

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

**NEURO-AXONALE PATHOLOGIE BEI MULTIPLER SKLEROSE:
EINE TIEREXPERIMENTELLE STUDIE**

Kumulative Habilitationsleistung
zum Erwerb der Venia Legendi
für das Fach Anatomie

vorgelegt von
Dr. Tanja Hochstraßer
2023

Dekan:

Univ. Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Fachmentorat:

Univ. Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Univ. Prof. Dr. med. vet. Mehdi Shakibaei

Univ. Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
2. Zielsetzung.....	10
3. Arbeiten zur neuro-axonalen Pathologie in Multiple Sklerose Mausmodellen	
3.1 Quantifizierung und Visualisierung axonalen Schadens.....	11
3.2 Atrophiemessung und Quantifizierung neuronaler Zellkörper.....	14
3.3 Neuropathologische Langzeitveränderungen nach akuter Demyelinisierung.....	16
4. Literaturverzeichnis.....	18
5. Abkürzungsverzeichnis.....	22
6. Vollständiges Schriftverzeichnis.....	23
7. Danksagung.....	28

1. Einleitung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), deren Ursache trotz großer Forschungsanstrengungen noch nicht geklärt ist. Bei der MS treten im gesamten Gehirn und Rückenmark verstreut entzündliche, demyelinisierte Herde auf, welche, je nach neuroanatomischer Lokalisation, die unterschiedlichsten neurologischen Symptome hervorrufen können (Charcot, 1880).

Klinisch lassen sich verschiedene Verlaufsformen unterscheiden. Zu Beginn kommt es typischerweise zu einem klinisch isoliertem Syndrom (clinically isolated syndrome, CIS). Es beschreibt erstmalig auftretende, einzelne neurologische Störungen, die durch entzündliche demyelinisierende Ereignisse im ZNS verursacht werden. Aus einem CIS kann sich im Weiteren eine schubförmig remittierende MS (relapsing-remitting MS, RRMS) entwickeln. Sie ist initial mit 85 bis 90 % die häufigste klinische Verlaufsform. Bei der RRMS treten plötzliche und in unregelmäßigen Abständen entzündliche Schübe auf, die zu einer akuten Verschlechterung der Symptomatik führen. Die Patienten erholen sich entweder komplett von diesen Schüben oder aber behalten ein bleibendes klinisches Defizit. Bei einem Großteil der Patienten mit RRMS geht diese nach einigen Jahren in einen chronisch fortschreitenden Verlauf (sekundär progrediente MS, SPMS) über. Hierbei reduziert sich die Häufigkeit der Schübe und es kommt zu einer langsam-progredienten Zunahme der klinischen Beeinträchtigung, unabhängig von etwaig noch stattfindenden Schüben. Etwa 10 % der Patienten zeigen initial einen primär progredienten Verlauf (primär progredienten MS, PPMS). Bei der PPMS verschlechtert sich die Symptomatik von Anfang an kontinuierlich ohne Schubaktivität (Lublin and Reingold, 1996; Lublin, 2014).

Pathologisch werden Schübe durch eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, die sich gegen Bestandteile des Myelins im ZNS richten, ausgelöst. Die aktivierten, myelinreaktiven T-Zellen migrieren über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS (Hickey, 1991). Dort werden sie erneut aktiviert und setzen eine Entzündungskaskade in Gang, an der unter anderem Makrophagen, Zytokine und Antikörper beteiligt sind (Noseworthy et al., 2000). Es treten fokale Entzündungsherde sowie Schäden an den Myelinscheiden der

Nervenzellfortsätze (Demyelinisierung) auf (Hohlfeld et al., 1995; Rodriguez, 1989). Zunächst können die fokalen Schäden durch verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise Remyelinisierung und neuronale Plastizität kompensiert werden. Es kommt zur Remission (Irvine and Blakemore, 2008; Kerschensteiner et al., 2004; Smith et al., 1979; Tomassini et al., 2012). Die SPMS hingegen ist durch diffuse degenerative Prozesse („progressive Neurodegeneration/ Entzündung“) geprägt. Hierbei kommt es, unabhängig von Schüben, zu einem kontinuierlichen Fortschritt der klinischen Beeinträchtigung der Patienten. Periphere Immunzellen und hirnansässige Gliazellen (Mikroglia und Astrozyten) verursachen verstärkt diffuse neuro-axonale Schäden, was zum Verlust von Myelinscheiden (inkl. Oligodendrozyten), Axonen, Synapsen und ganzen Nervenzellen führt (Dutta et al., 2011; Jurgens et al., 2016; Kipp et al., 2017; Peterson et al., 2001; Vogt et al., 2009). Überschreitet der neuro-axonale Schaden ein kritisches Maß, welches die Kompensationsmechanismen und die Reservekapazität des ZNS überfordert, kommt es schließlich zur persistierenden klinischen Beeinträchtigung (Trapp et al., 1999).

Die diffuse neuro-axonale Schädigung beginnt jedoch schon im frühen Krankheitsstadium und korreliert mit dem Ausmaß der entzündlichen Demyelinisierung (Kuhlmann et al., 2002; Trapp et al., 1998). In diesem Stadium ist der axonale Schaden vorwiegend in Läsionen mit früh-aktiver Demyelinisierung, sowie im Randbereich chronisch aktiver Läsionen vorzufinden (Ferguson et al., 1997; Kornek et al., 2000). In aktiven Läsionen zeigt sich eine hohe Anzahl von zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen (Ferguson et al., 1997). Verschiedene zelluläre Mechanismen scheinen hierbei eine Rolle zu spielen: Makrophagen und auch Mikroglia produzieren toxische Mediatoren, wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO) und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Freisetzung von NO und ROS kann beispielsweise zu einem gestörten axonalen Transport und einer mitochondrialen Schädigung beitragen, was zu einer direkten fokalen Schädigung der Axone führen kann (Karbowski and Neutzner, 2012; Nikic et al., 2011; Redford et al., 1997; Smith and Lassmann, 2002). Interessanterweise scheint die progressive Neurodegeneration nicht alleinig von der entzündlichen Demyelinisierung abhängig zu sein (Brück, 2005; Confavreux et al., 2003). Es zeigt sich eine langsame axonale Schädigung in inaktiven Läsionen sowie in normal erscheinender

weißer und grauer Substanz (Bjartmar et al., 2001; Peterson et al., 2001). Da in inaktiven Läsionen die Anzahl peripherer Immunzellen im Vergleich zu aktiven Läsionen viel geringer ist und es auch außerhalb der Läsionen zu einem Axonenverlust kommt (Kornek et al., 2000), muss davon ausgegangen werden, dass hier andere Mechanismen eine zentrale Rolle spielen. Zudem zeigt sich, dass bisher zugelassene Medikamente, welche die Schubrate und somit die entzündliche Demyelinisierung im frühen Stadium der MS verringern, nur bedingt einen Effekt auf den kontinuierlichen Fortschritt der klinischen Behinderung der Patienten haben (Bornstein et al., 1991; Confavreux et al., 2000; Millefiorini et al., 1997). Auch Frauen, deren Schubrate während der Schwangerschaft kontinuierlich abnimmt, zeigen keinen Rückgang der fortschreitenden klinischen Beeinträchtigung (Confavreux et al., 1998; Karp et al., 2014). Mittels neuroradiologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der axonalen Schädigung das wichtigste pathologische Korrelat irreversibler klinischer Beeinträchtigung bei MS Patienten ist (van Waesberghe et al., 1999). Zudem ist bekannt, dass spezifische Bereiche der weißen und grauen Substanz, wie z.B. der Thalamus oder verschiedene Cortexbereiche, bei MS Patienten mit der Zeit schrumpfen (Bergsland et al., 2012; Sepulcre et al., 2006; Steenwijk et al., 2016), ein Prozess, der als Hirnatrophie bezeichnet wird. Es wurde gezeigt, dass die Atrophie der grauen Substanz stärker mit der klinischen Behinderung korreliert als die Atrophie der weißen Substanz (Fisher et al., 2008; Tedeschi et al., 2005). Je schneller Hirnvolumen und graue Substanz bei MS Patienten abnehmen, umso eher kommt es somit zu einer Behinderungsprogression und zu kognitiven Defiziten (Batista et al., 2012; Eshaghi et al., 2018; Fisher et al., 2008; Schoonheim et al., 2012). Inwiefern diffuse degenerative Prozesse, die sich an den Axonen oder anderen neuronalen Strukturen abspielen, zur Schrumpfung des Hirngewebes beitragen, ist jedoch nicht hinreichend verstanden.

Im Rahmen präklinischer Studien werden die entzündliche Demyelinisierung (Schübe) und die progressive Neurodegeneration oft getrennt voneinander betrachtet. Zur Untersuchung autoimmuner Entzündungsreaktionen werden Modelle wie die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) herangezogen. Sie kann aktiv durch die Injektion verschiedener Myelinpeptide oder passiv durch den Transfer myelinspezifischer T-Zellen induziert werden (Miller et al., 2010). Die aktive EAE wird

zumeist durch die subkutane Injektion von Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) Peptid 35-55 (MOG₃₅₋₅₅ EAE) in komplettem Freund-Adjuvans und intraperitonealer Gabe von Pertussis-Toxin ausgelöst. Dies führt zu einer T-Zell-vermittelten entzündlichen Antwort im Bereich des Rückenmarks, des Cerebellums und des Nervus opticus. Diese ähnelt sowohl hinsichtlich einer Reihe von Symptomen als auch bezüglich etlicher histopathologischer Veränderungen der MS (Bittner et al., 2014; Bjelobaba et al., 2018).

Als bedeutendes Modell zur Untersuchung autoimmun-unabhängiger Fragestellungen konnte sich das Cuprizone Modell etablieren. Es zählt zu den Toxin-induzierten MS Modellen. Die Gabe des Kupferchelators Cuprizone (bis-cyclohexanon-oxaldihydrazon) verursacht bei Mäusen eine metabolisch induzierte Oligodendrozytenapoptose, was zu einer reproduzierbaren Demyelinisierung verschiedener ZNS-Regionen führt (Chrzanowski et al., 2019; Hochstrasser et al., 2017; Kipp et al., 2009). Zu diesen zählen sowohl Regionen der weißen Substanz (Corpus callosum, Pedunculus cerebellaris superior) als auch der grauen Substanz (Cortex, Cerebellum, Thalamus, Teile der Basalganglien) (Kipp et al., 2009; Pott et al., 2009; Schmidt et al., 2013; Skripuletz et al., 2010; Torkildsen et al., 2008). Beim Cuprizone Modell spielen periphere Immunzellen keine wesentliche funktionelle Rolle (Bakker and Ludwin, 1987). Die Demyelinisierung beruht vermutlich auf einem Cuprizone-induzierten Kupfermangel im Gehirn, der eine Aktivitätsreduktion mitochondrialer Enzyme zur Folge hat, da diese Kupfer als essentiellen Ko-Faktor benötigen. Dadurch kommt es zu einer Störung des Energiehaushalts von Oligodendrozyten und schließlich zur Demyelinisierung (Hiremath et al., 1998; Torkildsen et al., 2008). Eine „akute“ Demyelinisierung wird durch die Gabe von Cuprizone über einen Zeitraum von 5-6 Wochen induziert. Das Absetzen des Toxins führt anschließend zur spontanen, endogenen Remyelinisierung. Eine verlängerte (>12 Wochen) Intoxikation mit Cuprizone führt hingegen zu einer anhaltenden (chronischen) Demyelinisierung. Hierbei sind Remyelinisierungsvorgänge deutlich beeinträchtigt (Kipp et al., 2009). Neben der Schädigung der Oligodendrozyten mit konsekutiver Demyelinisierung kommt es auf zellulärer Ebene zu einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, sowie zu einem Verlust der axonalen Integrität (Hiremath et al., 1998; Lindner et al., 2009; Wagenknecht et al., 2016).

Neben dem Cuprizone Modell gehört auch das Lysophosphatidylcholin (LPC) Modell zu den Toxin-induzierten Tiermodellen. Hierbei wird den Versuchstieren das Phospholipid LPC durch eine stereotaktische Injektion verabreicht, was zu einer akuten Demyelinisierung führt (Hall and Gregson, 1971; Hall, 1972). Wenige Stunden nach LPC Injektion kann außerdem eine Mikrogliaaktivierung, eine Migration von Makrophagen sowie ein axonaler Schaden beobachtet werden (Dousset et al., 1995; Ousman and David, 2000; Waxman et al., 1979).

Ultrastrukturell stellen sich früh-geschädigte Axone u.a. als fokale Schwellungen der Nervenfasern in ihrem Verlauf dar. Auch auf immunhistochemischer Ebene konnte gezeigt werden, dass geschädigte Axone an ihrem distalen Ende rundliche, nicht-myelinisierte Verdickungen ausbilden (Trapp et al., 1998). Es wird angenommen, dass im Zuge einer axonalen Schädigung anterograde und womöglich auch retrograde Transportprozesse gestört sind. Dadurch kommt es zur fokalen Akkumulation von Proteinen, u.a. dem β -Amyloid-Precursor Protein (APP). Das Transmembran-Glykoprotein APP wird im neuronalen Zellkörper produziert und mittels schnellem anterograden axonalen Transport zur Synapse transportiert. Physiologische Mengen axonalen APPs sind immunhistochemisch schwer nachweisbar. Die Durchtrennung oder Schädigung eines Axons führen jedoch zur Unterbrechung des Transports. Dadurch staut sich das vesikuläre APP fokal an, das dann immunhistochemisch als ovoide Sphäroide nachgewiesen werden kann (Kuhlmann et al., 2002). Der Nachweis von APP-positiven Sphäroiden ist bis circa 30 Tage nach einer Axonschädigung möglich und somit als Marker des akuten axonalen Schadens zu verstehen (Bitsch et al., 2000; Ferguson et al., 1997; Kornek et al., 2000; Trapp et al., 1998).

Es wurde gezeigt, dass eine frühe axonale Schädigung einen prinzipiell reversiblen Prozess darstellt (Nikic et al., 2011). Konkret konnte mittels *in vivo* Bildgebung gezeigt werden, dass es vor einer axonalen Transsektion zu fokalen Schwellungen des Axons kommt. Diese fokalen Schwellungen sind jedoch in Abhängigkeit schädlicher Mediatoren, wie ROS und NO, reversibel (Nikic et al., 2011). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sich die Remyelinisierung sowie eine verringerte Aktivierung von Mikroglia positiv auf die axonale Integrität auswirken (Schultz et al., 2017). Dies deutet darauf hin, dass eine Protektion oder frühzeitige Reparatur der

Axone eine entscheidende Rolle bei möglichen Behandlungsansätzen spielen könnten. Hierfür müssen geschädigte Axone allerdings frühzeitig sichtbar gemacht und die zugrundeliegenden Komponenten und Mechanismen der progressiven Neurodegeneration besser verstanden werden.

2. Zielsetzung

Ziel dieses kumulativen Habilitationsprojektes war es, mittels valider MS Mausmodelle und morphologischer Gold-Standard Methoden (u.a. Immunhistochemie, 3-dimensionale Elektronenmikroskopie (3D EM), design-based Stereologie), einen Beitrag zum Verständnis pathologischer Vorgänge (verschiedener Komponenten der Neurodegeneration) im Gehirn von MS Patienten zu leisten.

Es wurden folgenden Fragestellungen untersucht:

- ❖ Führt eine Demyelinisierung zu axonalem Schaden, der durch die fokale Akkumulation verschiedener vesikulärer Proteine und/oder Organellen immunhistochemisch sichtbar gemacht werden kann? Entspricht die immunhistochemisch sichtbar gemachte Akkumulation dieser Proteine und/oder Organellen in der Tat ultrastrukturellen axonalen Auftreibungen? **(Teilprojekt 3.1)**
- ❖ Führt eine Demyelinisierung zum dauerhaften Verlust neuro-axonaler Komponenten und hierdurch zur Atrophie des Hirngewebes? **(Teilprojekt 3.2)**
- ❖ Führt ein einzelnes demyelinisierendes Ereignis zu anhaltenden neuropathologischen Veränderungen im Gewebe (u.a. Gliaaktivierung, axonalem Schaden) und damit zu einer anhaltenden funktionellen Beeinträchtigung? **(Teilprojekt 3.3)**

3. Arbeiten zur neuro-axonalen Pathologie in Multiple Sklerose Mausmodellen

3.1 Quantifizierung und Visualisierung axonalen Schadens

Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: a comparative approach.

Höflich, K.M.; Beyer, C.; Clarner, T.; Schmitz, C.; Nyamoya, S.; Kipp, M.; Hochstrasser, T.

Brain Research 2016;1650:125-133.

Das Ausmaß des axonalen Schadens ist das wichtigste pathologische Korrelat irreversibler klinischer Defizite bei MS Patienten (Trapp and Nave, 2008). Wie es zum axonalen Schaden kommt ist nur unzureichend verstanden. Prinzipiell sind immunologische und/oder zytodegenerative Mechanismen denkbar. Durch Zuhilfenahme valider Methoden und Modelle besteht die Möglichkeit, ein weiterreichendes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu erlangen.

In dieser Studie untersuchten wir das Ausmaß des akuten axonalen Schadens in drei unterschiedlichen Demyelinisierungs-Modellen (aktive EAE, Cuprizone und LPC Modell) mittels anti-APP-Immunhistochemie.

Sowohl im T-Zell abhängigen EAE Modell als auch in den Toxin-induzierten, T-Zell unabhängigen Cuprizone- und LPC Modellen konnten wir APP-positive Sphäroide nachweisen. Die Zahl APP-positiver Sphäroide war in LPC-induzierten Läsionen fulminant. In demyelinisierten Läsionen des EAE- und Cuprizone Modells war die Anzahl APP-positiver Sphäroide vergleichbar geringer. Im EAE- und Cuprizone Modell korrelierten die Anzahl APP-positiver Sphäroide und das Ausmaß der Entzündung (Anzahl der Mikroglia Zellen). Des Weiteren konnten wir zeigen, dass nicht nur APP, sondern auch ein weiteres Synapsen-assoziiertes Protein (vesikulärer Glutamattransporter 1 (VGLUT1)) in demyelinisierten Läsionen immunhistochemisch als Sphäroide nachweisbar war (Höflich et al., 2016).

Durch die immunhistochemische Analyse konnten wir zeigen, dass akuter axonaler Schaden, welcher vermutlich durch einen gestörten axonalen Transport

unterschiedlicher Proteine nachzuweisen ist, in diversen experimentellen Demyelinisierungsparadigmen vorkommt. Alle drei Demyelinisierungs-Modelle können daher als valides und geeignetes Model zur genaueren Untersuchung des akuten axonalen Schadens herangezogen werden.

Visualization of the breakdown of the axonal transport machinery: a comparative ultrastructural and immunohistochemical approach.

Rühling, S.; Kramer, F.; Schmutz, S.; Amor, S.; Jiangshan, Z.; Schmitz, C.; Kipp, M.; Hochstrasser, T.

Molecular Neurobiology 2019;56(6):3984-3998.

Der immunhistochemische Nachweis von APP gilt als spezifischer Marker für eine akute axonale Schädigung. Es wird davon ausgegangen, dass APP, welches in den Zellkörpern der Neurone synthetisiert und entlang der Axone zu den Synapsen transportiert wird, bei Unterbrechung des Transports akkumuliert (Kuhlmann et al., 2002). Inwieweit der gestörte Transport und die Akkumulation von APP tatsächlich einen axonalen Schaden widerspiegeln, ist jedoch nicht gänzlich geklärt. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass eine Unterbrechung des axonalen Transports nicht nur zur fokalen Akkumulation von APP, sondern auch zur fokalen Akkumulation weiterer vesikulärer Proteine und Zellorganellen wie z.B. Mitochondrien, die dem axonalen Transport unterliegen, führt. So zeigten wir bereits in der vorangegangenen Studie, dass VGLUT1, ein synaptisches Vesikelprotein, in demyelinisierten Läsionen verschiedener MS-Tiermodelle akkumuliert (Höflich et al., 2016). Zudem wurde in der Literatur eine Anreicherung von Mitochondrien im Zusammenhang mit einer axonalen Schädigung im Rückenmark von Mäusen mit EAE gezeigt (Bando et al., 2008). Eine fokale axonale Schwellung und geschädigte Mitochondrien konnten ferner nicht nur in EAE Mäusen, sondern auch in *post mortem* Gehirngewebe von MS Patienten gezeigt werden (Nikic et al., 2011).

Ziel dieser Studie war es zu überprüfen, ob APP-positive Sphäroide in der Tat ultrastrukturellen axonalen Schwellungen entsprechen und ob andere vesikuläre Proteine und/oder Organellen innerhalb von geschädigten Axonen akkumulieren.

Um zu untersuchen, ob APP-positive Sphäroide tatsächlich einen frühen ultrastrukturellen axonalen Schaden zeigen, verwendeten wir die serielle 3D EM (serial block-face scanning electron microscopy) sowie die Immunfluoreszenzmikroskopie im Cuprizone Modell. Wir konnten zeigen, dass das Volumen ultrastruktureller axonaler Auftreibungen dem Volumen APP-positiver Sphäroide entsprach. Des Weiteren konnten wir mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen, dass mitochondriale Proteine (Cytochrom-c-Oxidase 4 (COX4), Porin (voltage dependent anion channel 1, VDAC1)) und das synaptische Vesikelprotein VGLUT1, welche sich in den ultrastrukturellen axonalen Schwellungen anreichern, in myelinisierten und demyelinisierten Axonen immunhistochemisch als Sphäroide nachweisbar waren. Dies zeigte sich nicht nur nach akuter und chronischer Demyelinisierung im Cuprizone Modell, sondern auch in *post mortem* Gehirngewebe von Patienten mit progressiver MS (Rühling et al., 2018).

Durch die vergleichende Betrachtung konnte gezeigt werden, dass der Zusammenbruch des axonalen Transportes zur fokalen Anreicherung verschiedener synaptischer Proteine (u.a. APP) und mitochondrialer Proteine (COX4, VDAC1) im Axon führt. Diese können zur weiteren Charakterisierung und zum Nachweis eines akuten axonalen Schadens herangezogen werden. Zudem zeigt sich, dass die Akkumulation dieser Proteine früh, vor einer axonalen Transsektion und teilweise auch vor einer Demyelinisierung, stattfindet. Es bleibt zu klären, wie Transportdefizite abgeschwächt und eine Axontranssektion verhindert werden können. Sicher ist, dass diese vergleichende Betrachtungsweise eine genauere Beschreibung des akuten axonalen Schadens ermöglicht. Dies kann zukünftig zur Entwicklung spezifischer Behandlungsstrategien führen.

3.2 Atrophiemessung und Quantifizierung neuronaler Zellkörper

Stereological investigation of regional brain volumes after acute and chronic cuprizone-induced demyelination.

Hochstrasser, T.; Rühling, S.; Hecher, K.; Fabisch, K.H.; Chrzanowski, C.; Brendel, M.; Eckenweber, F.; Sacher, C.; Schmitz, C.; Kipp, M.

Cells 2019;8(9): 1024.

Der übermäßige Abbau von grauer und weißer Substanz, ein Prozess, der als Atrophie bezeichnet wird, ist als Ausdruck einer irreversiblen degenerativen Gewebsschädigung zu verstehen. Je schneller das Hirnvolumen abnimmt, umso eher kommt es zu einer dauerhaften Behinderung bei MS Patienten (Batista et al., 2012). In den vorangegangenen Arbeiten zeigte sich, dass der Zusammenbruch der axonalen Integrität eine wichtige Komponente der Gewebsschädigung ist (Höflich et al., 2016; Rühling et al., 2018). Inwiefern die degenerativen Prozesse nicht nur an Axonen sondern auch an anderen neuronalen Strukturen (Zellkörper, Dendriten, Synapsen) langfristig zu einer Hirnatrophie führen, muss noch geklärt werden. Ferner existiert aktuell kein etabliertes MS Modell zur Untersuchung der Hirnatrophie und des zugrundeliegenden histologischen Korrelats.

Ziel dieser Studie war es daher, Volumenveränderungen und das zugrundeliegende histologische Korrelat nach akuter und chronischer Demyelinisierung nachzuweisen.

Hierzu verwendeten wir das Cuprizone Modell, welches ein wichtiges Werkzeug ist, um vor allem zytodegenerative, autoimmun-unabhängige Aspekte der MS zu verstehen. Zur Untersuchung eines möglichen Volumen- bzw. Neuronenverlusts benutzen wir die sogenannte „design-based“ Stereologie. Im Gegensatz zu herkömmlichen histologischen Methoden kann mittels design-based Stereologie unter anderem das Volumen einer bestimmten Hirnstruktur oder die Anzahl von Nervenzellen innerhalb einer bestimmten Gehirnregion mit größter Genauigkeit untersucht werden. Selbst ein geringer Volumen- oder Nervenzellverlust ist somit quantifizierbar (Schmitz and Hof, 2005).

Nach akuter Demyelinisierung konnten wir keinen Volumenverlust im Cortex, im subcortikalen Bereich oder im Corpus callosum nachweisen. Im „chronischen“ Cuprizone

Modell konnten wir hingegen zeigen, dass eine anhaltende Demyelinisierung zu einem Volumenverlust in spezifischen Gehirnregionen führte. Betroffen waren die Faserbahnen Corpus callosum und Capsula interna sowie der Thalamus. Der Volumenverlust im Thalamus wurde interessanterweise nicht von einem Verlust von NeuN-positiven Nervenzellen oder Schrumpfung der neuronalen Zellkörper begleitet, was am ehesten auf eine Schädigung des Neuropils hindeutet. Die anhaltende Demyelinisierung scheint allein kein ausreichender Auslöser für den Zellverlust von Neuronen zu sein. Wir vermuten daher, dass es neben metabolischem Stress noch zusätzlicher Faktoren, beispielweise Entzündungsmediatoren, bedarf, um einen direkten neuronalen Zellverlust auszulösen. Abgesehen davon konnten wir einen akuten axonalen Schaden in Form akkumulierender APP Sphäroide und ein tendenziell verringertes subcortikales Neuropil Volumen aufzeigen. Dies lässt abermals auf eine Veränderung im Bereich der Axone und/oder Dendriten schließen (Hochstrasser et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das „chronische“ Cuprizone Modell ein signifikantes Ausmaß an Hirnatrophie aufweist, womit es wichtige Parallelen zur MS und des dort beobachteten Volumenverlusts in subkortikalen Strukturen, wie dem Thalamus widerspiegelt. Daher stellt es ein wertvolles Instrument zur Untersuchung der Mechanismen, die einer Hirnatrophie bei MS zu Grunde liegen, dar. Es bedarf nun weiterer Studie um zu klären, welche spezifischen Mechanismen der Atrophie innerhalb des Cuprizone Modells zugrunde liegen und inwiefern diese auf die humane Situation übertragbar sind.

3.3 Neuropathologische Langzeitveränderungen nach akuter Demyelinisierung

Focal white matter lesions induce long-lasting axonal degeneration, neuroinflammation and behavioral deficits.

Zhan, J.; Fegg, F.N.; Kaddatz, H.; Rühling, S.; Frenz, J.; Denecke, B.; Amor, S.; Ponsaerts, P.; **Hochstrasser, T***; Kipp, M*.

Neurobiology of Disease 2021;155:105371.

* *Geteilte Letztautorenschaft*

Die axonale Integrität kann durch Remyelinisierung wiederhergestellt werden. Dies scheint ein Schlüsselmechanismus für die Verbesserung der Symptomatik während der Remission von MS Patienten zu sein (Franklin and Ffrench-Constant, 2008). Trotz Remyelinisierung und Rückgang der klinischen Defizite kommt es jedoch weiterhin zu diffusen neurodegenerativen Prozessen (Kipp et al., 2017).

Ziel dieser Studie war es daher, die andauernden Auswirkungen eines einzelnen, akuten demyelinisierenden Ereignisses zu untersuchen.

Hierzu wurde eine akute Demyelinisierung durch Cuprizone-Gabe induziert. Sieben Monate nach Beendigung der Cuprizone-Gabe (Remyelinisierungsphase) wurden die motorischen Fähigkeiten mittels „ventral plane videography“ (DigiGait™) Ganganalyse quantifiziert. Anschließend wurden die Gehirne der Mäuse für immunhistologische und biochemische Analysen entnommen und aufgearbeitet.

Wir konnten nachweisen, dass es trotz vollständiger Remyelinisierung und einer unveränderten Oligodendrozytendichte zu einer anhaltenden Aktivierung von Gliazellen (Mikroglia und Astrozyten) sowie zu einem persistierenden akuten axonalen Schaden kam. Morphologisch zeigten die Mikroglia Zellen einen reaktiven Phenotyp. Zeitgleich kam es zu Veränderungen der mRNA Expression, welche mittels GeneChip Microarrays und quantitativer *Real-time*-PCR analysiert wurde. Am stärksten wurde die Protein Kinase C Delta (PRKCD) exprimiert. PRKCD spielt sowohl in der Regulation der inflammatorischen Antwort als auch bei Signalprozessen in peripheren Immunzellen eine Rolle. Immunhistochemisch zeigte sich, dass PRKCD vorwiegend in Mikroglia Zellen

im Bereich des demyelinisierten Corpus callosum sowie in chronisch aktiven Läsionen von MS Patienten vorkam. Diese andauernden Gewebsveränderungen wurden von motorischen Defiziten (Ganganomalien) begleitet (Zhan et al., 2021).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass bereits ein einzelnes, akutes demyelinisierendes Ereignis zu langfristigen Veränderungen des neuralen Gewebes führen kann. Glia-basierte Gewebsschädigungen scheinen hier maßgeblich an der progressiven Neurodegeneration beteiligt zu sein. Dies unterstützt die Annahme, dass es im frühen Stadium der MS zu gewissen kompensatorischen Mechanismen, einschließlich Remyelinisierung geschädigter Axone und Neuroplastizität, kommt, die diese Schädigungen zunächst ausgleichen können. Ist jedoch ein kritisches Ausmaß der Schädigung überschritten, kommt es auch ohne neue Inflammationsherde zu degenerativen Prozessen und somit zur kontinuierlichen klinischen Beeinträchtigung.

4. Literaturverzeichnis

- Bakker, D.A., Ludwin, S.K., 1987. Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J Neurol Sci.* 78, 125-37.
- Bando, Y., Takakusaki, K., Ito, S., Terayama, R., Kashiwayanagi, M., Yoshida, S., 2008. Differential changes in axonal conduction following CNS demyelination in two mouse models. *Eur J Neurosci.* 28, 1731-42.
- Batista, S., Zivadinov, R., Hoogs, M., Bergsland, N., Heininen-Brown, M., Dwyer, M.G., Weinstock-Guttman, B., Benedict, R.H., 2012. Basal ganglia, thalamus and neocortical atrophy predicting slowed cognitive processing in multiple sclerosis. *J Neurol.* 259, 139-46.
- Bergsland, N., Horakova, D., Dwyer, M.G., Dolezal, O., Seidl, Z.K., Vaneckova, M., Krasensky, J., Havrdova, E., Zivadinov, R., 2012. Subcortical and cortical gray matter atrophy in a large sample of patients with clinically isolated syndrome and early relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 33, 1573-8.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., Bruck, W., 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain.* 123 (Pt 6), 1174-83.
- Bittner, S., Afzali, A.M., Wiendl, H., Meuth, S.G., 2014. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp.*
- Bjartmar, C., Kinkel, R.P., Kidd, G., Rudick, R.A., Trapp, B.D., 2001. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology.* 57, 1248-52.
- Bjelobaba, I., Begovic-Kupresanin, V., Pekovic, S., Lavrnja, I., 2018. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 96, 1021-1042.
- Bornstein, M.B., Miller, A., Slagle, S., Weitzman, M., Drexler, E., Keilson, M., Spada, V., Weiss, W., Appel, S., Rolak, L., et al., 1991. A placebo-controlled, double-blind, randomized, two-center, pilot trial of Cop 1 in chronic progressive multiple sclerosis. *Neurology.* 41, 533-9.
- Brück, W., 2005. Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol.* 252 Suppl 5, v10-5.
- Charcot, J.M., 1880. *Lecons sur les maladies du systeme nerveux faites a la Salpetriere* [Lectures about the diseases of the nervous system done at the Salpetriere]. Vol. 1A, V. Adrien Delahaye.
- Chrzanowski, U., Schmitz, C., Horn-Bochtler, A., Nack, A., Kipp, M., 2019. Evaluation strategy to determine reliable demyelination in the cuprizone model. *Metab Brain Dis.* 34, 681-685.
- Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M.M., Cortinovis-Tourniaire, P., Moreau, T., 1998. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group.* *N Engl J Med.* 339, 285-91.
- Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., Adeleine, P., 2000. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 343, 1430-8.
- Confavreux, C., Vukusic, S., Adeleine, P., 2003. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain.* 126, 770-82.
- Dousset, V., Brochet, B., Vital, A., Gross, C., Benazzouz, A., Boullerne, A., Bidabe, A.M., Gin, A.M., Caille, J.M., 1995. Lysolecithin-induced demyelination in primates: preliminary in vivo study with MR and magnetization transfer. *AJNR Am J Neuroradiol.* 16, 225-31.
- Dutta, R., Chang, A., Doud, M.K., Kidd, G.J., Ribaldo, M.V., Young, E.A., Fox, R.J., Staugaitis, S.M., Trapp, B.D., 2011. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 69, 445-54.
- Eshaghi, A., Prados, F., Brownlee, W.J., Altmann, D.R., Tur, C., Cardoso, M.J., De Angelis, F., van de Pavert, S.H., Cawley, N., De Stefano, N., Stromillo, M.L., Battaglini, M., Ruggieri, S., Gasperini, C., Filippi, M., Rocca, M.A., Rovira, A., Sastre-Garriga, J., Vrenken, H., Leurs, C.E., Killestein, J.,

- Pirpamer, L., Enzinger, C., Ourselin, S., Wheeler-Kingshott, C., Chard, D., Thompson, A.J., Alexander, D.C., Barkhof, F., Ciccarelli, O., 2018. Deep gray matter volume loss drives disability worsening in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 83, 210-222.
- Ferguson, B., Matyszak, M.K., Esiri, M.M., Perry, V.H., 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain.* 120 (Pt 3), 393-9.
- Fisher, E., Lee, J.C., Nakamura, K., Rudick, R.A., 2008. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Ann Neurol.* 64, 255-65.
- Franklin, R.J., Ffrench-Constant, C., 2008. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci.* 9, 839-55.
- Hall, S.M., Gregson, N.A., 1971. The in vivo and ultrastructural effects of injection of lysophosphatidyl choline into myelinated peripheral nerve fibres of the adult mouse. *J Cell Sci.* 9, 769-89.
- Hall, S.M., 1972. The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *J Cell Sci.* 10, 535-46.
- Hickey, W.F., 1991. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* 1, 97-105.
- 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, 38-49.
- 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, 617-624.
- Hochstrasser, T., Ruhling, S., Hecher, K., Fabisch, K.H., Chrzanowski, U., Brendel, M., Eckenweber, F., Sacher, C., Schmitz, C., Kipp, M., 2019. Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination. *Cells.* 8.
- Höflich, K.M., Beyer, C., Clarner, T., Schmitz, C., Nyamoya, S., Kipp, M., Hochstrasser, T., 2016. Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain Res.* 1650, 125-133.
- Hohlfeld, R., Meinl, E., Weber, F., Zipp, F., Schmidt, S., Sotgiu, S., Goebels, N., Voltz, R., Spuler, S., Iglesias, A., et al., 1995. The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology.* 45, S33-8.
- Irvine, K.A., Blakemore, W.F., 2008. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain.* 131, 1464-77.
- Jurgens, T., Jafari, M., Kreutzfeldt, M., Bahn, E., Bruck, W., Kerschensteiner, M., Merkler, D., 2016. Reconstruction of single cortical projection neurons reveals primary spine loss in multiple sclerosis. *Brain.* 139, 39-46.
- Karbowski, M., Neutzner, A., 2012. Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathol.* 123, 157-71.
- Karp, I., Manganas, A., Sylvestre, M.-P., Ho, A., Roger, E., Duquette, P., 2014. Does pregnancy alter the long-term course of multiple sclerosis? *Annals of Epidemiology.* 24, 504-508.e2.
- Kerschensteiner, M., Bareyre, F.M., Buddeberg, B.S., Merkler, D., Stadelmann, C., Brück, W., Misgeld, T., Schwab, M.E., 2004. Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis. *J Exp Med.* 200, 1027-38.
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., Beyer, C., 2009. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol.* 118, 723-36.
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., Amor, S., 2017. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol.* 27, 123-137.
- Kornek, B., Storch, M.K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer, M., Lassmann, H., 2000. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol.* 157, 267-76.

- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Bruck, W., 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. 125, 2202-12.
- Lindner, M., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C., Stangel, M., 2009. Chronic toxic demyelination in the central nervous system leads to axonal damage despite remyelination. *Neurosci Lett*. 453, 120-5.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 46, 907-11.
- Lublin, F.D., 2014. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol*. 72 Suppl 1, 1-5.
- Millefiorini, E., Gasperini, C., Pozzilli, C., D'Andrea, F., Bastianello, S., Trojano, M., Morino, S., Morra, V.B., Bozzao, A., Calo, A., Bernini, M.L., Gambi, D., Prencipe, M., 1997. Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome. *J Neurol*. 244, 153-9.
- Miller, S.D., Karpus, W.J., Davidson, T.S., 2010. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 15, Unit 15.1.
- Nikic, I., Merkler, D., Sorbara, C., Brinkoetter, M., Kreutzfeldt, M., Bareyre, F.M., Bruck, W., Bishop, D., Misgeld, T., Kerschensteiner, M., 2011. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med*. 17, 495-9.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 343, 938-52.
- Ousman, S.S., David, S., 2000. Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia*. 30, 92-104.
- Peterson, J.W., Bö, L., Mörk, S., Chang, A., Trapp, B.D., 2001. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 50, 389-400.
- Pott, F., Gingele, S., Clarner, T., Dang, J., Baumgartner, W., Beyer, C., Kipp, M., 2009. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Res*. 1305, 137-49.
- Redford, E.J., Kapoor, R., Smith, K.J., 1997. Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain*. 120 (Pt 12), 2149-57.
- Rodriguez, M., 1989. Multiple sclerosis: basic concepts and hypothesis. *Mayo Clin Proc*. 64, 570-6.
- Rühling, S., Kramer, F., Schmutz, S., Amor, S., Jiangshan, Z., Schmitz, C., Kipp, M., Hochstrasser, T., 2018. Visualization of the Breakdown of the Axonal Transport Machinery: a Comparative Ultrastructural and Immunohistochemical Approach. *Mol Neurobiol*.
- Schmidt, T., Awad, H., Slowik, A., Beyer, C., Kipp, M., Clarner, T., 2013. Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: topographical aspects of the midline of the corpus callosum. *J Mol Neurosci*. 49, 80-8.
- Schmitz, C., Hof, P.R., 2005. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*. 130, 813-31.
- Schoonheim, M.M., Popescu, V., Rueda Lopes, F.C., Wiebenga, O.T., Vrenken, H., Douw, L., Polman, C.H., Geurts, J.J., Barkhof, F., 2012. Subcortical atrophy and cognition: sex effects in multiple sclerosis. *Neurology*. 79, 1754-61.
- Schultz, V., van der Meer, F., Wrzos, C., Scheidt, U., Bahn, E., Stadelmann, C., Bruck, W., Junker, A., 2017. Acutely damaged axons are remyelinated in multiple sclerosis and experimental models of demyelination. *Glia*. 65, 1350-1360.
- Sepulcre, J., Sastre-Garriga, J., Cercignani, M., Ingle, G.T., Miller, D.H., Thompson, A.J., 2006. Regional gray matter atrophy in early primary progressive multiple sclerosis: a voxel-based morphometry study. *Arch Neurol*. 63, 1175-80.
- Skripuletz, T., Bussmann, J.H., Gudi, V., Koutsoudaki, P.N., Pul, R., Moharreggh-Khiabani, D., Lindner, M., Stangel, M., 2010. Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain Pathol*. 20, 301-12.
- Smith, K.J., Blakemore, W.F., McDonald, W.I., 1979. Central remyelination restores secure conduction. *Nature*. 280, 395-396.

- Smith, K.J., Lassmann, H., 2002. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 1, 232-41.
- Steenwijk, M.D., Geurts, J.J., Daams, M., Tijms, B.M., Wink, A.M., Balk, L.J., Tewarie, P.K., Uitdehaag, B.M., Barkhof, F., Vrenken, H., Pouwels, P.J., 2016. Cortical atrophy patterns in multiple sclerosis are non-random and clinically relevant. *Brain.* 139, 115-26.
- Tedeschi, G., Lavorgna, L., Russo, P., Prinster, A., Dinacci, D., Savettieri, G., Quattrone, A., Livrea, P., Messina, C., Reggio, A., Bresciamorra, V., Orefice, G., Paciello, M., Brunetti, A., Coniglio, G., Bonavita, S., Di Costanzo, A., Bellacosa, A., Valentino, P., Quarantelli, M., Patti, F., Salemi, G., Cammarata, E., Simone, I.L., Salvatore, M., Bonavita, V., Alfano, B., 2005. Brain atrophy and lesion load in a large population of patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 65, 280-5.
- Tomassini, V., Matthews, P.M., Thompson, A.J., Fuglø, D., Geurts, J.J., Johansen-Berg, H., Jones, D.K., Rocca, M.A., Wise, R.G., Barkhof, F., Palace, J., 2012. Neuroplasticity and functional recovery in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology.* 8, 635-646.
- Torkildsen, O., Brunborg, L.A., Myhr, K.M., Bo, L., 2008. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl.* 188, 72-6.
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 338, 278-85.
- Trapp, B.D., Ransohoff, R., Rudick, R., 1999. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol.* 12, 295-302.
- Trapp, B.D., Nave, K.A., 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 31, 247-69.
- van Waesberghe, J.H., Kamphorst, W., De Groot, C.J., van Walderveen, M.A., Castelijns, J.A., Ravid, R., Lycklama à Nijeholt, G.J., van der Valk, P., Polman, C.H., Thompson, A.J., Barkhof, F., 1999. Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. *Ann Neurol.* 46, 747-54.
- Vogt, J., Paul, F., Aktas, O., Müller-Wielsch, K., Dörr, J., Dörr, S., Bharathi, B.S., Glumm, R., Schmitz, C., Steinbusch, H., Raine, C.S., Tsokos, M., Nitsch, R., Zipp, F., 2009. Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol.* 66, 310-22.
- Wagenknecht, N., Becker, B., Scheld, M., Beyer, C., Clarner, T., Hochstrasser, T., Kipp, M., 2016. Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models. *J Mol Neurosci.*
- Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Nitta, K.C., 1979. Lysophosphatidyl choline-induced focal demyelination in the rabbit corpus callosum. Light-microscopic observations. *J Neurol Sci.* 44, 45-53.
- Zhan, J., Fegg, F.N., Kaddatz, H., Rühling, S., Frenz, J., Denecke, B., Amor, S., Ponsaerts, P., Hochstrasser, T., Kipp, M., 2021. Focal white matter lesions induce long-lasting axonal degeneration, neuroinflammation and behavioral deficits. *Neurobiol Dis.* 155, 105371.

5. Abkürzungsverzeichnis

3D EM	3-dimensionale Elektronenmikroskopie (<i>englisch</i> serial block-face scanning electron microscopy)
APP	β-Amyloid-Precursor Protein
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom (<i>englisch</i> clinically isolated syndrome)
COX4	Cytochrom-c-Oxidase 4
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
LPC	Lysophosphatidylcholin
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>englisch</i> messenger ribonucleic acid)
MS	Multiple Sklerose
NeuN	neuronaies Kernantigen
NO	Stickstoffmonoxid
PPMS	Primär progrediente MS
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>englisch</i> polymerase chain reaction)
PRKCD	Protein Kinase C Delta
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>englisch</i> reactive oxygen species)
RRMS	Schubförmig remittierende MS (<i>englisch</i> relapsing-remitting MS)
SPMS	Sekundär progrediente MS
VDAC1	Porin (<i>englisch</i> voltage dependent anion channel 1)
VGLUT1	Vesikulärer Glutamattransporter 1
ZNS	Zentralnervensystem

6. Vollständiges Schriftverzeichnis

(Publikationen, die bereits zum eigenen Erwerb eines anderen akademischen Grades (Ph.D.) verwendet wurden, sind grau dargestellt)

Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorin

- 1) Zhan, J.; Fegg, F.N.; Kaddatz, H.; Rühling, S.; Frenz, J.; Denecke, B.; Amor, S.; Ponsaerts, P.; **Hochstrasser, T.***; Kipp, M*. Focal white matter lesions induce long-lasting axonal degeneration, neuroinflammation and behavioral deficits. *Neurobiology of Disease* 2021, 155:105371. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105371. (IF 2020: 5.996) *Geteilte Letztautorenschaft
- 2) Reinbach, C.; Stadler, M.S.; Pröbstl, N.; Chrzanowski, U.; Schmitz, C.; Kipp, M.; **Hochstrasser, T.** CD44 expression in the cuprizone model. *Brain Research* 2020, 15;1745:146950. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146950. (IF 2020: 2.733)
- 3) **Hochstrasser, T.**; Rühling, S.; Hecher, K.; Fabisch, K.H.; Chrzanowski, C.; Brendel, M.; Eckenweber, F.; Sacher, C.; Schmitz, C.; Kipp, M. Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination. *Cells* 2019, 8(9). pii: E1024. doi: 10.3390/cells8091024. (IF 2018: 5.656)
- 4) Rühling, S.; Kramer, F.; Schmutz, S.; Amor, S.; Jiangshan, Z.; Schmitz, C.; Kipp, M.; **Hochstrasser, T.** Visualization of the Breakdown of the Axonal Transport Machinery: a Comparative Ultrastructural and Immunohistochemical Approach. *Molecular neurobiology* 2019, 56(6):3984-3998. doi: 10.1007/s12035-018-1353-9. (IF 2019: 4.586)
- 5) **Hochstrasser, T.**; Exner, G.L.; Nyamoya, S.; Schmitz, C.; Kipp, M. Cuprizone-Containing Pellets Are Less Potent to Induce Consistent Demyelination in the Corpus Callosum of C57BL/6 Mice. *Journal of molecular neuroscience* 2017, 61(4):617-624. doi: 10.1007/s12031-017-0903-3. (IF 2017: 2.454)
- 6) Höflich, K.M.; Beyer, C.; Clarner, T.; Schmitz, C.; Nyamoya, S.; Kipp, M.; **Hochstrasser, T.** Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain research* 2016, 1650:125-133. doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.048. (IF 2016: 2.746)

- 7) **Hochstrasser, T.;** Frank, H.G.; Schmitz, C. Dose-dependent and cell type-specific cell death and proliferation following in vitro exposure to radial extracorporeal shock waves. *Scientific reports* 2016, 6:30637. doi: 10.1038/srep30637. **(IF 2016: 4.259)**
- 8) **Hochstrasser, T.;** Hohsfield, L.A.; Sperner-Unterweger, B.; Humpel, C. beta-Amyloid induced effects on cholinergic, serotonergic, and dopaminergic neurons is differentially counteracted by anti-inflammatory drugs. *Journal of neuroscience research* 2013, 91(1):83-94. doi: 10.1002/jnr.23126. **(IF 2013: 2.729)**
- 9) **Hochstrasser, T.;** Ehrlich, D.; Sperner-Unterweger, B.; Humpel, C. Antidepressants and anti-inflammatory drugs differentially reduce the release of NGF and BDNF from rat platelets. *Pharmacopsychiatry* 2013, 46(1):29-34. doi: 10.1055/s-0032-1314843. **(IF 2013: 2.168)**
- 10) **Hochstrasser, T.,** Marksteiner, J., Humpel ,C. Telomere length is age-dependent and reduced in monocytes of Alzheimer patients. *Experimental Gerontology* 2012; 47(2):160-3. doi: 10.1016/j.exger.2011.11.012. **(IF 2012: 3,741)**
- 11) **Hochstrasser, T.,** Ehrlich, D., Marksteiner, J., Sperner-Unterweger, B., Humpel, C. Matrix metalloproteinase-2 and epidermal growth factor are decreased in platelets of Alzheimer patients. *Current Alzheimer Research* 2012, 9(8):982-9. doi: 10.2174/156720512803251156. **(IF 2012: 4.209)**
- 12) **Hochstrasser, T.,** Ullrich, C., Sperner-Unterweger, B., Humpel, C. Inflammatory stimuli reduce survival of serotonergic neurons and induce neuronal expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in rat dorsal raphe nucleus organotypic brain slices. *Neuroscience* 2011; 184:128-38. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.070. **(IF 2011: 3,380)**
- 13) **Hochstrasser, T.,** Marksteiner, J., Defrancesco, M., Deisenhammer, E.A., Kemmler, G., Humpel, C. Two Blood Monocytic Biomarkers (CCL15 and p21) Combined with the Mini-Mental State Examination Discriminate Alzheimer's Disease Patients from Healthy Subjects. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra* 2011; 1(1):297-309. doi: 10.1159/000330468. **(IF 2011: 2.709)**

- 14) **Hochstrasser, T.**, Weiss, E., Marksteiner, J., Humpel, C. Soluble cell adhesion molecules in monocytes of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Experimental Gerontology* 2010; 45(1):70-4. doi: 10.1016/j.exger.2009.10.005. (IF 2011: 3,741)

Originalarbeiten als Koautorin

- 1) Yakimov, V.; Schweiger, F.; Zhan, J.; Behrangi, N.; Horn, A.; Schmitz, C.; **Hochstrasser, T.**; Kipp, M. Continuous cuprizone intoxication allows active experimental autoimmune encephalomyelitis induction in C57BL/6 mice. *Histochemistry and cell biology* 2019, 152(2):119-131. doi: 10.1007/s00418-019-01786-4. (IF 2018: 2.640)
- 2) Chrzanowski, U.; Bhattarai, S.; Scheld, M.; Clarner, T.; Fallier-Becker, P.; Beyer, C.; Rohr, S.O.; Schmitz, C.; **Hochstrasser, T.**; Schweiger, F.; Amor, S.; Horn-Bochtler, A.; Denecke, B.; Nyamoya, S.; Kipp, M. Oligodendrocyte degeneration and concomitant microglia activation directs peripheral immune cells into the forebrain. *Neurochemistry international* 2019, 126:139-153. doi: 10.1016/j.neuint.2019.03.005. (IF 2018: 3.994)
- 3) Fischbach, F.; Nedelcu, J.; Leopold, P.; Zhan, J.; Clarner, T.; Nellessen, L.; Beissel, C.; van Heuvel, Y.; Goswami, A.; Weis, J.; Denecke, B.; Schmitz, C.; **Hochstrasser, T.**; Nyamoya, S.; Victor, M.; Beyer, C.; Kipp, M. Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3. *Glia* 2019, 67(2):263-276. doi: 10.1002/glia.23538. (IF 2018: 5.829)
- 4) R ther, B.J.; Scheld, M.; Dreytmueller, D.; Clarner, T.; Kress, E.; Brandenburg, L.O.; Swartenbroekx, T.; Hoornaert, C.; Ponsaerts, P.; Fallier-Becker, P.; Beyer, C.; Rohr, S.O.; Schmitz, C.; Chrzanowski, U.; **Hochstrasser, T.**; Nyamoya, S.; Kipp, M. Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia* 2017, 65(12):1900-1913. doi: 10.1002/glia.23202. (IF 2017: 5.846)
- 5) Kipp, M.; Kiessling, M.C.; **Hochstrasser, T.**; Roggenkamp, C.; Schmitz, C. Design-Based Stereology for Evaluation of Histological Parameters. *Journal of molecular neuroscience* 2017, 61(3):325-342. doi: 10.1007/s12031-016-0858-9. (IF 2017: 2.454)

- 6) Wagenknecht, N.; Becker, B.; Scheld, M.; Beyer, C.; Clarner, T.; **Hochstrasser, T.**; Kipp, M. Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models. *Journal of molecular neuroscience* 2016, 60(1):102-14. doi: 10.1007/s12031-016-0790-z. **(IF 2016: 2.229)**
- 7) Hübner, K.; Koudouovoh-Tripp, P.; Kandler, C.; **Hochstrasser, T.**; Malik, P.; Giesinger, J.; Semenitz, B.; Humpel, C.; Sperner-Unterweger, B. Differential changes in platelet reactivity induced by acute physical compared to persistent mental stress. *Physiology & behavior* 2015, 151:284-91. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.07.021. **(IF 2015: 2.461)**
- 8) Hübner, K.; Kandler, C.; Koudouovoh-Tripp, P.; Egeter, J.; **Hochstrasser, T.**; Stemer, B.; Malik, P.; Giesinger, J.; Humpel, C.; Sperner-Unterweger, B. Bioprofiling of platelets in medicated patients with depression. *Journal of affective disorders* 2015, 172:81-8. doi: 10.1016/j.jad.2014.09.029. **(IF 2015: 3.570)**
- 9) Müller-Starck, J.; Büttner, A.; Kiessling, M.C.; Angstman, N.B.; Csaszar, N.B.; Haeussner, E.; **Hochstrasser, T.**; Sternecker, K.; Hof, P.R.; Milz, S.; Frank, H.G.; Schmitz, C. No changes in cerebellar microvessel length density in sudden infant death syndrome: implications for pathogenetic mechanisms. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2014, 73(4):312-23. doi: 10.1097/NEN.0000000000000055. **(IF 2014: 3.797)**
- 10) Ehrlich, D., **Hochstrasser, T.**, Humpel, C. Effects of oxidative stress on amyloid precursor protein processing in rat and human platelets. *Platelets* 2013, 24(1):26-36. doi: 10.3109/09537104.2012.661104. **(IF 2013: 1,847)**
- 11) Serbinek, D., Ullrich, C., Pirchl, M., **Hochstrasser, T.**, Schmidt-Kastner, R., Humpel, C. S100b counteracts neurodegeneration of rat cholinergic neurons in brain slices after oxygen-glucose deprivation. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology* 2010, 2010:106123. doi: 10.1155/2010/106123. **(IF 2013: 2.030)**

Übersichtsartikel / Reviews

- 1) **Hochstrasser, T.**; Jiangshan, Z.; Ruhling, S.; Schmitz, C.; Kipp, M. Do pre-clinical multiple sclerosis models allow us to measure neurodegeneration and clinical progression?

Expert review of neurotherapeutics 2018, 1-3. doi: 10.1080/14737175.2018.1459190. **(IF 2018: 3.453)**

- 2) Kipp, M.; Nyamoya, S.; **Hochstrasser, T.**; Amor, S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain pathology* 2017, 27(2):123-137. doi: 10.1111/bpa.12454. **(IF 2017: 6.187)**
- 3) Kipp, M.; **Hochstrasser, T.**; Schmitz, C.; Beyer, C. Female sex steroids and glia cells: Impact on multiple sclerosis lesion formation and fine tuning of the local neurodegenerative cellular network. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2016, 67:125-36. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.11.016. **(IF 2016: 8.299)**
- 4) Humpel, C., **Hochstrasser, T.** Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in Alzheimer's disease. *World Journal of Psychiatry* 2011, 1(1):8-18. doi: 10.5498/wjp.v1.i1.8. **(IF 2011: NA)**

Sonstige Publikationen

- 1) Nyamoya, S.; Schweiger, F.; Kipp, M.; **Hochstrasser, T.** Cuprizone as a model of myelin and axonal damage. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2017, 25-26:63-68. doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.09.003. **(IF 2017: NA)**

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp und Herrn Univ. Prof. Dr. med. Christoph Schmitz. Ich bedanke mich für das jahrelange Vertrauen, sowie für die großartige wissenschaftliche Unterstützung und die exzellente Ausbildung zur Anatomie.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern*innen und Doktoranden*innen am Lehrstuhl II der Anatomischen Anstalt der LMU München bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Frau Sarah Wübbel, Frau Beate Aschauer und Frau Astrid Baltruschat.