, Lucchinetti, & Calabresi, 2018). Dem gegenüber steht das "inside-out"-Modell für eine primär-neurodegenerative Erkrankung, welche durch ZNSintrinsische Vorgänge ausgelöst wird und sekundär die Rekrutierung peripherer Immunzellen in das Hirnparenchym bewirkt (Barnett & Prineas, 2004; Geurts, Kooi, Witte, & van der Valk, 2010; Nedelcu et al., 2020; Rüther et al., 2017; Scheld et al., 2016). In der Literatur wird meist von einer neurodegenerativen Erkrankung gesprochen, was allerdings genau genommen nur einen Teilaspekt der Pathologie beschreibt. Von der Degeneration sind nicht nur Neurone, sondern auch Gliazellen (Oligodendrozyten) betroffen. Folglich ist der Begriff "Zytodegeneration" passender. Aufgrund der Einheitlichkeit verwende ich in meiner Promotionsarbeit von nun an jedoch auch die Bezeichnung "Neurodegeneration".

8

Wesentlich für die Diagnosestellung der Multiplen Sklerose ist neben der klinischen Symptomatik die Bildgebung mittels kranialer und spinaler Magnetresonanztomographie zur Identifikation der Läsionen. Die Liquordiagnostik mit intrathekaler Immunglobulinsynthese (oligoklonale Banden) sowie elektrophysiologische Untersuchungen mit evozierten Potentialen werden ebenso eingesetzt (Brownlee, Hardy, Fazekas, & Miller, 2017).

Genaue Kenntnisse hinsichtlich der Ätiologie und Pathophysiologie der MS wären erforderlich, um eine kurative Therapie zu ermöglichen. Derzeit unterscheidet man lediglich zwischen der Schubtherapie, verlaufsmodifizierender und symptomatischer Therapie. Kernelement der Schubtherapie ist das synthetische Glukokortikoid Methylprednisolon. Im Verlauf werden Immunmodulatoren, Immunsuppressiva und Antikörper eingesetzt. Zur Behandlung der RRMS sind derzeit bei einem moderaten Verlauf u.a. Substanzen wie Interferon- $\beta$ , Glatirameracetat, Teriflunomid und Dimethylfumarat in der Europäischen Union zugelassen. Bei hochaktivem Verlauf stehen Präparate wie Fingolimod, Natalizumab oder Ocrelizumab zur Verfügung. Die SPMS kann mit Mitoxantron und Siponimod, die PPMS mit Ocrelizumab behandelt werden (Behrangi, Fischbach, & Kipp, 2019; Graf, Albrecht, Goebels, Aktas, & Hartung, 2020; Hart & Bainbridge, 2016; Scott, 2020). Im Vergleich zu der RRMS sind bei der SPMS und der PPMS somit zurzeit noch wenig zufriedenstellende Therapieoptionen verfügbar. Ergänzend wird den Patienten neben einer Physio-, Ergo- und Psychotherapie auch beispielsweise eine antispastische Therapie mit Baclofen, Tizanidin oder Cannabinoide angeboten (Otero-Romero et al., 2016).



**Abbildung 1:** Zwei wesentliche Theorien zur Pathophysiologie der MS. Beim "inside-out"-Modell handelt es sich bei der Multiplen Sklerose um eine primär-zytodegenerative Erkrankung, welche durch ZNS-intrinsische Vorgänge ausgelöst wird und sekundär die Rekrutierung peripherer Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke in das Hirnparenchym bewirkt. Das "outside-in"-Modell beschreibt eine klassische Autoimmunerkrankung, bei welcher aufgrund einer Dysregulation des Immunsystems Immunzellen in das ZNS gelangen und dort die MS-typischen Pathologien hervorrufen.

#### 1.2. Laquinimod

Laquinimod, auch "ABR-215062" genannt, ist ein oral-applizierbarer Immunmodulator und stellt chemisch ein Quinolon-3-Carboxamid-Derivat dar (siehe Abbildung 2). Laquinimod wurde von den Pharmaunternehmen Teva Pharmaceutical Industries Limited und Active Biotech entwickelt und ist der Nachfolger des von Active Biotech produzierten Präparats Linomid (Roquinimex). Im Vergleich zu Linomid, bei welchem über schwere Nebenwirkungen berichtet wurde, zeigte Laquinimod in Studien ein deutlich besseres Nutzen-Risiko-Verhältnis (Thöne & Gold, 2011).



#### Laquinimod

Abbildung 2: Strukturformel von Laquinimod (di Nuzzo, Orlando, Nasca, & Nicoletti, 2014).

In inflammatorischen Modellen zur Erforschung der Multiplen Sklerose, wie z.B. der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), konnte gezeigt werden, dass Laquinimod die Krankheitsentstehung hemmt (Thöne et al., 2012; J. S. Yang, Xu, Xiao, Hedlund, & Link, 2004). Darüber hinaus initiiert Laquinimod im EAE-Modell die axonale Remyelinisierung (Moore et al., 2013) und beeinflusst die synaptische Übertragung, indem es postsynaptische, inhibitorische, GABAerge Potentiale verstärkt und exzitatorische, glutamaterge Potentiale reduziert (Ruffini et al., 2013). In nicht-inflammatorischen ZNS-Modellen wie dem Cuprizone-Modell (Brück et al., 2012; Kramann, Menken, Hayardeny, Hanisch, & Brück, 2016) oder in Modellen der Chorea Huntington (Ellrichmann et al., 2017; Garcia-Miralles et al., 2019) erwies sich Laquinimod ebenfalls als protektiv. Somit konnte gezeigt werden, dass Laquinimod nicht nur immunmodulatorisch, sondern auch neuroprotektiv und neurorestaurativ wirkt. Die in der Literatur häufig verwendete Bezeichnung "Immunmodulator" beschreibt folglich nur einen Teilaspekt der therapeutischen Potenz von Laquinimod.

Im Rahmen der Placebo-kontrollierten Phase III-Studie "ALLEGRO" konnte nachgewiesen werden, dass die einmal tägliche Verabreichung von Laquinimod die Behinderungsprogression und die Bildung MRT-sichtbarer Entzündungsherde in der schubförmigen MS (RRMS) hemmt. Außerdem wurde in dieser Studie bewiesen, dass die Schubrate unter einer Behandlung mit Laquinimod im Vergleich zu Placebo signifikant verringert ist (Comi et al., 2012). Letzteres Ziel wurde in einer weiteren Placebokontrollierten Phase III-Studie, der "BRAVO" Studie, hingegen nicht erreicht (Vollmer et al., 2014). Hier konnte jedoch die Hirnatrophie durch eine Behandlung mit Laquinimod signifikant reduziert werden. Insgesamt zeigte sich in den beiden Studien ein gutes Nebenwirkungsprofil der Substanz. Berichtet wurde neben Kopf-, Nacken- und Rückenschmerzen u.a. über Bauchschmerzen und einer Erhöhung des Leberenzyms Alanin-Aminotransferase.

In der "CONCERTO"-Studie, einer weiteren Placebo-kontrollierten Phase III-Studie von Patienten mit RRMS, konnte der primäre Endpunkt, eine Reduktion der Behinderungsprogression über 3 Monate, nicht erzielt werden. Auch die Phase II-Studie "ARPEGGIO" konnte ihren primären Endpunkt nicht erreichen, nämlich eine Reduktion der Hirnatrophie in Patienten mit PPMS. Diese beiden Studien wurden bislang noch nicht publiziert (Derfuss et al., 2020).

In zwei Placebo-kontrollierten, klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Laquinimod die Entstehung von in der Magnetresonanztomographie sichtbaren Läsionen bei Patienten mit RRMS signifikant reduzierte und zudem gut verträglich war (Comi et al., 2008; Polman et al., 2005).

#### **1.3. Dendriten und ihre Dornenfortsätze (engl. Spines)**

Wie bereits eingangs beschrieben, handelt es sich bei der Multiplen Sklerose um eine Erkrankung des Zentralnervensystems. Eine Vielzahl an wissenschaftlichen Arbeiten haben sich bereits mit der Affektion von Dendriten in der Multiplen Sklerose beschäftigt. Im Diskussionsteil meiner Dissertationsarbeit wird hierauf näher eingegangen. Dendriten sind astförmige Fortsätze eines Neurons. Sie dienen der Aufnahme von elektrischen Signalen, welche über den Zellkörper (Perikaryon, Soma) und anschließend über ein Axon weitergeleitet werden.

Dendritische Spines wurden im Jahre 1888 von Santiago Ramon y Cajal zum ersten Mal beschrieben (Cajal, 1888)(García-López, García-Marín, & Freire, 2007). Um die feinen Strukturen dieser Dornenfortsätze zu untersuchen, verwendete Cajal die Golgi-Färbung, eine spezielle Silberfärbung zur Darstellung der Morphologie von Neuronen (Golgi, 1873). Abbildung 3 zeigt Dendriten mit der charakteristischen Morphologie und den Dornenfortsätzen (engl. Spines), welche in weitere Subtypen eingeteilt werden können (Abbildung 4).

Die Pathologie von dendritischen Spines in neurodegenerativen Erkrankungen wurde inzwischen vielfach untersucht. Nicht nur in der Multiplen Sklerose, sondern beispielsweise auch in der Alzheimer-, Huntington- und der Parkinsonerkrankung wurden direkte und

11

indirekte strukturelle Veränderungen der Dornenfortsätzen beschrieben (Herms & Dorostkar, 2016).



Abbildung 3: Darstellung von Dendriten mit ihren Dornenfortsätzen (engl. Spines) in der Golgi-Färbung.



**Abbildung 4:** Einteilung der dendritischen Spines nach ihrer typischen Morphologie. Hier werden folgende Subtypen unterschieden: "filopodium", "mushroom", "thin", "stubby" und "branched" (in Anlehnung an (von Bohlen Und Halbach, 2009).

#### **1.4. Verwendete Tiermodelle**

Ein grundlegendes Ziel in der Multiplen Sklerose-Forschung ist die Kenntnis der genauen Pathophysiologie der Erkrankung. Hierzu werden u.a. verschiedene Tiermodelle verwendet. Die Mausmodelle, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, werden im Folgenden kurz vorgestellt.

#### 1.4.1. Das Cuprizone-Modell (Cup)

Das Cuprizone-Modell zählt zu den toxischen Tiermodellen. Cuprizone, ein Kupfer-Chelator mit der Bezeichnung Bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone, ist das Kondensationsprodukt aus Oxalylhydraziden und Cyclohexanonen. Die ersten Arbeiten mit dem Kupfer-Chelator liegen bereits einige Jahrzehnte zurück. Cuprizone wird seit den 1960er-Jahren zur Erforschung von De- und Remyelinisierung verwendet (Carlton, 1966, 1967; Suzuki & Kikkawa, 1969). Carlton zeigte, dass einer Intoxikation mit Cuprizone ZNS-Läsionen, Ödeme, Hydrocephalus, Demyelinisierung und eine Astrogliose folgten. Cuprizone wurde in Dosierungen von 0,2 bis 0,5% eingesetzt. Die Mortalität stieg mit der Verabreichung einer höheren Dosis, besonders bei jüngeren Tieren. Wurde die Beimengung von Cuprizone zum normalen Futter in einem höheren Alter begonnen, entwickelten die Mäuse seltener einen Hydrocephalus. Der genaue Wirkmechanismus der Cuprizone-Intoxikation ist noch nicht vollständig bekannt. Es wird angenommen, dass Cuprizone in den Mitochondrien essenzielle Enzyme der Atmungskette hemmt, welche Kupfer als Kofaktor verwenden. Dadurch kommt es zu oxidativem Stress und folglich zu einer Apoptose von reifen Oligodendrozyten sowie zu einer Mikroglia- und Astrozyten-Aktivierung (Draheim et al., 2016; Kipp, Nyamoya, Hochstrasser, & Amor, 2017).

In einer weiteren Arbeit mit dem Cuprizone-Modell und post-mortem Gehirnproben von MS-Patienten konnte gezeigt werden, dass in der Myelin-reichen weißen Substanz eine deutlich stärkere Progression der Läsionen festzustellen war als in der grauen Substanz (Große-Veldmann et al., 2016). Hierzu wurden 10 Wochen alte, männliche C57BL/6-Mäuse mit 0,25% Cuprizone für 3 Wochen intoxikiert, gefolgt von 2 Wochen normalem Futter, um eine Progression der Demyelinisierung zu gewährleisten.

Hiremath und Kollegen untersuchten die Abhängigkeit des Ausmaßes an Demyelinisierung von der Dauer und Dosis der Cuprizone-Intoxikation und dessen Zusammenhang zur Mikroglia/Makrophagen- bzw. Astrozyten-Aktivierung. Die Ausdehnung der Demyelinisierung wurde mittels Luxol-Fast-Blue/Periodsäure-Schiff-Reaktion (LFB/PAS) - und Myelin-Basisches-Protein (MBP, SMI-99) - Färbungen beurteilt. Eine 6-wöchige Intoxikation mit 0,2% Cuprizone oder in höherer Dosierung (0,3-0,6%) führte zu einer nahezu vollständigen Demyelinisierung des medialen Corpus callosum, einer im Cuprizon-Modell

13

häufig untersuchten Region. Damit einhergehend konnte eine Mikroglia/Makrophagen-Aktivierung, die eine Astrogliose zufolge hatte, beobachtet werden (Hiremath et al., 1998). Nach einer 5-6-wöchigen Cuprizone-Intoxikation ist das Corpus callosum beinahe komplett demyelinisiert. Dieser Prozess wird akute Demyelinisierung genannt. In den darauffolgenden Wochen kommt es - bei einer Fütterung der Mäuse mit normalem Futter - zu einer Remyelinisierung. Wird Cuprizone über einen Zeitraum von 12 Wochen oder länger verabreicht, spricht man von einer chronischen Demyelinisierung. Hier kommt es nur noch teilweise bzw. kaum zu einer Remyelinisierung (Kipp, Clarner, Dang, Copray, & Beyer, 2009). Die in diesem Kapitel beschriebenen Charakteristika des Cuprizone-Modells verdeutlichen, weshalb es ein geeignetes Modell zur Untersuchung der neurodegenerativen Komponente der Multiplen Sklerose darstellt.

#### 1.4.2. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein neuroimmunologisches, inflammatorisches Modell und stellt das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Erforschung von autoimmun-vermittelten ZNS-Erkrankungen dar.

Anfang des 20. Jahrhunderts immunisierten Rivers und Kollegen, Wissenschaftler der Rockefeller Universität in New York City, Affen mit verschiedenen Hirn-Extrakten und Hirn-Emulsionen aus Hasen, indem sie ihnen diese intramuskulär injizierten. Klinisch entwickelten diese im Anschluss ausgeprägte Lähmungen. Im gesamten ZNS konnten inflammatorische Reaktionen mit Demyelinisierung und perivaskulären Infiltraten festgestellt werden (Rivers, Sprunt, & Berry, 1933). Dieses Krankheitsbild wurde damals als akute disseminierte Enzephalomyelitis bezeichnet.

In der Multiplen Sklerose-Forschung wird das EAE-Modell aufgrund seiner hervorragenden Eigenschaften gerne eingesetzt. Die Tiere werden hierbei mit einem bestimmten ZNS-Antigen, zugeführt mit einem Adjuvans, immunisiert. Hierzu wird bei C57BL/6-Mäusen besonders häufig das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)<sub>35-55</sub> – Peptid mit dem kompletten Freund-Adjuvans (KFA) injiziert, was eine monophasisch-chronische Erkrankung zufolge hat (siehe Abbildung 5). Hingegen ruft eine Immunisierung bei SJL-Mäusen mit dem PLP<sub>139-151</sub> -Peptid eine schubförmig-remittierende Verlaufsform hervor (Kipp et al., 2017). Diese Antigene werden anschließend von lokalen antigenpräsentierenden Zellen, wie den Langerhans-Zellen, phagozytiert, welche darauf entlang der Lymphbahnen zu lokalen Lymphknoten oder zur Milz wandern. Dort kommunizieren sie mit Lymphozyten, woraus eine Ansammlung von Th1- und Th17-Zellen resultiert. Diese Lymphozyten verlassen im Anschuss die lymphatischen Organe und wandern über die Blut-Hirn- bzw. die Blut-Liquor-Schranke ins ZNS, um im Rückenmark, Kleinhirn und im N. opticus eine Entzündungsreaktion auszulösen. In den entzündlichen Läsionen findet in erster Linie eine axonale Degeneration

14

und keine ausgeprägte Demyelinisierung, wie es im Cuprizone-Modell der Fall ist, statt (Kipp et al., 2017).



Tage nach Immunisierung

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Behinderungsprogression von C57BL/6-Mäusen nach Immunisierung mit dem Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)<sub>35-55</sub> – Peptid. Der klinische Score beurteilt Motorik und Verhalten der Maus. Nach einer Zunahme der Behinderung bis zum rund 15. Tag nach Immunisierung kommt es zu einer leichten Verbesserung ohne einer weiteren wesentlichen Verschlechterung (in Anlehnung an (Kipp et al., 2017)).

Somit ist das EAE-Modell u.a. hervorragend dazu geeignet, um die Funktion der T-Lymphozyten im Pathomechanismus der Erkrankung zu untersuchen.

Darüber hinaus eignet sich das EAE-Modell auch zur Erforschung der Rolle von B-Lymphozyten bzw. deren Interaktion mit T-Lymphozyten. Ray und Kollegen konnten zeigen, dass B-Lymphozyten an der Steuerung der Anzahl an regulatorischen T-Lymphozyten ("Treg") beteiligt sind und diese so beeinflussen können, dass die Autoimmunität im EAE-Modell unterdrückt wird (Ray, Basu, Williams, Salzman, & Dittel, 2012).

#### 1.4.3. Das Cup/EAE-Modell

Zusammenfassend eignet sich das Cuprizone-Modell besonders, um die neurodegenerative Komponente der Multiplen Sklerose zu untersuchen. Das EAE-Modell hingegen dient zur Erforschung des autoimmun-entzündlichen Aspekts der Erkrankung.

In meiner Dissertationsarbeit habe ich das Cuprizone-Modell zusätzlich auch mit dem EAE-Modell kombiniert, woraus sich das Cup/EAE-Modell ergibt. Hierdurch soll eine realere Darstellung der Multiplen Sklerose mit ihrer komplexen Pathologie, worauf im Folgenden näher eingegangen wird, erzielt werden.

Bereits mehrfach wurde bewiesen, dass eine ZNS-intrinsische Neurodegeneration die

Migration von peripheren Immunzellen in das ZNS triggert (Baxi et al., 2015; Chrzanowski et al., 2019; Rüther et al., 2017; Scheld et al., 2016).

Baxi und Kollegen konnten zeigen, dass, nach einem Transfer von Myelin-reaktiven Th17-Lymphozyten, die Cuprizone-induzierte Neurodegeneration eine Rekrutierung von peripheren Immunzellen in das Hirnparenchym induziert bzw. fördert (Baxi et al., 2015). Scheld und Kollegen hatten bereits vor einigen Jahren das Cup/EAE-Modell etabliert. In ihren Arbeiten konnten sie demonstrieren, dass einer Immunisierung von weiblichen C57BL/6-Mäusen mit dem Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)<sub>35-55</sub> – Peptid die Formation von entzündlichen Läsionen hauptsächlich im Rückenmark folgte. Durch eine vorangegangene 0,25% Cuprizone-Intoxikation über 3 Wochen, gefolgt von 2 Wochen normalem Futter, konnten zusätzlich Läsionen in Teilen des Telencephalons (Cortex, Subcortex, Corpus callosum) beobachtet werden. Histopathologisch zeigten sich in den Läsionen neben einer Demyelinisierung eine Schädigung der Membrana limitans gliae perivascularis, einer von Astrozyten gebildeten Grenzmembran um die Blutgefäße. Um das Lumen der Gefäße herum akkumulierten Monozyten und Lymphozyten, die die sogenannten "perivaskulären Infiltrate" (engl.: perivascular cuffs, PVCs) bilden. Die Cuprizone-induzierte, ZNS-intrinsische Neurodegeneration ist somit ein potenzieller Trigger für eine sekundäre Immunzellinfiltration in das ZNS (Scheld et al., 2016).

In einer weiteren Arbeit von Rüther und Kollegen aus dem Neuroanatomischen Institut Aachen wurde das Cup/EAE-Modell eingesetzt, um u.a. die dort sekundär entstandenen ZNS-Läsionen (siehe oben) genauer zu untersuchen. Die Autoren gehen in der Entstehung dieser Läsionen von einer Kaskade, die über drei Schritte abläuft, aus: 1. Durch die Cuprizone-Intoxikation kommt es zu einer Formation von Zellen, die an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, wie Astrozyten und Endothelzellen. 2. Periphere Immunzellen infiltrieren das Hirnparenchym. 3. Hierdurch kommt es zu einer weiteren Triggerung von Immunzellen, was zu einer Bildung der Läsionen führt. In den Läsionen fanden sich hauptsächlich Monozyten und Mikrogliazellen, aber auch neutrophile Granulozyten. Es zeigte sich eine Demyelinisierung, eine Schädigung der Membrana limitans gliae perivascularis und axonaler Schaden. Im Kleinhirn konnten im EAE-Modell durch eine vorangegangene Cuprizone-Intoxikation mehr perivaskuläre Infiltrate festgestellt werden als im Kleinhirn der Mäuse ohne die Cuprizone-Intoxikation. Weiterhin konnten sie zeigen, dass sich im chronischen Verlauf des Cup/EAE-Modells Läsionen im Telencephalon zurückbilden. Dies war im Rückenmark nicht der Fall (Rüther et al., 2017).

#### 1.5. Arbeitshypothesen

Bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die zytoprotektive Wirkung von Laquinimod (siehe Kapitel 1.2. Laquinimod) im Cuprizone - bzw. Cuprizone/EAE - Modell untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die orale Verabreichung von Laquinimod die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung und Mikroglia-Aktivierung hemmt. Weiterhin wurde dadurch im Cuprizone/EAE-Modell die sekundäre Immunzellrekrutierung signifikant verringert und Laquinimod wirkte protektiv auf Axone (Nedelcu et al., 2020).

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

- Laquinimod hemmt im Cuprizone- und im Cuprizone/EAE-Modell die entstehende Astrogliose.
- Laquinimod verringert im Cuprizone/EAE-Modell die in Folge einer Neurodegeneration sekundär zu beobachtende Immunzellrekrutierung.
- Laquinimod wirkt durch eine Hemmung der Inflammation bzw. Immunzellrekrutierung im Cuprizone/EAE-Modell protektiv auf Dendriten.

#### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Versuchstiere

Die komplette Tierzucht bis zum Tod der Tiere wurde von meinen Vorgängern unserer Arbeitsgruppe (siehe auch Material-/Methodenteil in (Nedelcu et al., 2020)) durchgeführt, relevante Inhalte werden hier jedoch kurz erläutert.

Eine Genehmigung für die Durchführung der Tierversuche gemäß § 8 Tierschutzgesetz lag durch die Regierung von Oberbayern vor (Referenznummer: 55.2-154-2532-73-15).

In dieser Arbeit wurden 8 Wochen alte, weibliche Mäuse vom Stamm C57BL/6 (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Das Gewicht der Tiere wurde einmal wöchentlich kontrolliert. Die Käfige, die eine maximale Anzahl von 5 Mäusen beherbergten, wurden regelmäßig gewechselt und waren rund um die Uhr gut belüftet. Es wurde stets nach den von der Organisation "Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)" vorgegebenen Laborbedingungen gearbeitet. Die Raumtemperatur betrug 23 °C  $\pm$  2 °C, die Luftfeuchtigkeit 50%  $\pm$  5%. Es wurde ein Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden festgelegt und Zugang zu Wasser und Futter bestand ad libitum.

#### 2.2. Versuchsaufbau und -durchführung

Die Tierversuche gliederten sich in zwei Teile, hier mit "TEVA 1" und "TEVA 2" bezeichnet (siehe Abbildung 6). TEVA 2 stellte eine Wiederholung von TEVA 1 dar, jedoch lediglich mit den Versuchsgruppen Cup/EAE-Veh und Cup/EAE-Laq. Die Zuteilung der Mäuse zu den verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte zufällig.

TEVA 1 beinhaltete fünf verschiedene Versuchsgruppen:

Die Kontrollgruppe wurde über einen Zeitraum von 5 Wochen mit normalem Haltungsfutter versorgt.

Die Cup-Veh-Gruppe wurde 3 Wochen lang mit 0,25 % Cuprizone intoxikiert, gefolgt von 2 Wochen normalem Futter, um eine Progression der Läsionen zu ermöglichen (Doan et al., 2013). Das Cuprizone-Futtergemisch (0,25% Cuprizone; Bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde aus 0,25 g Cuprizone und 100 g gemahlenem Standardfutter hergestellt (Hochstrasser, Exner, Nyamoya, Schmitz, & Kipp, 2017). In den ersten 3 Wochen wurde den Mäusen täglich Ultra Pure Water als Trägersubstanz (engl. Vehicle) über eine Schlucksondierung veabreicht (200 µl). In der Cup-Laq-Gruppe wurden zeitgleich hingegen 200 µl (25 mg/kg) einer Laquinimod-Lösung verabreicht (Laquinimod gelöst in gereinigtem Wasser; 2,5 mg/ml; Dosierung basierend auf (Wegner et al., 2010)). Laquinimod wurde von Teva Pharmaceutical Industries, LTd., Petah Tikva, Israel bezogen.

Die Cup/EAE-Veh- und Cup/EAE-Laq-Gruppen wurden die ersten 5 Wochen wie die oben

beschriebenen Cup-Veh- bzw. Cup-Laq-Gruppen behandelt. Nach Woche 5 wurden diese Mäuse jedoch nicht getötet, sondern zu Beginn der 6. Woche mit einer EAE-Emulsion immunisiert. Hierzu wurden ihnen je 100 µl der Emulsion in den oberen und unteren Rücken subkutan appliziert. Diese enthielt 1 mg/ml Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)<sub>35-</sub> <sub>55</sub> – Peptid und 5 mg/ml abgetötetes Mycobakterium tuberculosis gelöst in komplettem Freund-Adjuvans (KFA). Am Induktions- und am darauffolgenden Tag wurde den Tieren je 150 µl Pertussistoxin (PTX)-Lösung (mit phosphatgepufferter Salzlösung, PBS) intraperitoneal injiziert. Für die Immunisierung wurde ein Kit der Firma Hooke Laboratories verwendet.

#### TEVA 1



#### TEVA 2

Cup/EAE-Veh (n=10)	3 Wochen Cuprizone-Vehikel	2 Wochen normales Futter	2 Wochen EAE
Cup/EAE-Laq (n=10)	3 Wochen Cuprizone-Laquinimod	2 Wochen normales Futter	2 Wochen EAE
Zeitleiste	3 Wochen	2 Wochen	Ca. 2 Wochen

Abbildung 6: Darstellung der Versuchsgruppen der beiden Tierversuche TEVA 1 und TEVA 2 (Erklärung siehe Fließtext).

#### 2.3. Materialgewinnung für die HE-Färbung/Immunhistochemie

Im Folgenden wird die Materialgewinnung für die HE-Färbung bzw. Immunhistochemie beschrieben. Die Probengewinnung für die Golgi-Färbung wird im Kapitel 2.4.3. "Golgi-Färbung" angeführt.

Am Versuchsende wurden die Tiere zunächst mit intraperitoneal verabreichtem Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) betäubt. Anschließend wurden den Mäusen 20 ml eiskaltes PBS (Phosphatpufferlösung; siehe SOP 2), gefolgt von zwei mal je 50 ml Perfusionslösung (SOP 6), durch den linken Ventrikel injiziert (transkardiale Perfusion). Im Anschluss wurde der Schädel abgetrennt, die Haut im Bereich der Schädelkalotte entfernt und der Schädel durch einen sagittalen Schnitt eröffnet. Nun wurden das Gehirn bzw. das Rückenmark entnommen. Das entnommene Material wurde anschließend in der Fixierlösung (Perfusionslösung) über Nacht bei 4 °C postfixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 12 Stunden in Leitungswasser gewässert. Tabelle 1 zeigt den Ablauf der im Anschluss erfolgten Dehydrierung und Paraffineinbettung.

Schritt	Vorgang	Dauer
1	50% Ethanol	1 Nacht
2	70% Ethanol	40 min
3	70% Ethanol	40 min
4	96% Ethanol	40 min
5	96% Ethanol	40 min
6	96% Ethanol	40 min
7	100% Ethanol	40 min
8	100% Ethanol	60 min
9	100% Ethanol	60 min
10	Xylol	40 min
11	Xylol	40 min
12	Xylol	40 min
13	Paraffin	60 min
14	Paraffin	60 min
15	Paraffin	2 Tage

Tabelle 1: Ablauf der Dehydrierung und Paraffineinbettung.

Im Anschluss an die Paraffineinbettung wurden 5 µm dicke histologische Schnittpräparate mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica SM 2000R und SM 2010R) angefertigt. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad gelegt und anschließend auf die Objektträger angebracht (2 Schnitte pro OT). Die Trocknung der Präparate erfolgte bei 37° C über Nacht.

#### 2.4. Färbungen

#### 2.4.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

#### Prinzip der HE-Färbung

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in seiner oxidierten Form als Hämatein bezeichnet wird. Das Alaunhämatoxylin (auch als "Hämalaun" bekannt) ist ein basischer Hämateinlack, der saure bzw. basophile Strukturen blau färbt. Hierzu zählen u.a. Nukleinsäuren (Zellkern und Ribosomen (raues endoplasmatisches Retikulum)). Eosin ist ein synthetisch hergestellter, saurer Farbstoff, der basische bzw. acido-/ eosinophile Strukturen rot färbt. Diese sind vor allem Kollagen, Mitochondrien und das glatte endoplasmatische Retikulum.

#### Durchführung der HE-Färbung

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 2).

Schritt	Vorgang	Dauer
1	Xylol I	10 min
2	Xylol II	10 min
3	Xylol III	10 min
4	50% Xylol/50% Ethanol	5 min
5	Ethanol 100%	3 min
6	Ethanol 100%	3 min
7	Ethanol 96%	3 min
8	Ethanol 96%	3 min
9	Ethanol 70%	3 min
10	Ethanol 50%	3 min
11	Destilliertes Wasser	3 min

**Tabelle 2:** Ablauf der Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte.

Im Anschluss an die Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Objektträger ca. 8 Minuten in Mayers Hämalaun (SOP 7) inkubiert. Danach erfolgte ein kurzer Spülschritt in destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Ein weiterer kurzer Spülschritt in destilliertem Wasser folgte. Schließlich wurden die Objektträger 5 Minuten in der Eosinlösung (SOP 8) inkubiert und danach ein letzter kurzer Spülschritt in destilliertem Wasser ausgeführt. Zur anschließenden Dehydrierung der Schnitte durchwanderten diese eine aufsteigende Alkohol- und Xylolreihe (siehe Tabelle 3).

Schritt	Vorgang	Dauer
1	Ethanol 70%	kurz
2	Ethanol 80%	kurz
3	Ethanol 96%	1 min
4	Ethanol 100% I	2 min
5	Ethanol 100% II	2 min
6	50% Xylol/50% Ethanol	5 min
7	Xylol I	10 min
8	Xylol II	10 min

Tabelle 3: Ablauf der Dehydrierung der Schnitte im Rahmen einer HE-Färbung.

Abschließend wurden die Schnitte mit DPX eingedeckt, welches hierzu auf Deckgläser aufgetragen wurde und diese langsam auf die Objektträger angebracht wurden. Die Deckgläser wurden mit leichten Gewichten beschwert und die Schnitte über Nacht unter einem Abzug getrocknet.

#### 2.4.2. Immunhistochemische Färbungen (IHC)

#### Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht das Detektieren von Antigenen mit Hilfe von Antikörpern. Verwendet wurde die sogenannte ABC-Methode, bei welcher es sich um eine indirekte Nachweismethode handelt. Dies bedeutet, dass ein sekundärer, markierter Antikörper an einen primären, nicht markierten Antikörper bindet, welcher wiederum spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Folgende Grafik zeigt das Prinzip der Immunhistochemie:

A) Ein spezifischer primärer Antikörper (monoklonal oder polyklonal) bindet an das gesuchte Antigen im Gewebeschnitt.

- B) Ein biotinylierter Sekundärantikörper gerichtet gegen die Spezies, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde bindet an diesen Primärantikörper.
- C) Avidin bindet an das Biotin und bildet zusammen mit der Meerrettichperoxidase (HRP) den sogenannten "Avidin-Biotin-Complex" (ABC).
- D) Visualisierung: Durch die Zugabe eines DAB (Diaminobenzidin) Komplexes in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert die Meerrettichperoxidase eine Reaktion, bei welcher die für die DAB-Färbung typische bräunliche Farbe entsteht.



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Immunhistochemie.

#### Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Um die verschiedenen Färbeergebnisse vergleichbar zu machen, wurde stets nach einem einheitlichen Protokoll gefärbt.

#### Tag 1

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 2).

Im Anschluss erfolgte – mit Ausnahme der ALDH1L1-Färbung - eine Demaskierung der während des Fixierungs- und Einbettungsvorganges entstandenen "Vernetzungen" mit Hilfe einer HIER (Heat-Induced-Epitope-Retrieval) - Methode. Hierzu wurden die Objektträger entweder in eine Tris-EDTA (SOP 4; bei Vimentin, BLBP und CD4) - oder Citrat-Pufferlösung (SOP 3; bei GFAP) überführt und diese in einer Mikrowelle zunächst zum Kochen gebracht (über ca. 2-3 Minuten) und anschließend bei niedrigerer Temperatur weitere 10 Minuten gebadet. Danach wurden die Schnitte 15 Minuten lang durch ein Umspülen des Behälters mit Leitungswasser auf Raumtemperatur abgekühlt.

Nun erfolgten 3 Spülschritte in PBS (Phosphatpufferlösung; SOP 2) zu je 5 Minuten unter leichtem Schütteln.

Um später unspezifische Hintergrundfärbungen zu verhindern, wurden die Objektträger für 1 Stunde in 5% normalem Ziegenserum (SOP 5) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur geblockt.

Anschließend wurden die Objektträger abgeklopft und der Primärantikörper (siehe Tabelle 11; verdünnt in 5% normalem Ziegenserum; 100 μm pro OT; zuvor zentrifugiert und gevortext) aufgetragen, um über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank zu inkubieren.

Als Spezifitätskontrolle für die jeweiligen Primärantikörper wurden stets Negativkontrollen, bei welchen anstatt des Primärantikörpers nur 5% normales Ziegenserum appliziert wurde, angefertigt.

#### Tag 2

Zu Beginn des zweiten Tages wurden die Schnitte dreimal zu je 5 Minuten unter leichtem Schütteln in PBS gespült. Dieser Vorgang wurde jedes Mal zwischen den folgenden Schritten wiederholt.

Um die endogene Peroxidase zu inaktivieren, wurden die Schnitte 30 Minuten lang in einer 0,3%  $H_2O_2$  Lösung (30%  $H_2O_2$  1:100 verdünnt in PBS) unter leichtem Schütteln und Lichtschutz inkubiert.

Danach wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 12; 1:200 verdünnt in 5% normalem Ziegenserum, 100  $\mu$ l pro Schnitt), welcher zuvor zentrifugiert und gevortext

wurde, aufgetragen und die Schnitte 1 Stunde lang in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) wurde bereits 30 Minuten vor Gebrauch zusammengestellt und im Dunkeln gelagert. Hierzu wurden Lösung A und B aus dem ABC-Kit - jeweils 1:50 mit PBS verdünnt – zusammengemischt, 100 µl pro Schnitt aufgetragen und für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurde der DAB-Komplex (DAB-Stocklösung 1:50 mit DAB-Substrat verdünnt; 100  $\mu$ l pro Schnitt) für 10 Minuten hinzugegeben, woraus die typische bräunliche Färbung resultierte.

Danach wurden die Schnitte wenige Sekunden lang in Leitungswasser und anschließend 5 Minuten in destilliertes Wasser überführt. Zur Dehydrierung der Schnitte durchwanderten eine aufsteigende Alkoholund Xylolreihe (siehe diese nun Tabelle 4). Bei zwei Färbungen (CD4 und Vimentin) erfolgte vor der aufsteigenden Alkohol- und Xylolreihe eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun. Hierzu wurden die Objektträger 30 Sekunden lang in der Hämalaun-Lösung (SOP 7) inkubiert. Anschließend wurden diese wenige Sekunden in destilliertes Wasser überführt, um danach bei fließendem Leitungswasser 10 Minuten zu bläuen. Nun wurden die Objektträger erneut 5 Minuten lang in destilliertem Wasser gebadet und durch die aufsteigende Alkohol- und Xylolreihe (siehe Tabelle 4) geführt.

Schritt	Vorgang	Dauer
1	Ethanol 50%	3 min
2	Ethanol 70%	3 min
3	Ethanol 96%	3 min
4	Ethanol 96%	3 min
5	Ethanol 100%	3 min
6	Ethanol 100%	3 min
7	50% Xylol/50% Ethanol	5 min
8	Xylol I	10 min
9	Xylol II	10 min
10	Xylol III	10 min

 Tabelle 4: Ablauf der Dehydrierung der Schnitte in der IHC.

Abschließend wurden die Schnitte in DPX eingedeckt. Dazu wurden einige Tropfen DPX auf ein Deckglas appliziert und dieses vorsichtig auf die Schnitte angebracht. Die Deckgläser wurden mit leichten Gewichten beschwert und die Schnitte über Nacht unter einem Abzug getrocknet.

Folgende Tabelle fasst Tag 1 und Tag 2 der immunhistochemischen Färbung zusammen.

Schritt	Vorgang	
Tag 1		
1	Entparaffinierung und Rehydrierung (siehe Tabelle 2)	
2	HIER/Demaskierung je nach Färbung (siehe Fließtext) in Citrat- oder Tris- EDTA-Pufferlösung; in der Mikrowelle ca. 2-3 Minuten zum Kochen bringen und anschließend 10 Minuten bei niedriger Temperatur baden	
3	Schnitte auf Raumtemperatur abkühlen (durch Umspülen des Behälters mit Leitungswasser)	
4	3 x 5 Minuten spülen in PBS (unter leichtem Schütteln)	
5	Blocking mit 5% normalem Ziegenserum in einer feuchten Kammer bei RT für 1 Stunde	
6	Inkubation mit Primärantikörper (siehe Tabelle 11) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C	
Tag 2		
1	3 x 5 Minuten spülen in PBS (unter leichtem Schütteln)	
2	Peroxidase-Inaktivierung in 0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung unter leichtem Schütteln und Lichtschutz für 30 Minuten	
3	3 x 5 Minuten spülen in PBS (unter leichtem Schütteln)	
4	Inkubation mit aufgetragenem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 12) in einer feuchten Kammer bei RT für 1 Stunde	
5	3 x 5 Minuten spülen in PBS (unter leichtem Schütteln)	
6	Inkubation mit aufgetragenem Avidin-Biotin-Komplex in einer feuchten Kammer bei RT für 1 Stunde (ABC bereits 30 Minuten zuvor zubereitet und dunkel gelagert)	
7	3 x 5 Minuten spülen in PBS (unter leichtem Schütteln)	
8	Inkubation mit aufgetragenem DAB-Komplex in einer feuchten Kammer bei RT für 10 Minuten zur Visualisierung	
9	Schnitte wenige Sekunden in Leitungswasser tauchen	
10	5 Minuten in destilliertes Wasser	
11	Aufsteigende Alkohol- und Xylolreihe zur Dehydrierung (siehe Tabelle 4) mit anschließender Fortsetzung ab Schritt 17 oder vorheriger Gegenfärbung ab Schritt 12	

12	Inkubation in Mayers Hämalaun für 30 Sekunden	
13	Schnitte wenige Sekunden in destilliertes Wasser tauchen	
14	Bläuen bei fließendem Leitungswasser für 10 Minuten	
15	5 Minuten in destilliertes Wasser	
16	Aufsteigende Alkohol- und Xylolreihe zur Dehydrierung (siehe Tabelle 4)	
17	Eindecken der Schnitte mit DPX	
18	Deckgläser mit Gewichten beschweren und Schnitte über Nacht unter Abzug trocknen lassen	

Tabelle 5: Durchführung einer immunhistochemischen Färbung im Überblick.

#### 2.4.3. Golgi-Färbung

#### Prinzip der Golgi-Färbung

Bei der "FD Rapid GolgiStain<sup>™</sup> Kit" - Färbung handelt es sich um eine Silberfärbung, mit welcher die Morphologie von Neuronen dargestellt wird. Grundlage der Färbung ist eine Bindung von Silberionen an argyrophile ("silberliebende") Biomoleküle. Diese fallen anschließend als Silberchromat (unlösliches Salz) aus und binden an Kristallisationskeime in den Neuronen. Besonders an der Golgi-Färbung ist, dass nur wenige Neuronen angefärbt werden, und somit eine genaue morphologische Beurteilung der Neurone möglich wird.

Die unten angeführten Lösungen A, B und C für die Imprägnierphase enthalten u.a. Kaliumdichromat, Quecksilber und Silbernitrat, jedoch werden vom Hersteller keine genaueren Angaben zu den Inhaltsstoffen der Lösungen gemacht.

#### Durchführung der Golgi-Färbung

Es wurde stets unter einem Abzug und mit Nitrilhandschuhen bei Raumtemperatur gearbeitet. Proben, die mit Lösung A und B behandelt wurden, wurden gemäß Herstellerempfehlung vor Licht geschützt. Die Lösungen wurden wie empfohlen nicht mit Metall in Berührung gebracht. Das Experiment verläuft über einen Zeitraum von ca. 4 Wochen und gliedert sich in 3 Phasen: 1. Imprägnierphase, 2. Schneidephase und 3. Färbephase.

#### 1. Imprägnierphase

#### Ansetzen der Imprägnierlösung:

Die Imprägnierlösung wurde 24 Stunden vor der Gewebeentnahme angesetzt und im Dunkeln bei RT gelagert, da sich Präzipitate bilden, welche sich innerhalb der 24 Stunden absetzen. Diese Präzipitate dürfen nicht zur Probe gelangen. Pro cm<sup>3</sup> Gewebe wurden mind. 6 ml Imprägnierlösung benötigt. Angesetzt wurden zwei Falcon-Röhrchen (für ein späteres Wechseln der Lösung; siehe unten) mit je 18 ml aus Lösung A vermischt mit 18 ml aus Lösung B (1:1).

#### Gewebeentnahme

Am Versuchsende wurden die Tiere (je 2 Mäuse aus den beiden Versuchsgruppen Cup/EAE-Veh und Cup/EAE-Laq von TEVA 2) zunächst mit intraperitoneal verabreichtem Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) betäubt. Die Mäuse wurden nun nicht perfundiert, sondern direkt im Anschluss an die Betäubung wurde der Schädel abgetrennt, die Haut im Bereich der Schädelkalotte entfernt und der Schädel durch einen sagittalen Schnitt eröffnet. Nun wurde das Gehirn entnommen, mit doppelt-destilliertem Wasser abgespült und anschließend in die vorbereitete Imprägnierlösung gelegt. Dort wurden die Gehirne 17 Tage lang im Dunkeln bei RT gelagert. Am Tag nach der Gewebeentnahme wurde die Imprägnierlösung durch die frische, zusätzlich angesetzte Lösung ausgewechselt. Um ein bestmögliches Ergebnis zu erreichen, wurde die Lösung zweimal wöchentlich vorsichtig geschwenkt. Nach den 17 Tagen wurde das Gewebe in Lösung C überführt und dort vier Tage lang inkubiert. Auch diese Lösung wurde am zweiten Tag durch eine frische Lösung C ausgewechselt.

#### 2. Schneidephase (Kryoschnitte)

Die folgende Tabelle zeigt den Ablauf der im Anschluss stattgefundenen Schneidephase.

Schritt	Vorgang			
1	Isopentan bei -80°C vorkühlen (mind. 1 Tag vor Gebrauch)			
2	Kryostat mind. 4 Stunden vor Gebrauch abkühlen (Kammer -23°C und Objektkopf -22°C)			
3	Eine Styroporbox mit Trockeneis (Pellets) füllen; Isopentan in ein 100ml Becherglas abfüllen; im Trockeneis eingraben und vorkühlen (Temperatur muss unter -70°C liegen)			
4	Kryohalter auf Trockeneis vorkühlen			
5	Eine runde Wägeschale aus Plastik mit einer Nadel rundum tief durchlöchern (= Sieb)			
6	Gehirn auf saugendes Papier legen und leicht abtupfen; mit Plastikpinzette in das Sieb legen			
7	Mit Plastikpinzette das Sieb langsam im Isopentan versenken; dann ca. 15 Sekunden untergetaucht lassen			
8	Gehirn anschließend noch für ca. 1 Minute im Trockeneis eingraben, um sicher zu stellen, dass das Gewebe komplett durchgefroren ist			
9	Gehirn mit Plastikpinzette orientiert halten und einen großen Tropfen destilliertes Wasser auf den Halter setzen			
10	Gehirn in den sehr schnell fest werdenden Tropfen setzen; wiederholt destilliertes Wasser rundum nachtropfen und somit den unteren Teil des Gehirns ummanteln			
11	Halter für weitere 10 Minuten auf Trockeneis stehen lassen, anschließend im Kryostat einspannen			
12	5 Minuten warten, bis man zu schneiden anfängt			

13	Kryostat auf 100 μm Schichtdicke einstellen; anschließend Gehirn ohne		
14	Schnitte mit Hilfe eines Pinsels auf mit Lösung C betropfte (Tropfen ca. so groß wie Schnitt) 3% Gelatine-Chromalaun-beschichtete Objektträger aufziehen und wenn nötig mit Pinsel vorsichtig glätten; überschüssige Lösung C mit Pasteurpipette abziehen und den Rest mit Filterpapier absaugen; möglichst wenig Lösung auf OT belassen (Gefahr des Abschwimmens)		
15	OTs im Dunkeln bei RT über Nacht trocknen lassen		
16	OTs am nächsten Tag bei +60°C (Wärmeschrank) für 1 Stunde lagern, um ein vollständiges Trocknen zu gewährleisten; anschließend eine weitere Nacht im Dunkeln bei RT trocknen		
17	Um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen, OTs gleich im Anschluss färben (siehe Färbephase)		

 Tabelle 6:
 Schneidephase im Golgi-Experiment.

#### 3. Färbephase

Die Färbelösung wurde stets frisch angesetzt; pro 100 ml können in der Golgi-Färbung ca. 100 Schnitte inkubiert werden. Alle Arbeitsschritte wurden auf einem Schüttler ausgeführt und die OTs vor Licht geschützt.

#### Die Färbelösung wurde wie folgend angesetzt:

#### 1 Teil Lösung D + 1 Teil Lösung E + 2 Teile doppelt destilliertes Wasser

#### Ansatz D: 20ml

#### Ansatz E: 20ml

#### Ansatz doppelt destilliertes Wasser: 40 ml

Die folgende Tabelle zeigt den Ablauf der im Anschluss stattgefundenen Färbephase.

Schritt	Vorgang			
1	OTs 2 x 4 Minuten in doppelt-destilliertem Wasser spülen			
2	OTs 10 Minuten in Färbelösung inkubieren; dabei mit Deckel verschließen, um Verdampfen zu vermeiden			
3	OTs 4 x 5 Minuten in doppelt-destilliertem Wasser spülen			
4	Schnitte in aufsteigender Alkohol- und Xylolreihe entwässern:			
	50% Ethanol 4min			
	70% Ethanol 4min			
	80% Ethanol 4min			
	96% Ethanol 4min			
	100% Ethanol 4min			

		100% Ethanol	4min
		100% Ethanol	4min
		100% Ethanol	4min
		Xylol	4min
		Xylol	4min
		Xylol	4min
5	Schnitte mit Permount eindecken; hierzu einige Tropfen Permount auf ein Deckglas geben und dieses auf den Schnitt legen		
6	Fertige Schnitte im Dunkeln lagern		

Tabelle 7: Färbephase im Golgi-Experiment.

#### 2.5. Methoden der Auswertung

#### Ausgewertete Hirnregionen

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen Hirnregionen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Dabei handelt es sich um Region 215 (Abbildung 8) und Region 265 (Abbildung 9) (nach Sidman et al., 1971).

Im Golgi-Experiment (siehe unten) wurde anstatt von Region 265 Region 285 untersucht.

- CTX = Cortex
- cing = Cingulum
- fx = Fornix
- mCC = mediales Corpus callosum
- ICC = laterales Corpus callosum
- HP = Hippocampus
- CP = Caudoputamen
- Ca = Commissura anterior
- TH = Thalamus
- HY = Hypothalamus



Abbildung 8: Darstellung der Region 215 (nach Sidman et al., 1971).



Abbildung 9: Darstellung der Region 265 (nach Sidman et al., 1971).

#### Perivaskuläre Infiltrate (PVCs) in HE-gefärbten Cup/EAE-Schnitten

In den Cup/EAE-Schnitten wurde die Anzahl an perivaskulären Infiltraten (engl. perivascular cuffs (PVCs); siehe Abbildung 10) bestimmt. Hierbei handelt es sich um entzündliche Infiltrate von Leukozyten, die um das Lumen von postkapillären Venolen herum akkumulieren. Es wurde gezeigt, dass im EAE-Modell PVCs hauptsächlich im Kleinhirn und Rückenmark vorhanden sind, während im kombinierten Cup/EAE-Modell PVCs zusätzlich im Telencephalon zu finden sind (Rüther et al., 2017; Scheld et al., 2016). In dieser Arbeit wurde die Anzahl an PVCs pro Schnitt in R215 und R265 der mit Laquinimod oder Vehicle behandelten Cup/EAE Mäuse verblindet unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse 50i) manuell bestimmt. Es wurden je zwei Schnitte pro Region und Maus ausgewertet.



**Abbildung 10:** Darstellung eines perivaskulären Infiltrats (PVC) in einem HE-gefärbten Schnitt. Dies entspricht der Akkumulation von Leukozyten um das Lumen des Gefäßes herum.

#### CD4-Expression in Cup/EAE-Schnitten

Die Cup/EAE-Schnitte aus TEVA 2, die immunhistochemisch gegen CD4 gefärbt wurden, wurden unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse E200; ausgestattet mit Kamera: Basler ace acA1920-40uc) betrachtet und histologische Bilder aufgenommen (Auswertung in 40x-Vergrößerung; Beispielbild in 10x-Vergrößerung siehe Abbildung 11). Es wurde je ein Schnitt pro Region und Maus verblindet ausgewertet (R215 und R265), indem die Anzahl an CD4<sup>+</sup> Zellen im medialen und lateralen Corpus callosum bestimmt wurde. Hierzu wurde das Programm "ViewPoint" von PreciPoint, Freising, Deutschland verwendet: Nachdem die "region of interest" (ROI) abgegrenzt wurde, erfolgte das manuelle Zählen der CD4<sup>+</sup> Zellen. Das Ergebnis wurde in Zellen pro mm<sup>2</sup> angegeben.



Abbildung 11: CD4<sup>+</sup> Zellen im lateralen CC aus R215.

#### Untersuchung der Astrogliose (Vimentin-, GFAP-, BLBP- und ALDH1L1-Färbungen)

Um die Astrogliose in den Mausmodellen näher zu untersuchen, wurden die Schnitte der Versuchsgruppen aus TEVA 1 immunhistochemisch gegen die oben genannten Proteine gefärbt (R265). Anschließend wurden histologische Bilder der Gewebeschnitte unter dem Mikroskop aufgenommen (ein Schnitt pro Maus aus R265). Um ein bestmögliches und vor

allem vergleichbares Ergebnis zu erreichen, wurde stets unter den gleichen Bedingungen bzw. Einstellungen aufgenommen (Mikroskop: Nikon Eclipse 50i, 4x-Vergrößerung; ausgestattet mit Kamera: Nikon DS-L2). Die histologischen Bilder wurden im Anschluss mit Hilfe von densitometrischen Messungen ausgewertet. Hierzu wurde das Programm "ImageJ" von National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA verwendet.

Nachdem das zu untersuchende Bild im Programm geöffnet wurde (siehe Abbildung 12 A), erfolgte die Umwandlung in "8-bit"- Graustufen (**B**; 2<sup>8</sup> = 256 Graustufen; 0 = schwarz bis 255 = weiß). Als nächstes wurde ein passender Schwellenwert ("Threshold") für die densitometrische Messung festgelegt, welcher anschließend auf alle Bilder einheitlich angewendet wurde, um das Ergebnis vergleichbar zu machen. Dadurch entstand ein binäres Bild (**C**), in dem jedes Pixel entweder weiß oder schwarz eingefärbt wurde (je nachdem, ob der jeweilige Wert unter oder über dem festgelegten Schwellenwert (Threshold) liegt). Anschließend wurde das mediale Corpus callosum als ROI (region of interest) eingezeichnet und die Densität/Intensität der jeweiligen Färbung in Prozent berechnet (**D**; "area fraction").



Abbildung 12: Densitometrische Auswertung (Erklärung siehe Fließtext).

#### Untersuchung von dendritischen Dornenfortsätzen in Golgi-Färbungen

Um die Auswirkungen von Laquinimod auf dendritische Dornenfortsätze (engl. dendritic spines) im Cup/EAE-Modell zu untersuchen, wurden die Gehirne von je zwei Cup/EAE-Vehicle- und Cup/EAE-Laquinimod-Mäusen aus TEVA 2 für das Golgi-Experiment verwendet. Untersucht wurde der Cortex über dem lateralen Corpus callosum in R215 und R285. Hierzu wurden am Mikroskop (Zeiss Axio Imager M2; ausgestattet mit Kamera: Zeiss Axio Cam) schwarz/weiße, sogenannte "Stacks", in 63x-Vergrößerung (mit Öl) aufgenommen. Dabei handelt es sich um gestapelte Schicht-Aufnahmen im Abstand von je 0,1 µm, aus welchen anschließend ein dreidimensionales Bild zusammengestellt werden kann. Dies erfolgte mit dem Programm "Neurolucida360" von MBF-Bioscience, Williston, VT, USA. Um die Anzahl an Spines pro µm zu bestimmen, wurde zuerst die Länge eines ausgewählten Dendrits bestimmt. Ausgewählt wurden ausschließlich scharf einstell- und gut beurteilbare Dendriten (ohne bspw. umliegende Störfaktoren) nach einem festgelegten Schema. Anschließend wurden die Spines in diesem Abschnitt gezählt. Zwei Schnitte pro Region und Maus wurden ausgewertet. Die Auswertung erfolgte stets verblindet. Pro Hemisphäre wurden drei Dendriten untersucht. Dies ergab eine Gesamtanzahl von 96 ausgewerteten Dendriten. Abbildung 13 zeigt eine Übersichtsaufnahme aus R215 einer Cup/EAE-Vehicle Maus sowie einen Dendriten mit seinen Spines.



**Abbildung 13:** Golgi-gefärbter Schnitt aus R215 mit Darstellung eines Dendrits und seinen Spines. Die ROI ist durch rote Rechtecke markiert. Die roten Sterne zeigen exemplarisch, dass drei Dendriten pro Hemisphäre ausgewertet wurden. Die weißen Pfeilspitzen kennzeichnen die dendritischen Spines.

#### Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm Prism 8 und 9 (Prism 8.4.3, Prism 9.1.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) verwendet.

Hiermit erfolgte nach dem Eingeben der Datensätze eine graphische Gegenüberstellung der Versuchsgruppen. Um die Daten auf Normalverteilung zu überprüfen, wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden anschließend mittels verschiedenen statistischen Tests auf Signifikanz geprüft. Wurden zwei Gruppen, bei welchen die Werte normalverteilt waren, miteinander verglichen, so wurde ein t-Test verwendet. Waren die Werte nicht normalverteilt, wurde ein Mann-Whitney-Test angewandt.

Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean) angegeben. P-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Das Signifikanz-Level wurde mit Sternchen wie folgend gekennzeichnet: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.001, ns = nicht signifikant.

#### 2.6. Anhang

#### 2.6.1. Puffer-, Serum-, Perfusions- und Färbelösungen (SOPs)

## PBS-10x-Pufferlösung (Phosphate Buffered Saline, 10-fach konzentrierte Stocklösung, SOP 1)

1 Dose PBS-Pulver ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (1 Dose = 477.5 g) 5 l destilliertes Wasser

#### PBS-1x-Pufferlösung (1-fach konzentrierte Gebrauchslösung, SOP 2)

500ml PBS-10x (Stocklösung) 5 I destilliertes Wasser Gegebenenfalls den pH-Wert mittels HCl (Salzsäure) bzw. NaOH (Natronlauge) nachbearbeitet, bis ein Wert von 7,4 erreicht wurde

#### Citrat-Pufferlösung (SOP 3)

10.5 g Zitronensäure5 l destilliertes Wasser*pH-Wert auf 6,0 eingestellt* 

#### Tris-EDTA-Pufferlösung (SOP 4)

6.05 g Tris
1.85 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat
5 l destilliertes Wasser *pH-Wert auf 9,0 eingestellt*
# 5% Normales Ziegenserum (SOP 5)

*Verdünnung 1:20* 2,5 ml Normales Ziegenserum 47,5 ml PBS

# Perfusionslösung/Fixierlösung (SOP 6)

100 ml Formaldeyhd (37%)
4,6 g Natriumdihydrogenphosphat (wässrig)
8,0 g Dinatriumhydrogenphosphat
900 ml destilliertes Wasser
pH-Wert auf 7,4 eingestellt

# Mayers Hämalaun (SOP 7)

1 g Hämatoxylin 1000 ml destilliertes Wasser 200 mg Natriumiodat 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure Monohydrat

# Eosinlösung (SOP 8)

1 g Eosin G 100 ml destilliertes Wasser Pro 100 ml 1 Tropfen Essigsäure (1:10 verdünnt) hinzugeben

# 2.6.2. Chemikalien und Materialien

# Chemikalien und Materialien für die Perfusion, Einbettung und Schnittanfertigung

Material/Chemikalien	Beschreibung	Firma	Bestellnummer
B.Braun Omnifix Luer	Spritze 20ml	Braun; Mainz, Deutschland	4616200F
B.Braun Omnifix Luer	Spritze 50ml	Braun; Mainz, Deutschland	22050
Becherglas	1000ml	VWR; Darmstadt, Deutschland	213-1111
Bienenwachs	gelb: rein natürlich	Roth; Karlsruhe, Deutschland	5830.1
Formaldehyd 37%		Roth; Karlsruhe, Deutschland	P733.2
Dinatriumhydrogen- phosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.06580.1000
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fluka, Sigma-Aldrich; Steinheim (DE)	03685

Einbettautomat	Einbettautomat Leica	Leica Biosystems;	ASP200 S
Einbettkästchen mit	Megakassetten, weiß	Medite; Burgdorf,	47-1150-00
Einbettkästchen ohne Deckel		VWR; Darmstadt, Deutschland	1387-4901
Ethanol	EtOH	Merck; Darmstadt, Deutschland	100983
Falcon-Röhrchen	Rotilabo- Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit Beschriftungsfeld; 50 ml	Roth; Karlsruhe, Deutschland	N463.1
Filterpapier	Ø240mm	Schleicher & Schuell; Düren, Deutschland	594 1/2
Formaldehyd	37%	Roth; Karlsruhe, Deutschland	CP10.2
Nadeln	27Gx 3/4; 0,4x20mm	Terumo; Eschborn, Deutschland	NN-2719R
Natriumdihydrogen- phosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck; Darmstadt, Deutschland	1063461000
Natronlauge	NaOH 1 mol/l	Roth; Karlsruhe, Deutschland	K021.1
Objektträger	SuperFrost Plus 25x75x1,0 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-0108
OP-Besteck	Schere, Pinzetten, Stecknadeln		
Paraffin		Merck; Darmstadt, Deutschland	K46815058603
Paraplast		Leica Biosystems; Wetzlar, Deutschland	39602012
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PBS-Pulver ohne Ca2+/Mg2+	Merck (Biochrom); Darmstadt, Deutschland	L-182-50
Safety-Multifly-Kanüle	20G 200mm lang	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland	85.1637.235
Schlittenmikrotom 1 und 2	Leica SM2000R	Leica Biosystems; Wetzlar, Deutschland	045333784
Schlittenmikrotom 3	Leica SM2010R	Leica Biosystems; Wetzlar, Deutschland	050842258
Schottflaschen	1000ml, Enghalsflasche mit Schraubverschluss	VWR; Darmstadt, Deutschland	215-1557
Schottflaschen	2000ml Enghalsflasche mit Schraubverschluss	VWR; Darmstadt, Deutschland	215-1558
Spritze	1 ml	Henke-Sass Wolf GmbH; Tuttlingen, Deutschland	40127200V0
Trichter	Ø250 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	221-1730
Wasserbad	Leica HI1210	Leica Biosystems; Wetzlar, Deutschland	14041521466

Yulal	Isomerisch. Analar	VWR; Darmstadt,	20075 462
Xyloi	Normapur ACS, ISO	Deutschland	20973.402

Tabelle 8: Chemikalien/Materialien für die Perfusion, Einbettung und Schnittanfertigung.

#### Chemikalien und Materialien für die HE-Färbung

Material/Chemikalien	Beschreibung	Firma	Bestellnummer
Aluminiumkalium- sulfat Dodecahydrat	KAI(SO₄)₂·12 H₂O	Merck; Darmstadt, Deutschland	1042
Chloralhydrat		Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland	15307
Deckgläser 40 mm	24x40 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-1573
Deckgläser 50 mm	24x50 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-1574
DPX	DePeX	Serva; Heidelberg, Deutschland	18243.02
Eosin G		Merck; Darmstadt, Deutschland	15935
Essigsäure (Eisessig)		Merck; Darmstadt, Deutschland	1.00063.1000
Ethanol	EtOH	Merck; Darmstadt, Deutschland	100983
Hämatoxylin	$C_{16}H_{14}O_6$ ·x $H_2O$	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland	H3136-25G
Natriumiodat	NaIO₃	Merck; Darmstadt, Deutschland	6525
Xylol	isomerisch. Analar Normapur ACS, ISO	VWR; Darmstadt, Deutschland	28975.462
Zitronensäure Monohydrat	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.00244.0500

Tabelle 9: Chemikalien/Materialien für die HE-Färbung.

#### Chemikalien und Materialien für die Immunhistochemie

Material/Chemikalien	Beschreibung	Firma	Bestellnummer
ABC-Kit	Avidin/Biotin Komplex	Vector; Burlingame, USA	PK-6100
Citrat	Zitronensäure – Puffer	Roth; Karlsruhe, Deutschland	X863.2
DAB-Substrat	Diaminobenzidin	Dako; Glostrup, Dänemark	K3468
DAB-Stock	Diaminobenzidin	Dako; Glostrup, Dänemark	K3468
Deckgläser 40 mm	24x40 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-1573
Deckgläser 50 mm	24x50 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-1574

EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat – Puffer	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland	03609
Eppendorf Pipette 1	0,5-10 μl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	
Eppendorf Pipette 2	10-100 μl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	
Eppendorf Pipette 3	100-1000 μl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	
Eppendorf Spitzen (Tips) 1	0,1-20µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030000.838
Eppendorf Spitzen (Tips) 2	2-200µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030000.870
Eppendorf Spitzen (Tips) 3	50-1000µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030000.919
Eppendorf Tubes 1	1,5 ml	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030120.086
Eppendorf Tubes 2	2,0 ml	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030120.094
Eppendorf Tubes 3	5,0 ml	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030119.401
Ethanol	EtOH	Merck; Darmstadt, Deutschland	100983
HCI	Salzsäure	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.09060.1000
NaOH	Natronlauge	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.09137.1000
Normales Ziegenserum	= normal goat serum	Vector; Burlingame, USA	S-1000
PBS - Phosphate Buffered Saline	PBS Dulbecco-Pulver ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Merck; Darmstadt, Deutschland	L-182-50
Tris (Pufferan <sup>®</sup> )	Puffer	Roth; Karlsruhe, Deutschland	AE15.2
Wasserstoffperoxid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Roth; Karlsruhe, Deutschland	8070.4
Xylol	isomerisch. Analar normapur ACS, ISO	VWR; Darmstadt, Deutschland	28975.462

Tabelle 10: Chemikalien/Materialien für die Immunhistochemie.

# Primäre Antikörper

Antigen	Verdünnung	Klonalität	Spender	Firma	Bestellnummer
ALDH1L1	1:2000	Polyklonal	Hase	Abcam, UK	ab87117
BLBP	1:2000	Polyklonal	Hase	Abcam, UK	ab32423
CD4	1:1000	Monoklonal	Hase	Abcam, UK	ab183685
GFAP	1:8000	Polyklonal	Huhn	Abcam, UK	ab4674
Vimentin	1:200	Monoklonal	Hase	Abcam, UK	ab92547

Tabelle 11: Primäre Antikörper in der Immunhistochemie.

#### Sekundäre Antikörper

Antigen	Sekundärantikörper	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
ALDH1L1	Biotinylierter Ziegen anti-Hase IgG-AK	1:200	Vector; Burlingame, USA	BA1000
BLBP	Biotinylierter Ziegen anti-Hase IgG-AK	1:200	Vector; Burlingame, USA	BA1000
CD4	Biotinylierter Ziegen anti-Hase IgG-AK	1:200	Vector; Burlingame, USA	BA1000
GFAP	Biotinylierter Ziegen anti-Huhn IgG-AK	1:200	Vector; Burlingame, USA	BA9010
Vimentin	Biotinylierter Ziegen anti-Hase IgG-AK	1:200	Vector; Burlingame, USA	BA1000

 Tabelle 12: Sekundäre Antikörper in der Immunhistochemie.

# Chemikalien und Materialien für die Golgi-Färbung

Material/Chemikalien	Beschreibung	Firma	Bestellnummer
Aqua doppelt-dest.	Doppelt-destilliertes Wasser	Roth; Karlsruhe, Deutschland	3478.1
Chromalaun (Kaliumchrom(III)- sulfat Dodecahydrat)	für 3% Gelatine- Chromalaun Objektträger- Beschichtung	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.01036
Deckgläser 40 mm	24x40 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-1573
Deckgläser 50 mm	24x50 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-1574
Ethanol	EtOH	Merck; Darmstadt, Deutschland	100983
Falcon-Röhrchen	Rotilabo- Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit Beschriftungsfeld; 50 ml	Roth; Karlsruhe, Deutschland	N463.1

FD Rapid GolgiStain <sup>™</sup> Kit	Golgi Färbekit	FD NeuroTechnologies INC.; Columbia, USA	PK401
Gelatine	für 3% Gelatine- Chromalaun Objektträger- Beschichtung	Merck; Darmstadt, Deutschland	4078
Isopentan		VWR; Darmstadt, Deutschland	2487229
Kryostat	CM1950 UV	Leica Biosystems; Wetzlar, Deutschland	04774259
Objektträger	Thermo Scientific Superfrost	Menzel; Braunschweig, Deutschland	ABAA000083##32E
Permount	Eindeckmedium	Fisher Scientific; Hampton, USA	SP15-100
Xylol	isomerisch. Analar normapur ACS, ISO	VWR; Darmstadt, Deutschland	28975.462

Tabelle 13: Chemikalien/Materialien für die Golgi-Färbung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Verminderte Astrogliose im Corpus callosum von Laquinimod-behandelten Mäusen

Ein Teil meiner Dissertationsarbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob und wie eine Behandlung mit Laquinimod die im Cuprizone- und im Cup/EAE-Modell entstehende Astrogliose beeinflusst.

Hierzu wurden histologische Schnittpräparate aller Versuchsgruppen aus TEVA 1 gegen die unten genannten Astrozyten-Antigene immunhistochemisch gefärbt.

Im Cuprizone- und im Cup/EAE-Modell zeigte sich eine stark ausgeprägte Expression dieser Proteine. Im Vergleich dazu zeigte die Kontrollgruppe lediglich eine geringe Expression. In Laquinimod-behandelten Tieren fand sich annähernd das Muster der Kontrollgruppe. Abbildungen 14-17 zeigen die Ergebnisse der immunhistochemischen Astrozyten-Färbungen in Region 265 (nach Sidman et al., 1971). Als "region of interest" (ROI) wurde das mediale Corpus callosum (Regionsübersicht siehe Abbildung 9) gewählt.

Vimentin und GFAP (engl. glial fibrillary acidic protein), die zur Gruppe der Intermediärfilamente zählen, sind Bestandteile des Zytoskeletts und werden hauptsächlich von Astrozyten exprimiert (Kamphuis et al., 2015; Wilhelmsson et al., 2019).

Bei BLBP (engl. brain lipid binding protein), auch FABP7 (engl. fatty acid binding protein 7) genannt, handelt es sich um ein zytoplasmatisches Protein, das langkettige Fettsäuren bindet. BLBP wird von radialen Gliazellen, aus welchen u.a. Astrozyten hervorgehen, exprimiert (Kipp et al., 2011).

ALDH1L1 (Aldehyd-Dehydrogenase-1-Familie, Typ L1) ist ein Enzym, das eine zentrale Rolle im Folat-Metabolismus spielt. Dort katalysiert es die oxidative Decarboxylierung von 10-Formyltetrahydrofolat zu Tetrahydrofolat (Horita & Krupenko, 2017). ALDH1L1 ist ein Astrozyten-spezifischer Marker (Cahoy et al., 2008).



Abbildung 14: Vimentin-Expression in Laquinimod- und Vehicle-behandelten Cup- und Cup/EAE-Mäusen in R265. (A) Repräsentative anti-Vimentin-Färbung von Kontrollmäusen und von Laquinimod/Vehicle-behandelten Cuprizone- oder Cup/EAE-Mäusen. Die Pfeilspitze markiert eine Vimentin+ Endothelzelle in einer höheren Vergrößerung. Der Pfeil kennzeichnet einen Vimentin+ Astrozyten. Zu erkennen ist eine massive Astrogliose in Vehicle-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren und eine geringe Astrogliose in Laquinimod-behandelten Mäusen. (B) Densitometrische Auswertung zur Bestimmung der anti-Vimentin-Färbeintensität im medialen Corpus callosum (Kontrolle: n = 5, Cup-Veh: n = 11, Cup-Laq: n = 10, Cup/EAE-Veh: n = 5, Cup/EAE-Laq: n = 5). Threshold "Yen" wurde angewandt. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; \*\*p≤0.01 und \*\*\*\*\*p≤0.0001.



Abbildung 15: GFAP-Expression in Laquinimod- und Vehicle-behandelten Cup- und Cup/EAE-Mäusen in R265. (A) Repräsentative anti-GFAP-Färbung von Kontrollmäusen und von Laquinimod/Vehicle-behandelten Cuprizone- oder Cup/EAE-Mäusen. Die Pfeilspitzen markieren GFAP+ Astrozyten in einer höheren Vergrößerung. Zu erkennen ist eine massive Astrogliose in Vehicle-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren und eine geringe Astrogliose in Laquinimod-behandelten Mäusen. (B) Densitometrische Auswertung zur Bestimmung der anti-GFAP-Färbeintensität im medialen Corpus callosum (Kontrolle: n = 5, Cup-Veh: n = 11, Cup-Laq: n = 10, Cup/EAE-Veh: n = 5, Cup/EAE-Laq: n =5). Threshold "Moments" wurde angewandt. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; \*\*p≤0.01 und \*\*\*\*p≤0.0001.



**Abbildung 16:** BLBP-Expression in Laquinimod- und Vehicle-behandelten Cup- und Cup/EAE-Mäusen in R265. (A) Repräsentative anti-BLBP-Färbung von Kontrollmäusen und von Laquinimod/Vehicle-behandelten Cuprizone- oder Cup/EAE-Mäusen. Die Pfeilspitzen markieren BLBP+ Astrozyten in einer höheren Vergrößerung. Zu erkennen ist eine massive Astrogliose in Vehicle-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren und eine geringe Astrogliose in Laquinimod-behandelten Mäusen. (B) Densitometrische Auswertung zur Bestimmung der anti-BLBP-Färbeintensität im medialen Corpus callosum (Kontrolle: n = 5, Cup-Veh: n = 11, Cup-Laq: n = 10, Cup/EAE-Veh: n = 5, Cup/EAE-Laq: n = 5). Threshold "Percentile" wurde angewandt. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; \*\*p≤0.01 und \*\*\*\*p≤0.0001.



Abbildung 17: ALDH1L1-Expression in Laquinimod- und Vehicle-behandelten Cup- und Cup/EAE-Mäusen in R265. (A) Repräsentative anti-ALDH1L1-Färbung von Kontrollmäusen und von Laquinimod/Vehicle-behandelten Cuprizone- oder Cup/EAE-Mäusen. Die Pfeilspitzen markieren ALDH1L1+ Astrozyten in einer höheren Vergrößerung. Zu erkennen ist eine massive Astrogliose in Vehicle-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren und eine geringe Astrogliose in Laquinimod-behandelten Mäusen. (B) Densitometrische Auswertung zur Bestimmung der anti-ALDH1L1-Färbeintensität im medialen Corpus callosum (Kontrolle: n = 5, Cup-Veh: n = 11, Cup-Laq: n = 10, Cup/EAE-Veh: n = 5, Cup/EAE-Laq: n = 5). Threshold "Default" wurde angewandt. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels t-Test auf statistische Signifikanz geprüft; \*\*\*\*p≤0.0001.

# 3.2. Laquinimod hemmt sekundäre Rekrutierung von Immunzellen ins Großhirn im Cup/EAE-Modell

Studien haben gezeigt, dass im klassischen EAE-Modell entzündliche Läsionen hauptsächlich im Bereich des Kleinhirns und des Rückenmarks vorliegen. Aus der Kombination des Cuprizone- und des EAE-Modells resultiert eine sekundäre Rekrutierung von peripheren Immunzellen zusätzlich ins Telencephalon (Rüther et al., 2017; Scheld et al., 2016).

Um zu untersuchen, ob und wie Laquinimod diese sekundäre Rekrutierung beeinflusst, wurden histologische Schnittpräparate der beiden Versuchsgruppen aus TEVA 2 mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

In den Vehicle-behandelten Mäusen zeigte sich eine stark ausgeprägte Infiltration von Immunzellen ins Telencephalon. Hauptsächlich im Bereich des Cortex, Subcortex und Corpus callosum fanden sich perivaskuläre Zellinfiltrate (engl. perivascular cuffs, PVCs). In den Laquinimod-behandelten Tieren lag im Vergleich eine signifikant-verringerte Anzahl an PVCs vor (siehe Tabelle 14). Abbildung 18 zeigt die graphische Gegenüberstellung der Anzahl an PVCs der mit Laquinimod und Vehicle behandelten Cup/EAE-Mäusen in zwei verschiedenen Hirnregionen (Region 215 und 265 nach Sidman et al., 1971).

Cup/EAE-Vehicle	Anzahl PVCs (MW ± SEM)	Cup/EAE-Laquinimod	Anzahl PVCs (MW ± SEM)
Region 215	2,88 ± 0,46	Region 215	0,31 ± 0,12
Region 265	2,69 ± 0,55	Region 265	0,81 ± 0,29

 Tabelle 14: Anzahl an PVCs in R215 und R265 von Cup/EAE-Vehicle- und Cup/EAE-Laquinimod-Mäusen.

Die sekundäre Immunzellrekrutierung, die in der HE-Färbung durch die Anzahl an PVCs quantifiziert wurde, wurde anschließend immunhistochemisch untersucht. Hierzu wurden die histologischen Schnittpräparate gegen CD4 gefärbt, um die T<sub>h</sub>-Lymphozyten zu detektieren.

Die Anzahl an CD4<sup>+</sup> Zellen war in den Cup/EAE-Laquinimod- im Vergleich zu den Cup/EAE-Vehicle-Mäusen signifikant verringert (siehe Tabelle 15 und Abbildung 19). Diese waren im Cortex, Subcortex und Corpus callosum zu finden, mit einer deutlichen Betonung des medialen und lateralen Corpus callosum.

Cup/EAE-Vehicle	Anzahl CD4 <sup>+</sup> Zellen/mm <sup>2</sup> (MW ± SEM)	Cup/EAE-Laquinimod	Anzahl CD4 <sup>+</sup> Zellen/mm <sup>2</sup> (MW ± SEM)
R215 - mediales CC	163,8 ± 40,37	R215 - mediales CC	4,94 ± 2,08
R215 - laterales CC	320,4 ± 43,06	R215 - laterales CC	4,99 ± 2,13
R265 - mediales CC	247,7 ± 58,67	R265 - mediales CC	27,22 ± 11,00
R265 - laterales CC	257,2 ± 35,74	R265 - laterales CC	6,20 ± 3,04

 Tabelle 15: Anzahl an CD4<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> in R215 und R265 von Cup/EAE-Vehicle- und Cup/EAE-Laquinimod-Mäusen.



Abbildung 18: Laquinimod hemmt sekundäre Immunzellrekrutierung ins Telencephalon im Cup/EAE-Modell. (A) Verteilung von perivaskulären Zellinfiltraten (engl. perivascular cuffs, PVCs) in Vehicle- und Laquinimod-behandelten Cup/EAE-Mäusen. Die schwarzen Punkte markieren die Positionen der PVCs in zwei verschiedenen Hirnregionen (HE-Färbung; Region 215 und 265 nach Sidman et al., 1971). (B) Klassisches PVC in HE-Färbung. (C) Anzahl an PVCs pro Schnitt (Cup/EAE-Veh: n = 8 Tiere, Cup/EAE-Laq: n = 8 Tiere). Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft; \*\*\*p≤0.001, \*\*\*\*p≤0.0001



Abbildung 19: Laquinimod hemmt sekundäre Rekrutierung von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ins Telencephalon im Cup/EAE-Modell. Repräsentative anti-CD4-Färbungen von Vehicle- und Laquinimod-behandelten Cup/EAE-Mäusen in (A) Region 215 und (B) Region 265 (nach Sidman et al., 1971). Die Pfeilköpfe markieren CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>-Lymphozyten in höherer Vergrößerung. (C) Das linke Bild zeigt die histopathologischen Eigenschaften einer inflammatorischen Läsion mit einer Akkumulation von CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>-Lymphozyten (Pfeilkopf) in einer Cup/EAE-Vehicle Maus. Das rechte Bild zeigt diese Läsion in einer HE-Färbung. (D) Anzahl an CD4<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> im medialen und lateralen Corpus callosum in R215 (Cup/EAE-Veh: n = 8, Cup/EAE-Laq: n = 8). (E) Anzahl an CD4<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> im medialen Corpus callosum (Cup/EAE-Veh: n = 8, Cup/EAE-Laq: n = 8) und im lateralen Corpus callosum (Cup/EAE-Veh: n = 8, Cup/EAE-Laq: n = 7) in R265. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in (D) wurden mittels Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft. In (E) links: t-Test; rechts: Mann-Whitney-Test. \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001, \*\*\*\*p≤0.0001

#### 3.3. Histopathologische Eigenschaften eines perivaskulären Infiltrats (PVCs)

Im Cup/EAE-Modell fanden sich, wie oben dargestellt, inflammatorische Läsionen in Form von perivaskulären Infiltraten (PVCs) im Telencephalon.

Um ein einzelnes PVC histopathologisch genauer zu untersuchen, wurde es in den in dieser Arbeit verwendeten Astrozyten-Färbungen dargestellt (siehe Abbildung 20). Die jeweiligen immunhistochemischen Färbungen wurden mittels Negativkontrollen auf Spezifität kontrolliert.

Zu erkennen sind sowohl einzelne Astrozyten in ihrer jeweiligen spezifischen Färbung (siehe auch Kapitel 4.2. Abbildung 23, die die typische Morphologie von Astrozyten zeigt) als auch eine Ansammlung von mehreren Astrozyten, die die sogenannte "Membrana limitans gliae perivascularis" bilden. Hierbei handelt es sich um eine Grenzmembran um die Blutgefäße.



#### 3.4. Protektion von dendritischen Dornenfortsätzen durch Laquinimod im Cup/EAE-Modell

In einem weiteren Teil meiner Dissertationsarbeit befasste ich mich mit der Fragestellung, wie sich die Inflammation bzw. Rekrutierung der Immunzellen auf Dendriten auswirkt, und ob diese pathologischen Veränderungen durch eine Behandlung mit Laquinimod beeinflusst werden.

Hierzu wurden die Gehirne von je zwei Cup/EAE-Vehicle- und Cup/EAE-Laquinimod-Mäusen aus TEVA 2 im Golgi-Experiment (FD Rapid GolgiStain<sup>™</sup> Kit) untersucht. Dabei handelt es sich um eine Silberfärbung, mit welcher die Morphologie von Dendriten dargestellt werden kann. Tabelle 16 zeigt die ausgewertete Anzahl an dendritischen Dornenfortsätzen (engl. Spines) pro µm in Region 215 und Region 285 (nach Sidman et al., 1971). In Region 215 konnte ein protektiver Effekt von Laquinimod festgestellt werden, da sich ein statistisch-signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigte. In Region 285 zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

In den Abbildungen 21 und 22 werden Übersichtsaufnahmen, Dendriten in höherer Vergrößerung und die graphische Gegenüberstellung der Ergebnisse dargestellt.

Cup/EAE-Vehicle	Anzahl Spines/μm (MW ± SEM)	Cup/EAE-Laquinimod	Anzahl Spines/μm (MW ± SEM)
Region 215	1,02 ± 0,04	Region 215	1,18 ± 0,05
Region 285	1,40 ± 0,05	Region 285	1,33 ± 0,05

Tabelle 16: Anzahl an dendritischen Spines/µm in R215 und R285 von Cup/EAE-Vehicle- und Cup/EAE-Laquinimod-Mäusen.



**Abbildung 21:** Repräsentative Golgi-Färbungen der Cup/EAE-Vehicle und Cup/EAE-Laquinimod Mäuse in (A) Region 215 und (B) Region 285 (nach Sidman et al., 1971). Die schwarzen Rechtecke markieren die ROI (region of interest) im Cortex über dem lateralen Corpus callosum. (C) Zeigt zwei Dendriten in höherer Vergrößerung.



Abbildung 22: Protektion von dendritischen Spines durch Laquinimod im Cup/EAE-Modell. (A) Links: Repräsentative Darstellung von Dendriten in der Golgi-Färbung. Rechts: Schematische Darstellung der erfolgten Auswertung. Hierzu wurde die Anzahl an Spines/µm bestimmt. Die weißen Pfeilspitzen markieren einzelne Spines. (B) Anzahl an dendritischen Spines/µm in Region 215 und Region 285 (nach Sidman et al., 1971). in Vehicle- und Laquinimod-behandelten Cup/EAE-Mäusen. Es wurden insgesamt 96 Dendriten ausgewertet (Cup/EAE-Veh: 12 Dendriten pro Region und Maus, n = 2 Tiere; Cup/EAE-Laq: 12 Dendriten pro Region und Maus, n = 2 Tiere). Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels t-Test auf statistische Signifikanz geprüft; \*p≤0.05; ns = nicht signifikant

#### 4. Diskussion

#### 4.1. Mausmodelle zur Erforschung der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Trotz einer bereits weit zurückgehenden Geschichte an intensiven Forschungsarbeiten ist die Ätiologie der Erkrankung noch nicht ausreichend verstanden. Hier würde jedoch der zentrale Ansatz bestehen, um die Multiple Sklerose heilen zu können. Aktuell kann lediglich der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst und die Progression verzögert werden.

Zur Erforschung der Multiplen Sklerose und besonders zur Entwicklung neuer medikamentöser Behandlung bedient man sich u.a. verschiedener Tiermodelle.

Das Cuprizone-Modell eignet sich zur Untersuchung der neurodegenerativen Komponente der Multiplen Sklerose, das EAE-Modell hingegen erforscht den autoimmun-entzündlichen Aspekt. Somit können die jeweiligen Pathologien hervorragend dargestellt werden, hier liegt jedoch auch gleichzeitig der Nachteil der fehlenden Komponente. Während im Cuprizone-Modell eine Krankheitsprogression beobachtet wird, kann, wie bereits in der Einleitung meiner Arbeit erwähnt, mit der EAE-Immunisierung in C57BL/6-Mäusen kein progredienter Verlauf der Erkrankung erzielt werden (Kipp et al., 2017). Dies kann mit der Verwendung anderer - in dieser Arbeit nicht eingesetzter – Mäuse erreicht werden, nämlich den Biozzi-ABH-Mäusen (Al-Izki et al., 2012). Diese wurden im Jahre 1972 von Guido Biozzi erstmals gezüchtet, um die immunpathologischen Mechanismen polygener Erkrankungen zu untersuchen (Amor, Smith, Hart, & Baker, 2005).

Durch die Kombination des Cuprizone- und des EAE-Modells wollte sich unsere Arbeitsgruppe der ganzheitlichen Pathologie der MS nähern und dadurch nicht nur einen Teilaspekt der Erkrankung untersuchen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Cuprizoneinduzierte Degeneration einen Trigger für die periphere Immunzellrekrutierung ins Telencephalon darstellt (Baxi et al., 2015; Chrzanowski et al., 2019; Nedelcu et al., 2020; Rüther et al., 2017; Scheld et al., 2016). Diese Erkenntnisse bekräftigen die sogenannte "Inside-out"-Theorie zur Pathophysiologie der MS (siehe Abbildung 1), wonach es sich bei der Multiplen Sklerose um eine primär neurodegenerative Erkrankung handelt. Auch in meiner Dissertationsarbeit wird dies durch die primäre Wirkung von Laquinimod auf ZNSintrinsische Kaskaden und sekundäre Wirkung auf die periphere Immunzellrekrutierung verdeutlicht (siehe 4.3. Protektive Wirkung von Laquinimod und sekundäre Hemmung der Immunzellrekrutierung).

Derzeit gibt es meines Wissens nach kein Tiermodell, das die gesamte und sehr komplexe Pathologie der Multiplen Sklerose darstellen kann. Einige Vor- und Nachteile sowie Einsatzmöglichkeiten der Tiermodelle wurden bereits angeführt. Weitere Nachteile von Tiermodellen sind der künstliche Mechanismus der Krankheitsinduktion mittels Antigen (im EAE-Modell) bzw. Intoxikation (im Cuprizone-Modell) und der Zeitrahmen bis zum Auftreten klinischer Symptome (Procaccini, De Rosa, Pucino, Formisano, & Matarese, 2015). Dieser Zeitrahmen, der in Tiermodellen meist nur wenige Tage bzw. Wochen beträgt, unterscheidet sich deutlich vom Verlauf der Multiplen Sklerose im menschlichen Organismus. Dort bleibt die Erkrankung die ersten Jahre vor der klinischen Manifestation meist unentdeckt und somit, im Vergleich zu den Tiermodellen, auch unbehandelt (Procaccini et al., 2015).

#### 4.2. Hemmung der Astrozyten-Aktivierung durch Laquinimod

Rund 30% der Gliazellen im ZNS sind Astrozyten (Ponath, Park, & Pitt, 2018). Astrozyten bilden die Membrana gliae limitans superficialis, welche für die Intaktheit der Blut-Hirn-Schranke mitverantwortlich ist und somit eine Einwanderung von peripheren Immunzellen in das ZNS hemmt (Brosnan & Raine, 2013; Horng et al., 2017). Weitere wichtige Funktionen von Astrozyten sind u.a. die Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration und die Aufrechterhaltung der Wasser- und Glutamat-Homöostase (Ransohoff & Brown, 2012; Sofroniew & Vinters, 2010).

Eine grundlegende Fragestellung meiner Dissertationsarbeit war, wie sich eine Behandlung mit Laquinimod im Cuprizone- und Cup/EAE-Modell auf die dort entstehende Astrogliose (siehe Einleitung) auswirkt. Dies erfolgte durch immunhistochemische Färbungen gegen mehrere Antigene, welche von Astrozyten exprimiert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass in Laquinimod-behandelten Mäusen eine deutlich verringerte Reaktivität von Astrozyten im Vergleich zu den Vehicle-Gruppen vorlag.

Der Zusammenhang zwischen einer Behandlung mit Laquinimod und der Astrozyten-Aktivierung wurde bereits in anderen Arbeiten untersucht, die im Folgenden vorgestellt werden.

Abbildung 23 zeigt, wie Astrozyten im ZNS eingeteilt werden können (homöostatischer, reaktiver und protektiver Astrozyt) und die Faktoren, die eine Umwandlung eines Typs in einen anderen bewirken (De Kleijn & Martens, 2020; Miller, 2018). Laquinimod induziert die Umwandlung von reaktiven (A1-Astrozyten) in protektive Astrozyten (A2-Astrozyten) und kann somit die Inflammation im ZNS reduzieren (De Kleijn & Martens, 2020). Meine Vorgänger unserer Arbeitsgruppe konnten einen protektiven Effekt von Laquinimod in vivo mittels PET (Positronen-Emissions-Tomographie) – Aufnahmen zeigen. Dort wurde die Aufnahme des TSPO-Tracers [<sup>18</sup>F]-GE-180 in Vehicle- und Laquinimod- behandelten Cuprizone-Mäusen (Untersuchung nach 5 Wochen: 3 Wochen Cuprizone+Behandlung, gefolgt von 2 Wochen normalem Futter) und in einer Kontrollgruppe (5 Wochen normales Futter) bestimmt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in Vehicle-behandelten Mäusen eine signifikant-erhöhte Aufnahme des Radioligands im Corpus callosum, was in

56

Laquinimod-behandelten Mäusen nicht zu beobachten war (Nedelcu et al., 2020). Das Translokator-Protein (TSPO) wird von der äußeren Mitochondrienmembran exprimiert und findet sich im Cuprizone-Modell hauptsächlich in Astrozyten und Mikrogliazellen (Nack et al., 2019; Zinnhardt et al., 2019).



**Abbildung 23:** Einteilung der Astrozyten-Typen im ZNS und die Umwandlungsvorgänge (mit Pfeilen dargestellt) in einen anderen Typ. Diese werden durch die angeführten Faktoren induziert (in Anlehnung an (De Kleijn & Martens, 2020)).

Ruffini und Kollegen konnten im Striatum von Laquinimod-behandelten EAE-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten EAE-Mäusen keinen Unterschied in der Anzahl und Morphologie von Astrozyten evaluieren. Dort wurde die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis durch eine Immunisierung von weiblichen C57BL/6-Mäusen mit dem MOG<sub>35-55</sub>-Peptid (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein) hervorgerufen und deren histologische Schnittpräparate gegen GFAP gefärbt (Ruffini et al., 2013).

Brück und Kollegen haben sich in den letzten Jahren besonders mit den Auswirkungen und dem Wirkmechanismus von Laquinimod, in welchem Astrozyten eine bedeutende Rolle spielen, beschäftigt. Sie konnten zeigen, dass Laquinimod im Cuprizone-Modell (0,25% Cuprizone-Intoxikation über 1 und 6 Wochen) vor Demyelinisierung, Mikrogliazellen-Aktivierung, axonalem Schaden, reaktiver Astrogliose und Oligodendrozyten-Apoptose schützt (Brück et al., 2012). In ihrer Studie konnte Laquinimod die inflammatorische Reaktion

über den Transkriptionsfaktor NF-κB in Astrozyten signifikant hemmen und wirkte somit protektiv auf Myelin, Oligodendrozyten und Axone. NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor, der für eine schnelle zelluläre Antwort auf verschiedene Stimuli wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Interleukin-1-Beta (IL-1β) und Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) verantwortlich ist. Mit dieser Arbeit wurde erneut die Bedeutung von ZNS-intrinsischen Kaskaden, über welche Laquinimod seine Wirkung entfaltet, im Pathomechanismus der Multiplen Sklerose verdeutlicht (siehe Abbildung 1).

# 4.3. Protektive Wirkung von Laquinimod und sekundäre Hemmung der Immunzellrekrutierung

Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten zeigen, dass eine Verabreichung von Laquinimod die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung und Mikroglia-Aktivierung hemmt (Brück et al., 2012; Nedelcu et al., 2020). Durch diese primär-neuroprotektive Eigenschaft von Laquinimod wurde im Cup/EAE-Modell die sekundäre Immunzellrekrutierung signifikant verringert und die Axone vor Schaden geschützt (Nedelcu et al., 2020).

Ich konnte die Beobachtung meiner Vorgänger, dass eine Behandlung der Cuprizoneinduzierten Pathologien durch Laquinimod sekundär die Immunzellrekrutierung in das Telencephalon hemmt, erfolgreich verifizieren. Wie bereits in der Einleitung meiner Dissertationsarbeit erwähnt, wird Laquinimod als Immunmodulator bezeichnet. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe verdeutlichen, dass es sich bei diesem Medikament nicht nur um eine immunmodulatorische, sondern auch um eine neuroprotektive Substanz handelt. Diese Erkenntnis hat auch besonders bedeutende Konsequenzen für zukünftige Therapieansätze. Hierdurch wird gezeigt, dass Medikamente, die ihre Wirkung primär auf ZNS-intrinsische Vorgänge entfalten, sekundär auch Wirkungen auf das periphere Immunsystem aufweisen können.

In einer anderen interessanten Arbeit mit dem EAE-Modell wurde hingegen gezeigt, wie die Rekrutierung von peripheren Immunzellen eine Neurodegeneration im ZNS zufolge hat (Siffrin et al., 2010). Die Autoren konnten demonstrieren, dass eine direkte Interaktion von MOG-spezifischen Th17-Zellen und Neuronen in demyelinisierenden Läsionen mit erheblichem axonalen Schaden einherging.

Ein grundlegendes Verständnis der Pathophysiologie der Multiplen Sklerose wäre für die Entwicklung einer kurativen Therapie erforderlich. An der Interaktion bzw. Entstehung von autoimmun-entzündlichen und neurodegenerativen Kaskaden sollte weiter geforscht werden. Das Ziel sollte die Erkenntnis, ob es sich bei der MS primär um eine klassische Autoimmunerkrankung der Peripherie mit nachfolgender Neurodegeneration im ZNS oder um eine primär-neurodegenerative Erkrankung des ZNS mit einer sekundären Rekrutierung von Immunzellen aus der Peripherie handelt, sein (siehe Abbildung 1).

#### 4.4. Wirkung von Laquinimod auf dendritische Dornenfortsätze

In einem weiteren Teil meiner Arbeit untersuchte ich, ob eine Verabreichung von Laquinimod die Auswirkungen der Inflammation bzw. der Rekrutierung von Immunzellen auf dendritische Dornenfortsätze (engl. Spines) im Cup/EAE-Modell beeinflusst. Die Golgi-Färbung (FD Rapid GolgiStainTM Kit) erwies sich als eine geeignete Methode, um die Morphologie von Dendriten und somit die Anzahl an dendritischen Spines zu evaluieren. Ich konnte in meiner Dissertationsarbeit einen protektiven Effekt von Laquinimod auf dendritische Spines in einer ausgewählten Hirnregion (Region 215 nach Sidman et al., 1971) feststellen. In der zweiten Region, die untersucht wurde (Region 285), konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden.

Um zu validieren, ob Laquinimod im Cup/EAE-Modell protektive Auswirkungen auf dendritische Dornenfortsätze hat, könnte man den oben beschriebenen Versuchsaufbau (Cup/EAE-Veh-Gruppe und Cup/EAE-Laq-Gruppe) mit einer zusätzlichen Kontrollgruppe und einer jeweils höheren Anzahl an Versuchstieren wiederholen.

Eine andere Arbeit, die sich speziell mit der Auswirkung von Laquinimod auf dendritische Dornenfortsätze befasste, konnte ich in meiner Literaturrecherche nicht finden. Mehrere Arbeiten hingegen, von denen einige im Folgenden kurz vorgestellt werden, haben sich allgemein mit den Pathologien von dendritischen Dornenfortsätzen in der Multiplen Sklerose bzw. mit deren medikamentösen Behandlung beschäftigt.

Jürgens und Kollegen haben mittels der Golgi-Färbung Hirnproben von Patienten mit RRMS und SPMS sowie von Probanden ohne neurologische Erkrankungen untersucht. Die Autoren evaluierten die Dichte an dendritischen Spines in demyelinisierten und nichtdemyelinisierten Arealen in der Insel und dem Frontal-, Temporal- und Okzipitallappen. Es zeigte sich eine über 50% verringerte Dichte an Spines in sowohl demyelinisierten als auch nicht-demyelinisierten Arealen in Multiple Sklerose-Hirnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sie konnten hiermit demonstrieren, dass diese Pathologien unabhängig von der Demyelinisierung auftreten (Jürgens et al., 2016).

Fingolimod, ein verlaufsmodifizierendes Medikament in der Multiplen Sklerose-Therapie (siehe Einleitung), erwies sich als Dendriten-protektiv in MOG<sub>35-55</sub>-induzierten EAE-Mäusen (Rossi et al., 2012). Dort war die Anzahl an dendritischen Spines im Striatum von Fingolimodbehandelten EAE-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten EAE-Mäusen signifikant höher. In Studien mit dem EAE-Modell wurde der Zusammenhang zwischen der Mikrogliazellen-Aktivierung und der Anzahl an dendritischen Spines in der basolateralen Amygdala untersucht (Acharjee & Pittman, 2019; Acharjee et al., 2018). Dort fand in frühen Stadien der EAE keine Aktivierung von Mikrogliazellen statt, während die Anzahl an dendritischen Spines im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war. Die Autoren konnten zeigen, dass durch die Mikrogliazellen-"Deaktivierung" die Anzahl an dendritischen Spines steigt. Diese "Deaktivierung" in einem inflammatorischen MS-Modell ist eine ungewöhnliche Beobachtung und sollte in weiteren Studien näher untersucht werden.

Störungen in der Sensorik und der Sensibilität, besonders zu Beginn der Erkrankung, sind häufige Symptome der Multiplen Sklerose. Yang und Kollegen haben sich mit dem Effekt der Inflammation bzw. der Erhöhung von Zytokinen auf Synapsen im primär-somatosensorischen Cortex im EAE-Modell befasst. Die Autoren konnten zeigen, dass die periphere Produktion des Tumornekrosefaktors-alpha (TNF- $\alpha$ ) eine Instabilität der präsynaptischen Axone und der postsynaptischen Dendriten zufolge hatte. Dies trat zeitlich vor einer T-Zell-Infiltration und Mikrogliazellen-Aktivierung ein. Die periphere Verabreichung eines TNF- $\alpha$ -Hemmers zeigte einen protektiven Effekt auf den Zustand von dendritischen Spines und Axonen. Diese Beobachtungen betonen die Rolle von peripheren Mediatoren in der Entstehung von synaptischer Instabilität im primär-somatosensorischen Cortex, was folglich zu den Symptomen in der Erkrankung führen könnte (G. Yang, Parkhurst, Hayes, & Gan, 2013). Studien zur Untersuchung, ob auch Laquinimod eine protektive Wirkung auf Synapsen bzw. dendritische Spines über die periphere Hemmung von TNF- $\alpha$  zeigt, könnten zur Erkenntnis des genauen Wirkmechanismus der Substanz beitragen.

# 4.5. Immunmodulatorische, neuroprotektive und neurorestaurative Wirkungen von Laquinimod

Laquinimod, ein Quinolon-3-Carboxamid-Derivat, ist eine immunmodulatorische, neuroprotektive und neurorestaurative Substanz, die in der Multiple Sklerose-Forschung geprüft wird (Brück et al., 2012; Kramann et al., 2016; Moore et al., 2013; Nedelcu et al., 2020; Ott et al., 2019). Arbeiten der letzten Jahre haben sich mit dem genauen Wirkmechanismus von Laquinimod beschäftigt (Brück et al., 2012; Brück & Wegner, 2011; Kaye et al., 2016).

In vitro konnte Laquinimod die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) hemmen, während es die antiinflammatorischen Zytokine triggerte (Brück & Wegner, 2011). Diese Zellen stammten sowohl aus Patienten mit RRMS (schubförmig remittierender MS), als auch aus gesunden Probanden.

Joel Kaye und Kollegen konnten mit der Verwendung von Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR)-Knockout-Mäusen zeigen, dass der AhR für die Wirkung von Laquinimod in der MOG<sub>35-55</sub>induzierten EAE essenziell ist (Kaye et al., 2016). Der AhR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, über welchen die Differenzierung und Funktion vieler Zellpopulationen in einer Inflammationsreaktion gesteuert wird. Weiterhin konnten sie in ihrer Arbeit mittels Knochenmark-Chimären demonstrieren, dass eine Deletion von AhR im Immunsystem die protektive Wirkung von Laquinimod vollständig aufhebt. Im Gegensatz dazu wurde durch eine Deletion von AhR innerhalb des ZNS die Wirkung nur teilweise aufgehoben.

Lühder und Kollegen haben die Auswirkung von Laquinimod auf die Blut-Hirn-Schranke und die T-Zell-Infiltration ins ZNS untersucht. Laquinimod hatte dort die Expression von Tight-Junction-Proteine in Endothelzellen des menschlichen Gehirns erhöht, während es inflammatorische Chemokine hemmte (Lühder et al., 2017). Durch diesen Effekt von Laquinimod wurde die Blut-Hirn-Schranke gefestigt und somit die Invasion von T-Lymphozyten ins ZNS verringert.

Laquinimod wird jedoch nicht nur in der Multiple Sklerose-Forschung geprüft. Auch in Modellen der Chorea-Huntington (Ellrichmann et al., 2017; Garcia-Miralles et al., 2019) und des Schädel-Hirn-Traumas (Katsumoto et al., 2018) zeigte Laquinimod protektive Effekte. Im Schädel-Hirn-Trauma-Modell beispielsweise konnte eine Verabreichung von Laquinimod neben einer Triggerung der Neurogenese das Läsionsvolumen und den axonalen Schaden reduzieren (Katsumoto et al., 2018). Die Autoren dieser Arbeit konnten eine Inhibition der Monozyten-Infiltration ins ZNS durch Laquinimod beobachten.

Zusammenfassend ist Laquinimod aufgrund der hier beschriebenen neuroprotektiven, neurorestaurativen und immunmodulatorischen Eigenschaften und seinem guten Nebenwirkungsprofil in klinischen Studien (siehe Einleitung) eine hoffnungsvolle Substanz in der Multiple Sklerose-Forschung. Andererseits muss auch Kritik an Laquinimod geübt werden, da gewisse Ziele, wie die Schubrate in der eingangs erwähnten Phase III - "BRAVO" -Studie signifikant zu reduzieren, nicht erreicht wurden. Es werden und sollten zukünftig noch weitere Studien, die Laquinimod bzw. den Wirkmechanismus der Substanz näher untersuchen, folgen.

Die nachfolgende Tabelle zeigt abschließend eine Übersicht an ausgewählten Arbeiten, welche sich mit der protektiven Wirkung von Laquinimod beschäftigt haben.

Autoren	Jahr	Journal	Titel/Ergebnisse
J. S. Yang et al.	2004	Journal of Neuroimmunology	Laquinimod (ABR-215062) unterdrückt
			die Entstehung der
			experimentellen autoimmunen
			Enzephalomyelitis, moduliert das
			Th1/Th2 Gleichgewicht und
			induziert das Th3-Zytokin TGF-
			beta in Lewis-Ratten
Polman et al.	2005	Neurology	Die Behandlung mit Laquinimod
			reduziert die Entstehung von aktiven
			MRI-Läsionen in der RRMS
Comi et al.	2008	Lancet	Effekt von Laquinimod auf die MRI-
			dargestellte Krankheitsaktivität in

			Patienten mit RRMS: eine
			multizentrische, randomisierte, doppelt-
			verblindete, Placebo-kontrollierte Phase
			IIb-Studie
			Laquinimod interferiert mit der
			Migrationskapazität von T-Zellen und
		lawrad of	reduziert den IL-17 Spiegel,
Wegner et al.	2010	Journal of	inflammatorische Demyelinisierung und
_		Neuroimmunology	akuten axonalen Schaden in Mäusen mit
			experimenteller autoimmuner
			Enzephalomyelitis
		Expert Opinion on	Laquinimod: eine vielversprechende
Thöne & Gold	2011	Drug Metabolism &	orale Medikation zur Behandlung von
		Toxicology	RRMS
Drück 9		Journal of the	Finhlick in dan Wirkmachanismus von
Bruck &	2011	Neurological	
wegner		Sciences	Laquinimod
		Amorican Journal of	Laquinimod moduliert die autoimmune
Thöne et al.	2012	Pathology	Demyelinisierung über die Induktion des
		Pathology	Wachstumsfaktors BDNF
			Die reduzierte Aktivierung von NF-κB in
Brück et al	2012	Acta	Astrozyten durch Laquinimod schützt
Didek et al.	2012	Neuropathologica	vor der Cuprizone-induzierten
			Demyelinisierung
Comi et al	2012	The New England	Eine Placebo-kontrollierte Studie von
	2012	Journal of Medicine	Laquinimod in der Multiplen Sklerose
			Die therapeutische Behandlung mit
			Laquinimod reduziert Inflammation,
Moore et al	2013	Brain and Behavior	initiiert Axon-Remyelinisierung und
	2010		verbessert motorische Defizite in einem
			Multiple Sklerose-Mausmodell
			Laquinimod unterbindet
Ruffini et al.	2013	Multiple Sclerosis	inflammatorisch-induzierte synaptische
		Journal	Veränderungen in der experimentellen
			autoimmunen Enzephalomyelitis
			Eine randomisierte Placebo-kontrollierte
Vollmer et al.	2014	Journal of Neurology	Phase III-Studie von Laquinimod in der
			Multiplen Sklerose
		Drug Design,	Molekulare Pharmakodynamik von
di Nuzzo et al.	2014	Development and	neuen oralen Medikamenten in der
		Therapy	Behandlung von Multiple Sklerose
		Neurology	Laquinimod unterbindet die Cuprizone-
Kramann et al	2016	Neuroimmunology &	Induzierte Demyelinisierung unabhängig
		Neuroinflammation	von Signalwegen über Toll-like-
	_		Rezeptoren.
Kaye et al.	2016	Proceedings of the	Laquinimod hemmt die experimentelle

		National Academy of Sciences of the United States of America	autoimmune Enzephalomyelitis über eine Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon- Rezeptors
Ellrichmann et al.	2017	Scientific Reports	Die Behandlung mit Laquinimod im R6/2 Maus-Modell
Lühder et al.	2017	Neurobiology of Disease	Laquinimod stärkt die Schrankenfunktion im zentralen Nervensystem
Katsumoto et al.	2018	Journal of Neuroinflammation	Laquinimod schwächt über eine Modulierung der Makrophagen-Funktion die Inflammation in einem Hirn-Trauma- Mausmodell ab
Garcia- Miralles et al.	2019	Molecular Neurobiology	Die Behandlung mit Laquinimod verbessert die Myelinisierung auf Transkriptions- und Ultrastrukturebene im YAC128-Mausmodell für Chorea- Huntington
Ott et al.	2019	Journal of Neuroinflammation	Laquinimod, ein prototypischer Quinolon-3-Carboxamid- und Aryl- Hydrocarbon-Rezeptor Agonist, unterdrückt die Autoimmunität im ZNS über eine CD155-vermittelte Interaktion von natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen
Nedelcu et al.	2020	Neurobiology of Disease	Laquinimod hemmt die sekundäre Inflammation im Gehirn
Derfuss et al.	2020	The Lancet Neurology	Fortschritte in der oralen immunmodulatorischen Therapie in der RRMS
De Kleijn & Martens	2020	International Journal of Molecular Sciences	Molekulare Effekte von FDA- zugelassenen Multiple Sklerose- Medikamenten auf Gliazellen und Neurone im zentralen Nervensystem

 Tabelle 17: Auswahl an Arbeiten, die sich mit der protektiven Wirkung von Laquinimod beschäftigt haben.

#### 5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Trotz intensiver Forschung sind die Ätiologie und die genaue Pathophysiologie nicht ausreichend geklärt. Studien konnten zeigen, dass eine ZNS-intrinsische Neurodegeneration die periphere Immunzellrekrutierung in das ZNS triggert. Laquinimod, ein oral-applizierbares Quinolon-3-Carboxamid-Derivat, wird derzeit in der Multiplen Sklerose-Therapie geprüft. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Laquinimod die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung und Mikrogliazellen-Aktivierung hemmt und im Cuprizone/EAE-Modell vor einer sekundären Immunzellrekrutierung in das ZNS und vor axonalem Schaden schützt. In meiner Arbeit wollte ich die Hypothese einer Hemmung der sekundären Immunzellrekrutierung war, wie sich eine Behandlung durch Laquinimod auf die dendritischen Dornenfortsätze im ZNS von Cuprizone/EAE-Mäusen auswirkt.

Die Neurodegeneration wurde durch eine 3-wöchige Intoxikation von weiblichen C57BL/6-Mäusen mit Cuprizone (Cup), einem Kupfer-Chelator, induziert. Während diesem Zeitraum wurden den Mäusen täglich entweder Laquinimod oder Vehicle als Trägersubstanz (Ultra Pure Water) oral verabreicht. Darauf folgten 2 Wochen normales Futter, bevor die Mäuse in der 6. Woche mit dem Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)<sub>35-55</sub> – Peptid immunisiert wurden, was die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) induzierte (Cup/EAE-Modell). Es wurden histologische Schnittpräparate angefertigt, diese gegen verschiedene Proteine immunhistochemisch gefärbt und nach stereologischen Gesichtspunkten ausgewertet. Mittels einer speziellen Silberfärbung, Golgi-Färbung genannt, wurden die Dendriten bzw. deren Dornenfortsätze im ZNS beurteilt.

Vehicle-behandelte Cuprizone- und Cup/EAE-Mäuse zeigten eine massive Astrogliose im Corpus callosum, welche in Laquinimod-behandelten Tieren nur leicht ausgeprägt war. In Laquinimod-behandelten Cup/EAE-Mäusen konnte eine beobachtete sekundäre Immunzellrekrutierung in das Telencephalon im Vergleich zu Vehicle signifikant reduziert werden. Weiterhin zeigte Laquinimod im Cup/EAE-Modell einen protektiven Effekt auf die Anzahl an dendritischen Dornenfortsätze (Spines) im Cortex in einer der zwei ausgewerteten Hirnregionen.

Wir konnten zeigen, dass durch die Protektion vor einer primär ZNS-intrinsischen Pathologie sekundär die Immunzellrekrutierung und somit die Entstehung inflammatorischer Läsionen gehemmt werden kann. Die in der Literatur häufig verwendete Bezeichnung "Immunmodulator" beschreibt folglich nur einen Teilaspekt der Potenz von Laquinimod, da es sich hierbei auch um eine neuroprotektive Substanz handelt.

64

# III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zwei wesentliche Theorien zur Pathophysiologie der MS.	9
Abbildung 2: Strukturformel von Laquinimod (di Nuzzo et al., 2014).	10
Abbildung 3: Darstellung von Dendriten mit ihren Dornenfortsätzen (engl. Spines) in d Golgi-Färbung.	ler 12
Abbildung 4: Einteilung der dendritischen Spines nach ihrer typischen Morphologie.	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Behinderungsprogression von C57BL/6-Mäusen nach Immunisierung mit dem Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)25 55 – Pentid	15
	13
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung der Versuchsgruppen der beiden Tierversuche TEVA 1 und TEVA 2 (Erklärung siehe Fließtext).	19
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Immunhistochemie.	23
Abbildung 8: Darstellung der Region 215 (nach Sidman et al., 1971).	31
Abbildung 9: Darstellung der Region 265 (nach Sidman et al., 1971).	31
Abbildung 10: Darstellung eines perivaskulären Infiltrats (PVC) in einem HE-gefärbten Schnitt.	32
Abbildung 11: CD4 <sup>+</sup> Zellen im lateralen CC aus R215.	32
Abbildung 12: Densitometrische Auswertung (Erklärung siehe Fließtext).	33
Abbildung 13: Golgi-gefärbter Schnitt aus R215 mit Darstellung eines Dendrits und seinen Spines.	35
<b>Abbildung 14:</b> Vimentin-Expression in Laquinimod- und Vehicle-behandelten Cup- und Cup/EAE-Mäusen in R265.	44
Abbildung 15: GFAP-Expression in Laquinimod- und Vehicle-behandelten Cup- und Cup/EAE-Mäusen in R265.	45
Abbildung 16: BLBP-Expression in Laquinimod- und Vehicle-behandelten Cup- und Cup/EAE-Mäusen in R265.	46

Abbildung 17: ALDH1L1-Expression in Laquinimod- und Vehicle-behandelten	
Cup- und Cup/EAE-Mäusen in R265.	47
Abbildung 18: Laquinimod hemmt sekundäre Immunzellrekrutierung ins	
Telencephalon im Cup/EAE-Modell.	49
Abbildung 19: Laquinimod hemmt sekundäre Rekrutierung von	
CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten ins Telencephalon im Cup/EAE-Modell.	50
Abbildung 20: Histopathologische Eigenschaften eines perivaskulären	
Infiltrats (PVCs) in einer Cup/EAE-Maus.	51
Abbildung 21: Repräsentative Golgi-Färbungen der Cup/EAE-Vehicle und Cup/EAE-	
Laquinimod Mäuse in (A) Region 215 und (B) Region 285 (nach Sidman et al., 1971).	53
Abbildung 22: Protektion von dendritischen Spines durch Laquinimod im	
Cup/EAE-Modell.	54
Abbildung 23: Einteilung der Astrozyten-Typen im ZNS und die	
Umwandlungsvorgänge (mit Pfeilen dargestellt) in einen anderen Typ.	57

# IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf der Dehydrierung und Paraffineinbettung.	20
Tabelle 2: Ablauf der Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte.	21
Tabelle 3: Ablauf der Dehydrierung der Schnitte in der HE-Färbung.	22
Tabelle 4: Ablauf der Dehydrierung der Schnitte in der IHC.	25
Tabelle 5: Durchführung einer immunhistochemischen Färbung im Überblick.	27
Tabelle 6: Schneidephase im Golgi-Experiment.	29
Tabelle 7: Färbephase im Golgi-Experiment.	30
Tabelle 8: Chemikalien/Materialien f        Chemikalien/Materialien f          Schnittanfertigung.	39
Tabelle 9: Chemikalien/Materialien für die HE-Färbung.	39
Tabelle 10: Chemikalien/Materialien für die Immunhistochemie.	40
Tabelle 11: Primäre Antikörper in der Immunhistochemie.	41
Tabelle 12: Sekundäre Antikörper in der Immunhistochemie.	41
Tabelle 13: Chemikalien/Materialien für die Golgi-Färbung.	42
Tabelle 14: Anzahl an PVCs in R215 und R265 von Cup/EAE-Vehicle- und Cup/EAE-Laquinimod-Mäusen.	48
Tabelle 15: Anzahl an CD4+ Zellen/mm² in R215 und R265 von Cup/EAE-Vehicle- undCup/EAE-Laquinimod-Mäusen.	48
<b>Tabelle 16:</b> Anzahl an dendritischen Spines/μm in R215 und R285 von Cup/EAE-Vehicle- und Cup/EAE-Laquinimod-Mäusen.	52
Tabelle 17: Auswahl an Arbeiten, die sich mit der protektiven Wirkung von Laquinimo	d
beschäftigt haben.	63

#### V. Literaturverzeichnis

- Acharjee, S., & Pittman, Q. J. (2019). Unexpected Microglial "De-activation" Associated With Altered Synaptic Transmission in the Early Stages of an Animal Model of Multiple Sclerosis. *J Exp Neurosci, 13*, 1179069519825882. doi:10.1177/1179069519825882
- Acharjee, S., Verbeek, M., Gomez, C. D., Bisht, K., Lee, B., Benoit, L., . . . Pittman, Q. J. (2018).
   Reduced Microglial Activity and Enhanced Glutamate Transmission in the Basolateral Amygdala in Early CNS Autoimmunity. *J Neurosci, 38*(42), 9019-9033. doi:10.1523/jneurosci.0398-18.2018
- Al-Izki, S., Pryce, G., O'Neill, J. K., Butter, C., Giovannoni, G., Amor, S., & Baker, D. (2012). Practical guide to the induction of relapsing progressive experimental autoimmune encephalomyelitis in the Biozzi ABH mouse. *Mult Scler Relat Disord*, 1(1), 29-38. doi:10.1016/j.msard.2011.09.001
- Amor, S., Smith, P. A., Hart, B., & Baker, D. (2005). Biozzi mice: of mice and human neurological diseases. J Neuroimmunol, 165(1-2), 1-10. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.04.010
- Barnett, M. H., & Prineas, J. W. (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol,* 55(4), 458-468. doi:10.1002/ana.20016
- Baxi, E. G., DeBruin, J., Tosi, D. M., Grishkan, I. V., Smith, M. D., Kirby, L. A., . . . Gocke, A. R. (2015). Transfer of myelin-reactive th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice. *J Neurosci, 35*(22), 8626-8639. doi:10.1523/jneurosci.3817-14.2015
- Behrangi, N., Fischbach, F., & Kipp, M. (2019). Mechanism of Siponimod: Anti-Inflammatory and Neuroprotective Mode of Action. *Cells*, 8(1). doi:10.3390/cells8010024
- Brosnan, C. F., & Raine, C. S. (2013). The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*, *61*(4), 453-465. doi:10.1002/glia.22443
- Brownlee, W. J., Hardy, T. A., Fazekas, F., & Miller, D. H. (2017). Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*, 389(10076), 1336-1346. doi:10.1016/s0140-6736(16)30959-x
- Brück, W., Pförtner, R., Pham, T., Zhang, J., Hayardeny, L., Piryatinsky, V., . . . Wegner, C. (2012). Reduced astrocytic NF-κB activation by laquinimod protects from cuprizoneinduced demyelination. *Acta Neuropathol, 124*(3), 411-424. doi:10.1007/s00401-012-1009-1
- Brück, W., & Wegner, C. (2011). Insight into the mechanism of laquinimod action. *J Neurol Sci, 306*(1-2), 173-179. doi:10.1016/j.jns.2011.02.019
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., . . .
   Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci, 28*(1), 264-278. doi:10.1523/jneurosci.4178-07.2008

Cajal, S.R. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm. Patol.*, 1, pp. 1-10

- Carlton, W. W. (1966). Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol, 8*(3), 512-521. doi:10.1016/0041-008x(66)90062-7
- Carlton, W. W. (1967). Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci, 6*(1), 11-19. doi:10.1016/0024-3205(67)90356-6
- Chrzanowski, U., Bhattarai, S., Scheld, M., Clarner, T., Fallier-Becker, P., Beyer, C., . . . Kipp, M. (2019). Oligodendrocyte degeneration and concomitant microglia activation directs peripheral immune cells into the forebrain. *Neurochem Int, 126*, 139-153. doi:10.1016/j.neuint.2019.03.005
- Comi, G., Jeffery, D., Kappos, L., Montalban, X., Boyko, A., Rocca, M. A., & Filippi, M. (2012). Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med*, *366*(11), 1000-1009. doi:10.1056/NEJMoa1104318
- Comi, G., Pulizzi, A., Rovaris, M., Abramsky, O., Arbizu, T., Boiko, A., . . . Filippi, M. (2008). Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsingremitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebocontrolled phase IIb study. *Lancet*, *371*(9630), 2085-2092. doi:10.1016/s0140-6736(08)60918-6
- De Kleijn, K. M. A., & Martens, G. J. M. (2020). Molecular Effects of FDA-Approved Multiple Sclerosis Drugs on Glial Cells and Neurons of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci, 21*(12). doi:10.3390/ijms21124229
- Derfuss, T., Mehling, M., Papadopoulou, A., Bar-Or, A., Cohen, J. A., & Kappos, L. (2020). Advances in oral immunomodulating therapies in relapsing multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, *19*(4), 336-347. doi:10.1016/s1474-4422(19)30391-6
- Di Filippo, M., Portaccio, E., Mancini, A., & Calabresi, P. (2018). Multiple sclerosis and cognition: synaptic failure and network dysfunction. *Nat Rev Neurosci, 19*(10), 599-609. doi:10.1038/s41583-018-0053-9
- di Nuzzo, L., Orlando, R., Nasca, C., & Nicoletti, F. (2014). Molecular pharmacodynamics of new oral drugs used in the treatment of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther, 8*, 555-568. doi:10.2147/ddt.S52428
- Doan, V., Kleindienst, A. M., McMahon, E. J., Long, B. R., Matsushima, G. K., & Taylor, L. C. (2013). Abbreviated exposure to cuprizone is sufficient to induce demyelination and oligodendrocyte loss. J Neurosci Res, 91(3), 363-373. doi:10.1002/jnr.23174
- Draheim, T., Liessem, A., Scheld, M., Wilms, F., Weißflog, M., Denecke, B., . . . Clarner, T. (2016). Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia*, 64(12), 2219-2230. doi:10.1002/glia.23058
- Dutta, R., & Trapp, B. D. (2014). Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. *Curr Opin Neurol, 27*(3), 271-278. doi:10.1097/wco.00000000000094

- Ellrichmann, G., Blusch, A., Fatoba, O., Brunner, J., Reick, C., Hayardeny, L., . . . Gold, R. (2017). Laquinimod treatment in the R6/2 mouse model. *Sci Rep, 7*(1), 4947. doi:10.1038/s41598-017-04990-1
- García-López, P., García-Marín, V., & Freire, M. (2007). The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Prog Neurobiol, 83*(2), 110-130. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.06.002
- Garcia-Miralles, M., Yusof, N., Tan, J. Y., Radulescu, C. I., Sidik, H., Tan, L. J., . . . Pouladi, M. A. (2019). Laquinimod Treatment Improves Myelination Deficits at the Transcriptional and Ultrastructural Levels in the YAC128 Mouse Model of Huntington Disease. *Mol Neurobiol*, *56*(6), 4464-4478. doi:10.1007/s12035-018-1393-1
- Geurts, J. J., Kooi, E. J., Witte, M. E., & van der Valk, P. (2010). Multiple sclerosis as an "inside-out" disease. *Ann Neurol, 68*(5), 767-768; author reply 768. doi:10.1002/ana.22279
- Golgi, C. (1873). Sulla sostanza grigia del cervello. Gaz. Med. Ital. Lombardia, 6, pp. 244-246
- Graf, J., Albrecht, P., Goebels, N., Aktas, O., & Hartung, H. P. (2020). [Ocrelizumab for treatment of multiple sclerosis]. *Nervenarzt, 91*(8), 722-734. doi:10.1007/s00115-020-00937-6
- Große-Veldmann, R., Becker, B., Amor, S., van der Valk, P., Beyer, C., & Kipp, M. (2016). Lesion Expansion in Experimental Demyelination Animal Models and Multiple Sclerosis Lesions. *Mol Neurobiol*, *53*(7), 4905-4917. doi:10.1007/s12035-015-9420-y
- Hart, F. M., & Bainbridge, J. (2016). Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care, 22*(6 Suppl), s159-170.
- Harting, I., Sellner, J., Meyding-Lamadé, U., & Sartor, K. (2003). [Multiple sclerosis: imaging, diagnostic criteria and differential diagnosis]. *Rofo, 175*(5), 613-622. doi:10.1055/s-2003-39198
- Herms, J., & Dorostkar, M. M. (2016). Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Pathol, 11*, 221-250. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044216
- Hiremath, M. M., Saito, Y., Knapp, G. W., Ting, J. P., Suzuki, K., & Matsushima, G. K. (1998). Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. J Neuroimmunol, 92(1-2), 38-49. doi:10.1016/s0165-5728(98)00168-4
- Hochstrasser, T., Exner, G. L., Nyamoya, S., Schmitz, C., & Kipp, M. (2017). Cuprizone-Containing Pellets Are Less Potent to Induce Consistent Demyelination in the Corpus Callosum of C57BL/6 Mice. J Mol Neurosci, 61(4), 617-624. doi:10.1007/s12031-017-0903-3
- Horita, D. A., & Krupenko, S. A. (2017). Modeling of interactions between functional domains of ALDH1L1. *Chem Biol Interact, 276,* 23-30. doi:10.1016/j.cbi.2017.04.011
- Horng, S., Therattil, A., Moyon, S., Gordon, A., Kim, K., Argaw, A. T., . . . John, G. R. (2017). Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J Clin Invest*, 127(8), 3136-3151. doi:10.1172/jci91301
- Jersild, C., Svejgaard, A., & Fog, T. (1972). HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*, 1(7762), 1240-1241. doi:10.1016/s0140-6736(72)90962-2

- Jürgens, T., Jafari, M., Kreutzfeldt, M., Bahn, E., Brück, W., Kerschensteiner, M., & Merkler,
   D. (2016). Reconstruction of single cortical projection neurons reveals primary spine
   loss in multiple sclerosis. *Brain*, 139(Pt 1), 39-46. doi:10.1093/brain/awv353
- Kamphuis, W., Kooijman, L., Orre, M., Stassen, O., Pekny, M., & Hol, E. M. (2015). GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia*, 63(6), 1036-1056. doi:10.1002/glia.22800
- Katsumoto, A., Miranda, A. S., Butovsky, O., Teixeira, A. L., Ransohoff, R. M., & Lamb, B. T. (2018). Laquinimod attenuates inflammation by modulating macrophage functions in traumatic brain injury mouse model. *J Neuroinflammation*, 15(1), 26. doi:10.1186/s12974-018-1075-y
- Kaye, J., Piryatinsky, V., Birnberg, T., Hingaly, T., Raymond, E., Kashi, R., . . . Laufer, R. (2016).
   Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A, 113*(41), E6145-e6152. doi:10.1073/pnas.1607843113
- Keegan, B. M., & Noseworthy, J. H. (2002). Multiple sclerosis. *Annu Rev Med, 53*, 285-302. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103909
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. Acta Neuropathol, 118(6), 723-736. doi:10.1007/s00401-009-0591-3
- Kipp, M., Gingele, S., Pott, F., Clarner, T., van der Valk, P., Denecke, B., . . . Beyer, C. (2011).
   BLBP-expression in astrocytes during experimental demyelination and in human multiple sclerosis lesions. *Brain Behav Immun, 25*(8), 1554-1568. doi:10.1016/j.bbi.2011.05.003
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models:
   a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol, 27*(2), 123-137.
   doi:10.1111/bpa.12454
- Kipp, M., van der Valk, P., & Amor, S. (2012). Pathology of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *11*(5), 506-517. doi:10.2174/187152712801661248
- Kramann, N., Menken, L., Hayardeny, L., Hanisch, U. K., & Brück, W. (2016). Laquinimod prevents cuprizone-induced demyelination independent of Toll-like receptor signaling. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 3*(3), e233. doi:10.1212/nxi.00000000000233
- Kurtzke, J. F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), 1444-1452. doi:10.1212/wnl.33.11.1444
- Kurtzke, J. F. (2015). On the origin of EDSS. *Mult Scler Relat Disord, 4*(2), 95-103. doi:10.1016/j.msard.2015.02.003
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of

demyelination. *Ann Neurol,* 47(6), 707-717. doi:10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q

- Lucchinetti, C. F., Popescu, B. F., Bunyan, R. F., Moll, N. M., Roemer, S. F., Lassmann, H., . . . Ransohoff, R. M. (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*, *365*(23), 2188-2197. doi:10.1056/NEJMoa1100648
- Lühder, F., Kebir, H., Odoardi, F., Litke, T., Sonneck, M., Alvarez, J. I., . . . Prat, A. (2017). Laquinimod enhances central nervous system barrier functions. *Neurobiol Dis, 102*, 60-69. doi:10.1016/j.nbd.2017.02.002
- Marrie, R. A. (2004). Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol*, 3(12), 709-718. doi:10.1016/s1474-4422(04)00933-0
- Miller, S. J. (2018). Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System. *Front Cell Neurosci, 12,* 401. doi:10.3389/fncel.2018.00401
- Moore, S., Khalaj, A. J., Yoon, J., Patel, R., Hannsun, G., Yoo, T., . . . Tiwari-Woodruff, S. K. (2013). Therapeutic laquinimod treatment decreases inflammation, initiates axon remyelination, and improves motor deficit in a mouse model of multiple sclerosis. *Brain Behav*, *3*(6), 664-682. doi:10.1002/brb3.174
- Nack, A., Brendel, M., Nedelcu, J., Daerr, M., Nyamoya, S., Beyer, C., . . . Kipp, M. (2019). Expression of Translocator Protein and [18F]-GE180 Ligand Uptake in Multiple Sclerosis Animal Models. *Cells*, 8(2). doi:10.3390/cells8020094
- Nedelcu, J., Reinbach, C., Riedler, P., Brendel, M., Rominger, A., Kaye, J., . . . Kipp, M. (2020). Laquinimod ameliorates secondary brain inflammation. *Neurobiol Dis, 134*, 104675. doi:10.1016/j.nbd.2019.104675
- Nicholas, R., & Rashid, W. (2013). Multiple sclerosis. Am Fam Physician, 87(10), 712-714.
- Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L. (2017). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, *13*(1), 25-36. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
- Otero-Romero, S., Sastre-Garriga, J., Comi, G., Hartung, H. P., Soelberg Sørensen, P., Thompson, A. J., . . . Montalban, X. (2016). Pharmacological management of spasticity in multiple sclerosis: Systematic review and consensus paper. *Mult Scler, 22*(11), 1386-1396. doi:10.1177/1352458516643600
- Ott, M., Avendaño-Guzmán, E., Ullrich, E., Dreyer, C., Strauss, J., Harden, M., . . . Nessler, S. (2019). Laquinimod, a prototypic quinoline-3-carboxamide and aryl hydrocarbon receptor agonist, utilizes a CD155-mediated natural killer/dendritic cell interaction to suppress CNS autoimmunity. *J Neuroinflammation*, *16*(1), 49. doi:10.1186/s12974-019-1437-0
- Patsopoulos, N. A., Barcellos, L. F., Hintzen, R. Q., Schaefer, C., van Duijn, C. M., Noble, J. A., .
  . de Bakker, P. I. (2013). Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet*, 9(11), e1003926. doi:10.1371/journal.pgen.1003926
- Polman, C., Barkhof, F., Sandberg-Wollheim, M., Linde, A., Nordle, O., & Nederman, T. (2005). Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS. *Neurology*, 64(6), 987-991. doi:10.1212/01.Wnl.0000154520.48391.69
- Ponath, G., Park, C., & Pitt, D. (2018). The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*, 9, 217. doi:10.3389/fimmu.2018.00217
- Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol,* 759, 182-191. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.042
- Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest, 122*(4), 1164-1171. doi:10.1172/jci58644
- Ray, A., Basu, S., Williams, C. B., Salzman, N. H., & Dittel, B. N. (2012). A novel IL-10independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol, 188*(7), 3188-3198. doi:10.4049/jimmunol.1103354
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, *378*(2), 169-180. doi:10.1056/NEJMra1401483
- Rivers, T. M., Sprunt, D. H., & Berry, G. P. (1933). OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med*, 58(1), 39-53. doi:10.1084/jem.58.1.39
- Rossi, S., Lo Giudice, T., De Chiara, V., Musella, A., Studer, V., Motta, C., . . . Centonze, D. (2012). Oral fingolimod rescues the functional deficits of synapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Br J Pharmacol, 165*(4), 861-869. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01579.x
- Ruffini, F., Rossi, S., Bergamaschi, A., Brambilla, E., Finardi, A., Motta, C., . . . Martino, G. (2013). Laquinimod prevents inflammation-induced synaptic alterations occurring in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler, 19*(8), 1084-1094. doi:10.1177/1352458512469698
- Runia, T. F., van Pelt-Gravesteijn, E. D., & Hintzen, R. Q. (2012). Recent gains in clinical multiple sclerosis research. CNS Neurol Disord Drug Targets, 11(5), 497-505. doi:10.2174/187152712801661239
- Rüther, B. J., Scheld, M., Dreymueller, D., Clarner, T., Kress, E., Brandenburg, L. O., . . . Kipp,
   M. (2017). Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia*, 65(12), 1900-1913. doi:10.1002/glia.23202
- Scheld, M., Rüther, B. J., Große-Veldmann, R., Ohl, K., Tenbrock, K., Dreymüller, D., . . . Kipp,
   M. (2016). Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the
   Forebrain. J Neurosci, 36(4), 1410-1415. doi:10.1523/jneurosci.2456-15.2016
- Schmierer, K., McDowell, A., Petrova, N., Carassiti, D., Thomas, D. L., & Miquel, M. E. (2018). Quantifying multiple sclerosis pathology in post mortem spinal cord using MRI. *Neuroimage*, 182, 251-258. doi:10.1016/j.neuroimage.2018.01.052

- Scott, L. J. (2020). Siponimod: A Review in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *CNS* Drugs, 34(11), 1191-1200. doi:10.1007/s40263-020-00771-z
- Shiina, T., Inoko, H., & Kulski, J. K. (2004). An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens, 64*(6), 631-649. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00327.x
- Sidman, R., Angevine, J., & Pierce, E. (1971). Atlas of the mouse brain and spinal cord: http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html. Harvard University Press Cambridge.
- Siffrin, V., Radbruch, H., Glumm, R., Niesner, R., Paterka, M., Herz, J., . . . Zipp, F. (2010). In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity*, 33(3), 424-436. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.018
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, *119*(1), 7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Suzuki, K., & Kikkawa, Y. (1969). Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone). *Am J Pathol, 54*(2), 307-325.
- Thöne, J., Ellrichmann, G., Seubert, S., Peruga, I., Lee, D. H., Conrad, R., . . . Gold, R. (2012).
  Modulation of autoimmune demyelination by laquinimod via induction of brainderived neurotrophic factor. *Am J Pathol, 180*(1), 267-274. doi:10.1016/j.ajpath.2011.09.037
- Thöne, J., & Gold, R. (2011). Laquinimod: a promising oral medication for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 7(3), 365-370. doi:10.1517/17425255.2011.556618
- Vollmer, T. L., Sorensen, P. S., Selmaj, K., Zipp, F., Havrdova, E., Cohen, J. A., . . . Arnold, D. L. (2014). A randomized placebo-controlled phase III trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *J Neurol*, *261*(4), 773-783. doi:10.1007/s00415-014-7264-4
- von Bohlen Und Halbach, O. (2009). Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann Anat, 191*(6), 518-531. doi:10.1016/j.aanat.2009.08.006
- Wegner, C., Stadelmann, C., Pförtner, R., Raymond, E., Feigelson, S., Alon, R., . . . Brück, W. (2010). Laquinimod interferes with migratory capacity of T cells and reduces IL-17 levels, inflammatory demyelination and acute axonal damage in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol, 227*(1-2), 133-143. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.07.009
- Wilhelmsson, U., Pozo-Rodrigalvarez, A., Kalm, M., de Pablo, Y., Widestrand, Å., Pekna, M., & Pekny, M. (2019). The role of GFAP and vimentin in learning and memory. *Biol Chem*, 400(9), 1147-1156. doi:10.1515/hsz-2019-0199
- Yang, G., Parkhurst, C. N., Hayes, S., & Gan, W. B. (2013). Peripheral elevation of TNF-α leads to early synaptic abnormalities in the mouse somatosensory cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(25), 10306-10311. doi:10.1073/pnas.1222895110

- Yang, J. S., Xu, L. Y., Xiao, B. G., Hedlund, G., & Link, H. (2004). Laquinimod (ABR-215062) suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, modulates the Th1/Th2 balance and induces the Th3 cytokine TGF-beta in Lewis rats. *J Neuroimmunol, 156*(1-2), 3-9. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.02.016
- Zinnhardt, B., Belloy, M., Fricke, I. B., Orije, J., Guglielmetti, C., Hermann, S., ... Jacobs, A. H. (2019). Molecular Imaging of Immune Cell Dynamics During De- and Remyelination in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis by [(18)F]DPA-714 PET and MRI. *Theranostics, 9*(6), 1523-1537. doi:10.7150/thno.32461

## **VI. Eidesstattliche Versicherung**

Riedler, Philipp Alexander

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

## "Zytoprotektive Wirkung von Laquinimod in einem neuen Multiple Sklerose-Mausmodell"

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

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

München, den 07.04.2022

Philipp Alexander Riedler

Ort, Datum

**Unterschrift Doktorand** 

## VII. Danksagung

Die Durchführung einer Dissertationsarbeit erfordert stets die Expertise und Unterstützung von anderen. Am Schluss meiner Arbeit möchte ich mich nun gerne bei genau diesen Menschen bedanken.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp. Die Betreuung, die ich durch ihn erhalten durfte, war zu jedem Zeitpunkt höchst professionell. Hierbei möchte ich besonders seine extrem raschen Antworten auf jegliche Nachrichten bzw. Fragen, sei es per E-Mail oder telefonisch, betonen. Dies ist, meiner Meinung nach, der zentrale Faktor für eine erfolgreiche Promotion, da mich mein Doktorvater rund um die Uhr mit seiner Expertise durch die Arbeit geleitet hat. Auch menschlich war Herr Prof. Kipp eine große Stütze, was für mich persönlich ebenso eine bedeutende Grundlage darstellt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz, dem Vorstand des Lehrstuhls Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt der LMU, dass ich meine Promotionsarbeit an seinem Lehrstuhl durchführen durfte.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Tanja Hochstrasser, die mich stets mit hilfreichen Tipps unterstützte. Hier möchte ich besonders ihre Professionalität einerseits und ihren sympathischen Charakter andererseits hervorheben, eine Kombination, die in unserem Berufsfeld leider nicht immer zu finden ist.

Den technischen Assistentinnen - besonders Astrid Baltruschat, Beate Aschauer und Sarah Wübbel - gebührt ebenso großer Dank. Vor allem anfangs, als man sich zunächst mit den verschiedenen Methoden vertraut machen musste, wurde ich stets durch die professionelle und vor allem geduldige Art der Assistentinnen unterstützt.

Abschließend möchte ich mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie, die mir nicht nur während der Promotionsarbeit, sondern auch im gesamten Studium zur Seite standen, ganz herzlich bedanken.

## VIII. Publikationsliste

- Publikation in einer Fachzeitschrift: Nedelcu, J., Reinbach, C., Riedler, P., Brendel, M., Rominger, A., Kaye, J., Behrangi, N., Jiangshan, Z., Schmitz, C., Kipp, M. (2020). Laquinimod ameliorates secondary brain inflammation. *Neurobiology of Disease*, *134*, 104675. doi:10.1016/j.nbd.2019.104675
- Posterpräsentation im Rahmen eines Kongresses:
   Riedler P., Reinbach C., Nedelcu J., Kipp M. (2018). Laquinimod is protective in a novel multiple sclerosis animal model. 113th Annual Meeting of the Anatomical Society, Rostock, Germany, September 25-28, 2018