

Aus dem Lehrstuhl für Neuroanatomie der anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Neurodegeneration als Treiber von Entzündungsreaktionen bei Multipler Sklerose

Dissertation

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

vorgelegt von

Julia Nedelcu
aus München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Markus Kipp

Mitberichterstatter: PD Dr. Astrid Blaschek

Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

PD Dr. Markus Krumbholz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2023

Eidesstattliche Versicherung

Nedelcu, Julia

Name, Vorname

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

Neurodegeneration als Treiber von Entzündungsreaktionen bei Multipler Sklerose

selbstständig angefertigt habe, 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, 25.02.2023
Ort, Datum

Julia Nedelcu
Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Publikationsliste	6
1. Einführung	7
1.1 Einleitung	7
1.2 Material und verwendete Methoden	8
1.2.1 Versuchsaufbau	8
1.2.2 Cuprizone Intoxikation & EAE Induktion	8
1.2.3 Gewebeaufbereitung	8
1.2.4 Histologische Färbungen, Immunhistochemie und deren Auswertung	8
1.2.5 Immunfluoreszenz-Analysen	9
1.2.6 Durchflusszytometrie	9
1.2.7 Humanes MS-Hirngewebe	9
1.2.8 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Imaging	9
1.2.9 Statistische Auswertung	9
1.3 Ergebnisse	9
1.3.1 Ergebnisse Veröffentlichung I	9
1.3.2 Ergebnisse Veröffentlichung II	11
1.4 Diskussion	12
2. Beitrag zu den Veröffentlichungen	14
2.1 Eigenanteil an Veröffentlichung I	14
2.2 Eigenanteil an Veröffentlichung II	14
3. Zusammenfassung	15
4. Summary	16
5. Veröffentlichung I	17
6. Veröffentlichung II	30
7. Literaturverzeichnis	49
Danksagung	52
Lebenslauf	53

Abkürzungsverzeichnis

ALDH1L1	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1
APP	Amyloid Precursor Protein
ATF3	Activating Transcription Factor 3
APC	Adenomatous Polyposis Coli Protein
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GZMB	Granzym B
H&E	Hämatoxylin & Eosin
IBA1	Ionized Calcium-Bindingadaptor Molecule 1
LFB/PAS	Luxol Fast Blue-Periodic Acid-Schiff
MAC3	Makrophagen-Differenzierungsantigen 3
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG ₃₅₋₅₅	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein Peptid Fragment 35-55
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PLP	Paraformaldehyd-Lysin-Perjodat
PTX	Pertussistoxin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROI	Region of Interest
TSPO	Translocator Protein
vGLUT1	Vesicular Glutamate Transporter 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

Publikationsliste

1. Nedelcu J, Reinbach C, Riedler P, et al.
“Lacquinimod ameliorates secondary brain inflammation”. *Neurobiology of Disease*. 2020; 134:104675. doi:10.1016/j.nbd.2019.104675
2. Kaddatz H, Joost S, Nedelcu J, et al.
“Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment”. *Glia*. 2020; doi: 10.1002/glia.23937
3. Fischbach F, Nedelcu J, Leopold P, et al.
“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
4. Nack A, Brendel M, Nedelcu J, et al.
“Expression of Translocator Protein and [18F]-GE180 Ligand Uptake in Multiple Sclerosis Animal Models”. *Cells*. 2019; 8(2):94. doi:10.3390/cells8020094

1. Einführung

1.1 Einleitung

Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die fokale Läsionen in der weißen und grauen Substanz verursacht (Calabrese et al., 2012; Lassmann et al., 2007). Zu den histopathologischen Merkmalen dieser Läsionen zählen Demyelinisierung, Gliazellaktivierung, Rekrutierung peripherer Immunzellen und axonale Degeneration (Bauer et al., 2001; Kipp et al., 2017). MS kann in drei klinische Verlaufsformen unterteilt werden: schubförmig-remittierend (RRMS), sekundär progredient (SPMS) und primär progredient (PPMS) (Lublin et al., 2014). Während das pathologische Korrelat der Schübe in RRMS die fokale, entzündliche Demyelinisierung ist, ist das irreversible Fortschreiten der Erkrankung der progredienten MS-Formen auf eine diffuse Immunreaktion und neuroaxonale Schädigung (*id est* Neurodegeneration) zurückzuführen (Kutzelnigg et al., 2005; Ontaneda et al., 2017).

Interessanterweise zeigen die für die Behandlung von RRMS derzeit zugelassenen Medikamente bei progressiver MS nur einen geringen bis keinen positiven Effekt (La Mantia et al., 2012; Lorscheider et al., 2017; Lublin et al., 2016). Dieser Mangel an wirksamen Medikamenten hängt mit den komplexen pathophysiologischen Mechanismen der progressiven MS zusammen, die zu großen Teilen noch unbekannt sind.

Trotz jahrzehntelanger Forschung ist immer noch unklar, wie (i) die Dysregulation des Immunsystems und (ii) die intrinsische Zytodegeneration zur Bildung neuer Läsionen führen und inwiefern sich diese beiden Komponenten gegenseitig beeinflussen. Die bisherige Annahme, dass die inflammatorische Immunreaktion Ursache der axonalen und neuronalen Degeneration ist (Frischer et al., 2009), wird zunehmend kontrovers diskutiert: Eine alternative Erklärung für den Zusammenhang von Entzündung und axonaler Schädigung könnte sein, dass neurodegenerative Prozesse (Absterben von Oligodendrozyten, Mikrogliazellaktivierung und axonale Schäden) die Rekrutierung peripherer Immunzellen auslösen (Barnett & Prineas, 2004). Tatsächlich konnte unsere Forschungsgruppe kürzlich nachweisen, dass eine primäre Oligodendrozytendegeneration in Mäusen nach Immunisierung mit dem Peptid Myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) die Rekrutierung peripherer Immunzellen ins Telencephalon zur Folge hat (Scheld et al., 2016). Hierfür wurde mittels Cuprizone die Apoptose von Oligodendrozyten im Vorderhirn induziert. Darauf folgte die Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ und Pertussistoxin (PTX) zur Bildung Myelin-autoreaktiver T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen - entsprechend der Induktion einer aktiven experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Im Gegensatz zu humanen MS-Läsionen, die im gesamten Hirngewebe inklusive Telencephalon nachgewiesen werden können (Lucchinetti et al., 2011), sind in klassischen EAE-Mausmodellen inflammatorische Läsionen fast ausschließlich im Cerebellum und Rückenmark zu finden (Rüther et al., 2017). Durch die Kombination des Cuprizone- und EAE-Modells lassen sich inflammatorische Läsionen nun auch im Telencephalon nachweisen. Dieses neuartige Tiermodell bietet so eine vielversprechende Möglichkeit, die Bedeutung hirnintrinsischer Degenerationskaskaden für die Rekrutierung von Immunzellen und Entstehung von aktiven MS-Läsionen näher zu untersuchen.

Laquinimod ist ein neuer oraler Immunmodulator, der die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung und Gliazellaktivierung hemmt und neuroprotektiv wirkt (Brück et al., 2012; Mishra et al., 2014). Im Rahmen der Phase III-Studie "ALLEGRO" konnte nachgewiesen werden, dass Laquinimod die Anzahl an Schüben reduziert und die Bildung MRT-sichtbarer Entzündungsherde bei Patienten mit RRMS (Comi et al., 2012) vermindert. Wir vermuten,

dass die neuroprotektiven Eigenschaften von Laquinimod die Ursache für die reduzierten Entzündungsherde im MRT sein könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit stellten wir die Hypothese auf, dass im oben beschriebenen Cup/EAE-Modell das Hemmen der Zytodegeneration durch Laquinimod sekundär die ZNS-Infiltration peripherer Immunzellen und so die Entwicklung entzündlicher Läsionen reduziert. Nach Verifizierung dieser These untersuchten wir, ob metabolische Oligodendrozytendegeneration ausreicht, um die Rekrutierung peripherer Immunzellen ohne die artifizielle Induktion autoreaktiver T-Zellen auszulösen. Hierfür wurde eine toxische Demyelinisierung mittels Cuprizone induziert und rekrutierte Lymphozyten hinsichtlich ihres Zelltyps, ihrer Zelldichte und ihres Aktivierungsstatus untersucht.

1.2 Material und verwendete Methoden

1.2.1 Versuchsaufbau

Für alle Experimente wurden Mäuse des Genotyps C57BL/6 verwendet. Im Folgenden ist der Versuchsaufbau der 1. Veröffentlichung dieser Arbeit näher beschrieben: Die Tiere wurden randomisiert den folgenden Versuchsgruppen zugeordnet: (1) Kontrolle, (2) Cup/Vehikel, (3) Cup/Laquinimod, (4) CupEAE/Vehikel und (5) CupEAE/Laquinimod. Den Gruppen (2) und (3) wurde für drei Wochen dem Futter beigemishtes Cuprizone verabreicht, gefolgt von zwei Wochen normalem Nagetierfutter. Während der ersten drei Wochen wurde den Tieren täglich, je nach Versuchsgruppe, entweder eine Vehikel- oder Laquinimod-Lösung mittels Schlundsonde appliziert. Tiere der Gruppen (4) und (5) wurden - nach Durchlaufen des identischen Behandlungsschemas wie Gruppe (2) und (3) - zu Beginn der 6. Versuchswoche mit dem Peptid MOG₃₅₋₅₅ immunisiert.

1.2.2 Cuprizone Intoxikation & EAE Induktion

Um Neurodegeneration im Telencephalon zu induzieren, wurden die Mäuse mittels einer 0,20 - 0,25 %igen Mischung aus Cuprizone und Trockenfutter intoxiciert, die Dosis sowie die Behandlungsdauer variierten je nach Fragestellung. Die Bildung Myelin-autoreaktiver T-Zellen im Sinne einer aktiven EAE wurde durch die Immunisierung mit dem Myelinpeptid MOG₃₅₋₅₅ und darauffolgender intraperitonealer Injektion von PTX erreicht.

1.2.3 Gewebeaufbereitung

Nach standardisierter Anästhesie wurden die Mäuse transkardial mit einer Paraformaldehyd-Lösung perfundiert. Gehirne und Rückenmark wurden nach protokollkonformer Postfixation in Paraffin eingebettet und koronare Schnitte für histologische Untersuchungen erstellt.

1.2.4 Histologische Färbungen, Immunhistochemie und deren Auswertung

Zufällig ausgewählte Hirn- und Rückenmarkschnitte wurden mit Luxol fast blue-periodic acid-Schiff (LFB/PAS) angefärbt, um das Ausmaß an Demyelinisierung zu untersuchen. Zur Quantifizierung der perivaskulären Infiltrate im Telencephalon wurden Hirnschnitte mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) gefärbt. Mittels Immunhistochemie wurden folgende Zellen visualisiert: Mikrogliazellen, Makrophagen und Astrozyten, um die Gliazellaktivierung zu untersuchen, sowie T-Zellen zur Untersuchung der Immunzellrekrutierung. Es wurden mehrere synaptische Proteine individuell als Marker für akuten axonalen Schaden gefärbt. Die Auswertungen erfolgten je nach Färbung in festgelegten "regions of interest" (ROI) mittels nicht-parametrischen Skalen und Indices, Bestimmung von Zelldichten und densitometrischen Quantifizierungen. Alle Auswertungen wurden von mindestens zwei unabhängigen, verblindeten Untersuchern durchgeführt.

1.2.5 Immunfluoreszenz-Analysen

Aufbereitete Schnitte wurden protokollkonform mit folgenden Kombinationen gefärbt: (1) Anti-CD3 mit anti-CD8, um das CD3/CD8-Verhältnis der rekrutierten T-Zellen zu bestimmen, (2) anti-CD3 mit Proliferationsmarkern, um proliferierende T-Zellen zu quantifizieren und (3) anti-CD3 mit anti-Granzym B (GZMB), um die Anzahl der aktivierten T-Zellen zu bestimmen. Weiter wurden CD3⁺/GZMB⁺ Zellen hinsichtlich ihres Flächenanteils an GZMB⁺-Vesikeln innerhalb der Zelle untersucht und - bei Überschreitung des festgelegten Grenzwerts - als polarisierte zytotoxische T-Zellen klassifiziert.

1.2.6 Durchflusszytometrie

Für die Fluoreszenzfärbungen wurden Einzelzellsuspensionen aus Vorderhirngewebe erstellt und mit den folgenden Antikörpern gefärbt: anti-CD45-APC/Fire und CD3-Brilliantviolett sowie CD4-Brilliantviolett und CD8 α -AlexaFlour. Die Proben wurden mit BD FACSAria™IIIu untersucht und die Daten mit der Software FlowJo analysiert.

1.2.7 Humanes MS-Hirngewebe

Chronisch aktive MS-Läsionen in postmortalem Hirngewebe von Spendern mit progredienter MS wurden auf die Dichte der entzündlichen Infiltrate in Relation zur Läsionsaktivität untersucht. Innerhalb der Läsionen wurde die Dichte und der Aktivierungsstatus der Lymphozyten sowie der Anteil zytotoxischer T-Zellen mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz bestimmt.

1.2.8 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Imaging

Aus den Gruppen Kontrolle, Cup/Vehikel und Cup/Laquinimod wurden je 4 Mäuse am Ende der 5. Versuchswoche mittels PET-Imaging auf Gliazellaktivierung in vivo untersucht. Alle PET-Verfahren folgten bereits publizierten Protokollen (Brendel et al., 2016).

1.2.9 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurden mittels der Software Prism 5 statistisch ermittelt. P-Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Ergebnisse Veröffentlichung I

Es wurde bereits nachgewiesen, dass Laquinimod die MOG₃₅₋₅₅-induzierte Immunantwort und axonale Schädigung bei Mäusen mit EAE reduziert (Aharoni et al., 2012; Kaye et al., 2016; Wegner et al., 2010). Im Rahmen der ersten Veröffentlichung untersuchten wir zunächst, ob Laquinimod auch in einem Modell metabolischer Oligodendrozytenschädigung, dem Cuprizone-Modell, protektiv wirkt.

Hierfür wurden die Mäuse für 3 Wochen mit Cuprizone intoxiciert. Währenddessen wurde der einen Gruppe täglich eine Vehikel-Lösung, der anderen eine Laquinimod-Lösung appliziert. Nach der 5. Woche wurden die Gehirne der getöteten Mäuse auf Demyelinisierung und Gliazellaktivierung in den folgenden Hirnebenen untersucht: Auf Höhe der Commissura anterior (R215) und des rostralen Hippocampus (R265).

In den Vorderhirnen der Gruppe Cup/Vehikel zeigte sich in den lateralen (R215) und medialen (R265) Anteilen des Corpus Callosums ein deutlicher Verlust der LFB-Färbeintensität, was auf eine fortgeschrittene Demyelinisierung hindeutet. Parallel zur Demyelinisierung kam es zu einer Akkumulation an ionized calcium-binding adaptor molecule

1 (IBA1)⁺ Mikrogliazellen, die in der Ebene R265 besonders ausgeprägt war. Diese Beobachtung wurde durch eine zusätzliche anti-Makrophagen Differenzierungsantigen 3 (MAC3)-Färbung bestätigt. Hier zeigte sich in den mit Cuprizone behandelten Tieren eine erhöhte Zelldichte an MAC3⁺ Mikrogliazellen und Monozyten in beiden Hirnebenen. Diese durch Cuprizone induzierten Prozesse - Demyelinisierung und Gliazellaktivierung - wurden durch die Behandlung mit Laquinimod signifikant reduziert. Darüber hinaus verhinderte Laquinimod die Cuprizone-bedingte Astrozytenaktivierung, wie die immunhistochemischen Färbungen anti-gliale fibrilläre acidic protein (GFAP), anti-Vimentin und anti-aldehyde dehydrogenase 1 family member L1 (ALDH1L1) verdeutlichten. Diese Ergebnisse deuten auf einen protektiven Effekt von Laquinimod im Cuprizone-Modell hin, welchen wir zusätzlich durch ein bildgebendes Verfahren in vivo nachweisen konnten. Hierfür wurden aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten durch [18F]-GE-180-PET visualisiert, wie kürzlich von unserer Gruppe beschrieben (Nack et al., 2019). In der Cup/Vehikel-Gruppe war die [18F]-GE-180-Aufnahme im medialen und lateralen Corpus Callosum signifikant erhöht, nicht aber in der Cup/Laquinimod-Gruppe. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Laquinimod die durch Cuprizone induzierte Myelin-Pathologie und Oligodendrozytenschädigung nahezu vollständig verhindert.

Weiter untersuchten wir, ob diese protektiven Eigenschaften von Laquinimod sekundär zu einer verminderten Rekrutierung peripherer Immunzellen nach EAE-Induktion führen. Wie bereits bewiesen, lassen sich bei klassischer MOG₃₅₋₅₅-induzierter EAE keine Immunzellen im Telencephalon nachweisen (Rüther et al., 2017; Scheld et al., 2016). Bei Kombination des Cuprizone- und EAE-Modells zeigt sich hingegen, dass die Cuprizone-bedingte Myelinschädigung zu einer sekundären Immunzellrekrutierung ins Vorderhirn führt und dort die Entstehung inflammatorischer Läsionen bedingt. Um die Rolle von Laquinimod in diesem neuartigen Modell zu untersuchen, wiederholten wir den Versuchsaufbau wie oben beschrieben, aber immunisierten beide Kohorten (Cup/Vehikel und Cup/Laquinimod) zu Beginn der 6. Woche mit dem Myelinpeptid MOG₃₅₋₅₅ und PTX. Zunächst überprüften wir, ob die EAE-Induktion eine vergleichbare Immunantwort in Vehikel- und Laquinimod-behandelten Mäusen auslöst. Es wurde kein signifikanter Unterschied für die klinischen Parameter "day of disease onset" (Tag der ersten Symptome), "cumulative disease score" (kumulativer EAE Score) und "maximum disease score" (maximaler EAE Score) beobachtet. Der Schweregrad der klinischen Symptome war somit in beiden Gruppen vergleichbar. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in dem Ausmaß an entzündlichen Infiltraten im Rückenmark der Vehikel- oder Laquinimod-behandelten Mäuse (CupEAE/Vehikel 10,34 ± 2,53 % vs. CupEAE/Laquinimod 7,72 ± 3,63 %; p = 0,1051).

Weiter untersuchten wir das Telencephalon in verschiedenen Hirnregionen auf perivaskuläre Infiltrate zum Nachweis aktiver MS-Läsionen. In CupEAE/Vehikel-Tieren wurden perivaskuläre Infiltrate im Kortex, Corpus Callosum und Subkortex nachgewiesen. In CupEAE/Laquinimod-Tieren war die Anzahl der perivaskulären Infiltrate dagegen signifikant geringer. Während bei den CupEAE/Vehikel-Tieren die durchschnittliche Anzahl perivaskulärer Cuffs pro Präparat 3,4 ± 2,9 betrug, waren es bei den CupEAE/Laquinimod-Tieren 0,7 ± 0,9 perivaskuläre Cuffs pro Präparat (p ≤ 0,0001). Um diese Beobachtung einer abgeschwächten Rekrutierung peripherer Immunzellen nach Laquinimod-Gabe zu bestätigen, analysierten wir Hirnschnitte mittels anti-CD4-Immunhistochemie auf das Vorkommen von T-Helferzellen. An vielen topographischen Stellen inklusive Kortex, Corpus Callosum und Subkortex wurde eine deutlich geringere CD4⁺ Zelldichte in den mit Laquinimod behandelten Tieren im Vergleich zu den Tieren ohne Laquinimod-Behandlung nachgewiesen.

Schließlich untersuchten wir, welche Auswirkungen Laquinimod auf neuroaxonale Schäden im CupEAE-Modell hat. Das Ausmaß an axonalem Schaden wurde anhand der Anzahl

axonaler Schwellungen, sogenannter Sphäroide, in anti-amyloid precursor protein (APP) gefärbten Schnitten ermittelt. In Vehikel-behandelten Mäusen konnten zahlreiche APP⁺ Sphäroide nachgewiesen werden, wohingegen in Mäusen mit Laquinimod-Behandlung nahezu keine zu finden waren. Ebenfalls als Marker für neuroaxonale Schädigung eignen sich die synaptischen Proteine Synaptophysin und vesicular glutamate transporter 1 (vGLUT1), welche in Sphäroiden akut geschädigter Axone akkumulieren (Gudi et al., 2017; Höfllich et al., 2016). Nach immunhistochemischer Visualisierung dieser Proteine fanden sich in CupEAE/Vehikel-Tieren hohe Dichten an vGLUT⁺ und Synaptophysin⁺ Sphäroiden, nicht aber in CupEAE/Laquinimod-Tieren.

Zusammengefasst verdeutlichen diese Ergebnisse, dass Laquinimod durch Reduktion der Oligodendrozytendegeneration sekundär die Invasion peripherer T-Zellen ins ZNS verhindert und im angewandten Modell stark neuroprotektiv wirkt.

1.3.2 Ergebnisse Veröffentlichung II

In dieser Studie untersuchten wir, ob metabolische Oligodendrozytenschädigung bedingt durch Cuprizone und ohne eine artifizielle Induktion Myelin-reaktiver T-Zellen ein möglicher Auslöser für die Rekrutierung peripherer Immunzellen in das ZNS sein kann.

Nach Induktion und histologischem Nachweis der Cuprizone-bedingten Demyelinisierung färbten wir das Hirngewebe mit dem Pan-T-Zell-Marker anti-CD3 und dem B-Zell-Marker anti-CD45R, um T- und B-Zellen nachzuweisen. Während B-Zellen während der gesamten Dauer der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung des ZNS nicht nachzuweisen waren, nahm die Dichte der CD3⁺ T-Zellen kontinuierlich zu. Dieser Anstieg zeigte sich bei CD4⁺ sowie CD8⁺ Zellen in verschiedenen Ebenen des demyelinisierten Corpus callosum. Diese Beobachtungen ließen sich an zwei weiteren Mauskohorten aus zwei unterschiedlichen Laboren verifizieren.

Als nächstes untersuchten wir, ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an T-Zellen und dem Schweregrad der Myelinschädigung besteht. Hierfür analysierten wir das Corpus Callosum hinsichtlich der CD3⁺ Zelldichte und des Ausmaßes an Demyelinisierung in anti-paraformaldehyd lysin perjodat (PLP)-gefärbten Schnitten. Durch Korrelation der beiden Variablen Myelindichte und Dichte der CD3⁺ Zellen, konnten wir eine statistisch signifikante Beziehung zwischen beiden Variablen nachweisen.

Im Gegensatz zu den meisten EAE-Modellen, in denen überwiegend CD4⁺ T-Zellen in Entzündungsinfiltraten nachgewiesen werden (Belikan et al., 2018), besteht der Großteil der T-Zell-Infiltration in humanen MS-Läsionen aus CD8⁺ T-Zellen (Babbe et al., 2000; Junker et al., 2007; Machado-Santos et al., 2018). Um diesen Aspekt im Cuprizone-Modell näher zu untersuchen, führten wir Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen durch und quantifizierten das CD8/CD3-Verhältnis im Hirngewebe von Mäusen nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. Hier zeigte sich, dass mehr als die Hälfte der CD3⁺ Zellen CD8⁺ zytotoxische T-Zellen waren, was sich auch in der Durchflusszytometrie bestätigte: Im Hirngewebe der Cuprizone-intoxikierten Mäuse konnten wir zahlreiche CD3⁺ Zellen nachweisen, mehrheitlich CD8⁺ T-Zellen.

Weiter analysierten wir, ob die rekrutierten T-Lymphozyten einen aktivierten Phänotyp aufzeigen. Hierfür wurden Lymphozyten auf die Expression von GZMB sowie den Proliferationsmarkern KI-67 und proliferating-cell-nuclear-antigen (PCNA) untersucht. In beiden Hirnregionen kam es zu einem deutlichen Anstieg sowohl der KI-67- als auch der PCNA-Expression. Zudem nahm mit fortschreitender Demyelinisierung die Dichte der GZMB-exprimierenden Zellen deutlich zu. In Woche 5 färbte sich nahezu die Hälfte der CD3⁺ Zellen positiv für GZMB.

Die Polarisation zytolytischer Granula innerhalb der T-Zelle ist ein entscheidender Schritt der Lymphozyten-vermittelten Zytotoxizität und somit ein weiterer Indikator für Aktivität (Mouchacca et al., 2013). Folglich untersuchten wir die räumliche Verteilung der

GZMB-Expression je Zelle. Hier zeigte sich, dass in mehr als 50% der CD3⁺/GZMB⁺ Zellen die zytolytische Granula-Expression nicht gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt, sondern stark auf einen Sektor des Zellkörpers konzentriert war.

Auf histopathologischer Ebene wurde ein Zusammenhang zwischen Entzündung und Neurodegeneration in MS-Gehirnen nachgewiesen (Frischer et al., 2009). Um diesen Zusammenhang in unserer Studie zu überprüfen, wurden Hirnschnitte mittels anti-IBA1-, anti-CD3- und anti-APP-Immunhistochemie untersucht und die Färbungsintensitäten korreliert. Hier fanden wir, dass zwischen dem Ausmaß an akuter axonaler Schädigung, der Dichte der Mikroglia und der Anzahl an T-Zellen eine signifikante Korrelation besteht.

Wie in der ersten Veröffentlichung nachgewiesen, mildert Laquinimod die Cuprizone-bedingte Myelin-Pathologie deutlich ab. Um zu prüfen, ob dieser protektive Effekt von Laquinimod im Cuprizone-Modell sekundär zu einer reduzierten T-Zell-Rekrutierung führt, haben wir Schnitte aus dieser Studie anti-CD3 gefärbt. Erwartungsgemäß zeigte sich in beiden Hirnebenen eine hohe Anzahl an CD3⁺ Zellen in Cup/Vehikel-, aber nicht in Cup/Laquinimod-Mäusen.

Zuletzt untersuchten wir, ob aktive Läsionen von Cuprizone-intoxikierten Mäusen und von Patienten mit progredienter MS hinsichtlich Lymphozytendichte, Anteil zytotoxischer T-Zellen sowie Aktivierungsstatus vergleichbar sind. Um die Dichte der entzündlichen Infiltrate in Relation zur Läsionsaktivität zu analysieren, wurde je Patient eine chronisch aktive Läsion mittels immunhistochemischen T-Zellmarkern und Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Erwartungsgemäß war die ausgeprägteste CD3⁺ Zelldichte im aktiven Läsionsrand zu sehen, wohingegen sich eine deutlich geringere Anzahl an CD3⁺ Zellen außerhalb der Läsionen zeigte. Weiter zeigte eine Subanalyse von CD3- und CD8-exprimierenden T-Zellen, dass - wie im Cuprizone-Modell - auch in MS-Läsionen die deutliche Mehrheit der T-Zell-Infiltration aus CD8⁺ T-Zellen besteht. Zusätzlich analysierten wir den Anteil der aktivierten CD3⁺ Zellen mittels des Aktivierungsmarkers GZMB: In Übereinstimmung mit den Ergebnissen im Cuprizone-Modell war der Anteil der CD3⁺ Zellen mit GZMB-Expression innerhalb der Läsion signifikant höher als im läsionsfreien Parenchym.

1.4 Diskussion

In der ersten Veröffentlichung dieser Arbeit haben wir mittels eines neuartigen MS-Tiermodells (*id est* Cup/EAE) gezeigt, dass sich die orale Laquinimod-Behandlung protektiv auf Demyelinisierung und Neurodegeneration auswirkt. Der protektive Effekt von Laquinimod im Cuprizone-Modell wurde bereits in früheren Veröffentlichungen belegt (Brück et al., 2012; Kramann et al., 2016). In diesen Arbeiten wird vermutet, dass Laquinimod eine Modulation der Astrozytenfunktion bedingt und so Gliazellaktivierung und Demyelinisierung abschwächt. In unserer Studie konnten wir zusätzlich zeigen, dass die pharmakologische Reduktion der Cuprizone-induzierten Pathologie durch Laquinimod sekundär zu einer verminderten Immunzellrekrutierung ins Vorderhirn führt.

Gerade bei den progredienten MS-Formen, deren irreversibler Krankheitsverlauf durch neuroaxonale Schädigung bedingt wird (Kutzelnigg et al., 2005; Ontaneda et al., 2017), ist das Verständnis des Zusammenhangs zwischen Entzündungsreaktion und Neurodegeneration von zentraler Bedeutung für zukünftige Therapieansätze. Histopathologische Studien zeigten, dass bei progressiver MS die Dichte an Lymphozyten im ZNS-Parenchym positiv mit dem Ausmaß an akuter axonaler Schädigung korreliert (Frischer et al., 2009; Kuhlmann et al., 2002). Weitere Studien deuten darauf hin, dass in EAE die direkte Interaktion von MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Th17 und neuronalen Zellen zu einer ausgedehnten, axonalen Schädigung führt (Siffrin et al., 2010). Unsere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass auch das Gegenteil zutreffen kann: Neurodegeneration kann die Bildung neuer, fokal-entzündlicher Läsionen durch Immunzellrekrutierung auslösen.

Therapeutische Maßnahmen, die primär degenerative Prozesse reduzieren, könnten somit sekundär das Entzündungsausmaß im ZNS senken und das irreversible Fortschreiten der Erkrankung verhindern.

In der zweiten Veröffentlichung dieser Arbeit konnten wir diese Beobachtungen im Cuprizone-Modell bestätigen und die Immunzellrekrutierung näher untersuchen. Wir zeigten, dass sowohl im Cuprizone-Modell als auch im postmortalen Gewebe von Patienten mit progredienter MS T-Zellen in das ZNS rekrutiert werden und der Großteil dieser T-Zell-Infiltration aus CD8⁺ T-Zellen besteht. Diese Ergebnisse entsprechen dem CD4/CD8-Verhältnis in humanen MS-Läsionen und stehen in starkem Kontrast zu den meisten EAE-Modellen, wo mehrheitlich CD4⁺ Zellen die Entzündungsreaktion auslösen (Duarte et al., 2012). Die Cuprizone-induzierte T-Zellrekrutierung ähnelt somit den pathologischen Prozessen der MS im menschlichen Gehirn. Ob bei progredienter MS T-Zellen kontinuierlich ins ZNS rekrutiert werden ist unklar. Verschiedene Autoren vermuten, dass eine chronische Entzündung mit Gliazellaktivierung hinter einer unpassierbaren Bluthirnschranke zu Neurodegeneration führt und damit den klinischen Krankheitsverlauf fördert (Faissner et al., 2019). Die Ergebnisse unserer Studie deuten jedoch darauf hin, dass periphere CD4⁺ und CD8⁺ Zellen kontinuierlich ins ZNS invadieren, ausgelöst durch hirnintrinsische degenerative Prozesse. Wir zeigten, dass eine Cuprizone-induzierte metabolische Oligodendrozytendegeneration ohne zusätzliche Immunstimulation (z.B. mittels EAE) ein potenter Auslöser für die Rekrutierung von T-Zellen ins ZNS ist. Dieses Modell bietet somit eine vielversprechende Möglichkeit, den Pathomechanismus der progressiven MS-Formen und die Rolle der T-Lymphozyten in diesem genauer zu untersuchen.

2. Beitrag zu den Veröffentlichungen

2.1 Eigenanteil an Veröffentlichung I

Das Thema der Publikation mit dem Namen "Laquinimod ameliorates secondary brain inflammation" sowie das Konzept und Design der Studie entwickelte ich in enger Zusammenarbeit mit meinem Betreuer Prof. Markus Kipp und Co-Autorin Christin Reinbach. Ich war verantwortlich für den in-vivo Versuchsaufbau (tägliche Pflege und Versorgung der Mäuse, Intoxikation mit Cuprizone, Schlundsondierung, Induktion der EAE und tägliches klinisches Scoring der Mäuse). Weiter wurde die Anästhesie der Mäuse und Gewebeaufbereitung der Gehirne und Rückenmarke von mir ausgeführt. Auch führte ich die histologischen Färbungen, deren Auswertung und statistische Analyse und die Interpretation der Ergebnisse durch. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde der in-vivo Versuchsablauf mit einer reduzierten Anzahl an Tieren von mir wiederholt. Die genannten Prozesse und Abläufe führte ich zusammen mit meiner Co-Autorin Christin Reinbach durch. Weiter setzte sich mein Beitrag aus dem Verfassen des Manuskripts und dem Erstellen der veranschaulichenden Grafiken zusammen. Ich wurde durch meine Co-Autoren in der Durchführung und Datenerhebung der bildgebenden Verfahren mittels PET-Scans sowie der immunhistochemischen Astrozyten-, anti-vGLUT1 und anti-Synaptophysin-Färbungen unterstützt. Prof. Kipp unterstützte mich bei der Korrektur des Manuskripts und stand stets für wissenschaftliche Fragestellungen zur Verfügung.

2.2 Eigenanteil an Veröffentlichung II

Der Eigenanteil an der Publikation mit dem Titel "Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment" setzte sich wie folgt zusammen: Ich war beteiligt an der Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen anti-CD3-Färbungen zum Nachweis des protektiven Effekts von Laquinimod im Cuprizone-Modell. Zusätzlich wurde der visuelle Nachweis der Antigen-präsentierenden Funktion von Mikrogliazellen nach Oligodendrozytenschädigung durch Cuprizone von mir durchgeführt. Dafür fertigte ich eine dreidimensionale Rekonstruktion einer Mikrogliazelle und der phagozytierten Myelinfragmente an, veranschaulichte die Ergebnisse und beteiligte mich an der Verfassung und Korrektur des Manuskripts (Im Zuge der Revision sind die Ergebnisse der Mikrogliazellen-Rekonstruktion nicht mehr in der finalen Version der Publikation enthalten).

3. Zusammenfassung

Es gibt zunehmend Hinweise, dass degenerative Prozesse im Gehirn die Bildung neuer, fokal-entzündlicher Läsionen bei MS auslösen können. Gerade bei progressiver MS sind die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten begrenzt und daher das Verständnis über den Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und Entzündungsreaktion von zentraler Bedeutung für zukünftige Therapieansätze. In der ersten Studie dieser Arbeit testeten wir in einem neuartigen MS-Tiermodell (*id est* Cup/EAE), ob eine Reduktion der degenerativen Prozesse die sekundäre Rekrutierung peripherer Immunzellen, und in Folge dessen die Entstehung entzündlicher Läsionen mindert. In der zweiten Studie untersuchten wir, ob die Cuprizone-induzierte metabolische Oligodendrozytenschädigung ein Auslöser für die Rekrutierung peripherer Immunzellen in das ZNS darstellt.

Für die erste Studie wurden die Tiere zur Induktion der oligodendrozytären Degeneration mit Cuprizone intoxiciert und zeitgleich mit Laquinimod behandelt, um die Cuprizone-bedingten Pathologien abzuschwächen. Die Entwicklung Myelin-spezifischer T-Zellen wurde durch die Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ (*id est* aktive EAE) induziert. Das Ausmaß an Demyelinisierung, Gliose, Neurodegeneration und Immunzellrekrutierung wurde mittels histologischer Färbungen und Immunhistochemie bestimmt. Zur Analyse der Aktivierung von Gliazellen *in vivo* wurde eine PET-Bildgebung durchgeführt. Für die zweite Studie wurden immunhistochemische und durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt, um die Zusammensetzung, die Dichte und den Aktivierungsstatus von infiltrierenden T-Lymphozyten in mit Cuprizone behandelten Mäusen und postmortalem progressiven MS-Gewebe zu beurteilen.

Es zeigte sich, dass die Cuprizone-induzierten Pathologien (Demyelinisierung, Gliazellaktivierung und verstärkte TSPO-Ligandenbindung) durch die Laquinimod-Behandlung signifikant reduziert wurden. Bei den mit Vehikel behandelten Cup/EAE-Mäusen wurde eine massive Rekrutierung peripherer Immunzellen in das Vorderhirn und die Entstehung multifokaler perivaskulärer Entzündungsherde nachgewiesen. Diese durch Cuprizone ausgelöste Immunzellrekrutierung wurde durch Laquinimod deutlich reduziert.

Die Ergebnisse der zweiten Publikation zeigten ein Überwiegen von aktivierten und proliferierenden, CD8⁺ T-Zellen gegenüber CD4⁺ Zellen im ZNS nach Cuprizone-Gabe. Die Anzahl und Zusammensetzung dieser lymphozytären Infiltrate in Cuprizone-behandelten Mäusen war vergleichbar mit den Infiltraten in humanem MS-Gewebe. Bei Behandlung der Mäuse mit Cuprizone und gleichzeitig Laquinimod wurde neben der Verringerung der Cuprizone-bedingten Pathologien auch eine signifikante Reduktion der Anzahl rekrutierter T-Zellen nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen deutlich, dass (i) primäre Oligodendrozytendegeneration ein ausreichender Auslöser für die Rekrutierung peripherer T-Zellen ins ZNS ist und (ii) die Abschwächung hirnintrinsischer degenerativer Prozesse sekundär die Immunzellrekrutierung und so die Entwicklung entzündlicher Läsionen stoppt. Die weitere Untersuchung der Wirkungsweise und der funktionellen Konsequenzen der T-Zell-Rekrutierung könnte vielversprechende neue therapeutische Ansätze für progressive MS-Formen bieten.

4. Summary

There is growing evidence that degenerative processes in the brain can trigger the formation of new inflammatory lesions in patients with MS. Especially when it comes to progressive MS, current treatment options are limited and therefore a better understanding of the relationship between neurodegeneration and inflammatory response is key for future therapeutic approaches. With the first study of this manuscript, we tested in a novel MS animal model (Cup/EAE) whether the reduction of degenerative processes reduces the recruitment of peripheral immune cells and thus the development of inflammatory lesions. In the second study, we investigated whether cuprizone-induced oligodendrocyte injury is a trigger for the recruitment of peripheral immune cells into the CNS.

In the first study, the animals were intoxicated with cuprizone to induce oligodendrocyte degeneration and simultaneously treated with laquinimod to ameliorate the cuprizone-induced pathology. Then, the development of myelin-specific T cells was induced by immunization with MOG₃₅₋₅₅ (active EAE). The extent of demyelination, gliosis, neurodegeneration and immune cell recruitment was determined by histological staining and immunohistochemistry. PET imaging was performed to analyze glia activation *in vivo*. For the second study, immunohistochemical and flow cytometric investigations were performed to analyze composition, density and activation status of infiltrating T lymphocytes in cuprizone-treated mice and postmortem progressive MS tissue.

Results from the first study showed that cuprizone-related pathologies (demyelination, glial cell activation and enhanced TSPO ligand binding) were significantly reduced by laquinimod treatment. Furthermore, in vehicle-treated Cup/EAE mice cuprizone-induced oligodendrocyte degeneration triggered a massive recruitment of peripheral immune cells into the forebrain, which led to the development of multifocal perivascular inflammatory lesions. This cuprizone-induced immune cell recruitment was significantly reduced by laquinimod. Results from the second study showed a predominance of activated and proliferating CD8⁺ T cells compared to CD4⁺ cells in the CNS after cuprizone administration. The number and composition of these lymphocytic infiltrates in cuprizone-treated mice was comparable to infiltrates in human MS tissue. Furthermore, in the cuprizone model, treatment with laquinimod significantly reduced the number of recruited T cells by ameliorating cuprizone-induced pathologies.

These findings demonstrate that (i) primary oligodendrocyte degeneration is a sufficient trigger for the recruitment of peripheral T cells into the CNS and (ii) the amelioration of brain-intrinsic degenerative processes secondarily halts immune cell recruitment and thus the development of inflammatory lesions. Further investigation of the functional consequences of T cell recruitment may offer new therapeutic approaches for progressive MS.

5. Veröffentlichung I

“Laquinimod ameliorates secondary brain inflammation”

Nedelcu J, Reinbach C, Riedler P, Brendel M, Rominger A, Kaye J, Behrangi N, Jiangshan Z, Schmitz C, Kipp M. Laquinimod ameliorates secondary brain inflammation. *Neurobiol Dis.* 2020 Feb;134:104675. Epub 2019 Nov 13. PMID: 31731041.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104675>

6. Veröffentlichung II

“Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment”

Kaddatz H, Joost S, Nedelcu J, Chrzanowski U, Schmitz C, Gingele S, Gudi V, Stangel M, Zhan J, Santrau E, Greiner T, Frenz J, Müller-Hilke B, Müller M, Amor S, van der Valk P, Kipp M. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia*. 2020 Nov 27. doi: 10.1002/glia.23937. Epub ahead of print. PMID: 33245604.

<https://doi.org/10.1002/glia.23937>

7. Literaturverzeichnis

- Aharoni R, Saada R, Eilam R, Hayardeny L, Sela M, Arnon R. Oral treatment with laquinimod augments regulatory T-cells and brain-derived neurotrophic factor expression and reduces injury in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2012;251(1-2):14-24. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.06.005
- Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 2004 Apr;55(4):458-68. doi: 10.1002/ana.20016
- Bauer J, Rauschka H, Lassmann H. Inflammation in the nervous system: the human perspective. *Glia.* 2001 Nov;36(2):235-43. doi: 10.1002/glia.1112
- Baxi EG, DeBruin J, Tosi DM, et al. Transfer of myelin-reactive th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice. *J Neurosci.* 2015;35(22):8626-8639. doi:10.1523/JNEUROSCI.3817-14.2015
- Belikan P, Bühler U, Wolf C, Pramanik GK, Gollan R, Zipp F, Siffrin V. CCR7 on CD4+ T Cells Plays a Crucial Role in the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 2018 Apr 15;200(8):2554-2562. doi: 10.4049/jimmunol.1701419
- Brendel M, Probst F, Jaworska A, et al. Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid Mouse Model: A Triple-Tracer PET Study. *J Nucl Med.* 2016;57(6):954-960. doi:10.2967/jnumed.115.167858
- Brück W, Pfortner R, Pham T, et al. Reduced astrocytic NF-κB activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination. *Acta Neuropathol.* 2012;124(3):411-424. doi:10.1007/s00401-012-1009-1
- Calabrese M, Poretto V, Favaretto A, et al. Cortical lesion load associates with progression of disability in multiple sclerosis. *Brain.* 2012;135(Pt 10):2952-2961. doi:10.1093/brain/aws246
- Comi G, Jeffery D, Kappos L, et al. Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;366(11):1000-1009. doi:10.1056/NEJMoa1104318
- Dando SJ, Kazanis R, Chinnery HR, McMenamin PG. Regional and functional heterogeneity of antigen presenting cells in the mouse brain and meninges. *Glia.* 2019 May;67(5):935-949. doi: 10.1002/glia.23581
- Duarte J, Carrié N, Oliveira VG, Almeida C, Agua-Doce A, Rodrigues L, Simas JP, Mars LT, Graca L. T cell apoptosis and induction of Foxp3+ regulatory T cells underlie the therapeutic efficacy of CD4 blockade in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2012 Aug 15;189(4):1680-8. doi: 10.4049/jimmunol.1201269
- Faissner S, Plemel JR, Gold R, Yong VW. Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(12):905-922. doi:10.1038/s41573-019-0035-2
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009;132(Pt 5):1175-1189. doi:10.1093/brain/awp070
- Gudi V, Gai L, Herder V, Tejedor LS, Kipp M, Amor S, Sühs KW, Hansmann F, Beineke A, Baumgärtner W, Stangel M, Skripuletz T. Synaptophysin Is a Reliable Marker for Axonal Damage. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017 Feb;76(2):109-125. doi: 10.1093/jnen/nlw114

Höflich KM, 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 Res.* 2016 Nov 1;1650:125-133. doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.048

Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, Meinl E, Hohlfeld R, Dornmair K. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain.* 2007 Nov;130(Pt 11):2789-99. doi: 10.1093/brain/awm214

Kaye J, Piryatinsky V, Birnberg T, et al. Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(41):E6145-E6152. doi:10.1073/pnas.1607843113

Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol.* 2017;27(2):123-137. doi:10.1111/bpa.12454

Kramann N, Menken L, Hayardeny L, Hanisch UK, Brück W. Laquinimod prevents cuprizone-induced demyelination independent of Toll-like receptor signaling. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016 May 17;3(3):e233. doi: 10.1212/NXI.0000000000000233

Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain.* 2002;125(Pt 10):2202-2212. doi:10.1093/brain/awf235

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain.* 2005;128(Pt 11):2705-2712. doi:10.1093/brain/awh641

La Mantia L, Vacchi L, Di Pietrantonj C, Ebers G, Rovaris M, Fredrikson S, Filippini G. Interferon beta for secondary progressive multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Jan 18;1:CD005181. doi: 10.1002/14651858.CD005181.pub3

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007;17(2):210-218. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x

Lorscheider J, Jokubaitis VG, Spelman T, Izquierdo G, Lugaresi A, Havrdova E, Horakova D, Trojano M, Duquette P, Girard M, Prat A, Grand'Maison F, Grammond P, Pucci E, Boz C, Sola P, Ferraro D, Spitaleri D, Lechner-Scott J, Terzi M, Van Pesch V, Iuliano G, Bergamaschi R, Ramo-Tello C, Granella F, Oreja-Guevara C, Butzkueven H, Kalincik T; MSBase Study Group. Anti-inflammatory disease-modifying treatment and short-term disability progression in SPMS. *Neurology.* 2017 Sep 5;89(10):1050-1059. doi: 10.1212/WNL.0000000000004330

Lublin F, Miller DH, Freedman MS, Cree BAC, Wolinsky JS, Weiner H, Lubetzki C, Hartung HP, Montalban X, Uitdehaag BMJ, Merschhemke M, Li B, Putzki N, Liu FC, Häring DA, Kappos L; INFORMS study investigators. Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2016 Mar 12;387(10023):1075-1084. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01314-8

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014 Jul 15;83(3):278-86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560

- Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2188-97. doi: 10.1056/NEJMoa1100648
- Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, Bien CG, Bauer J, Lassmann H. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018 Jul 1;141(7):2066-2082. doi: 10.1093/brain/awy151
- Mishra MK, Wang J, Keough MB, et al. Laquinimod reduces neuroaxonal injury through inhibiting microglial activation. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1(6):409-422. doi:10.1002/acn3.67
- Mouchacca P, Schmitt-Verhulst AM, Boyer C. Visualization of cytolytic T cell differentiation and granule exocytosis with T cells from mice expressing active fluorescent granzyme B. *PLoS One*. 2013 Jun 28;8(6):e67239. doi: 10.1371/journal.pone.0067239
- Nack A, Brendel M, Nedelcu J, et al. Expression of Translocator Protein and [18F]-GE180 Ligand Uptake in Multiple Sclerosis Animal Models. *Cells*. 2019;8(2):94. Published 2019 Jan 28. doi:10.3390/cells8020094
- Ohno N, Chiang H, Mahad DJ, et al. Mitochondrial immobilization mediated by syntaphilin facilitates survival of demyelinated axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9953-9958. doi:10.1073/pnas.1401155111
- Ontaneda D, Thompson AJ, Fox RJ, Cohen JA. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *Lancet*. 2017;389(10076):1357-1366. doi:10.1016/S0140-6736(16)31320-4
- Rüther BJ, Scheld M, Drey Mueller D, et al. 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
- Scheld M, Rüther BJ, Große-Veldmann R, et al. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci*. 2016;36(4):1410-1415. doi:10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016
- Siffrin V, Radbruch H, Glumm R, Niesner R, Paterka M, Herz J, Leuenberger T, Lehmann SM, Luenstedt S, Rinnenthal JL, Laube G, Luche H, Lehnardt S, Fehling HJ, Griesbeck O, Zipp F. In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):424-36. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.018
- Wegner C, Stadelmann C, Pförtner R, et al. 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*. 2010;227(1-2):133-143. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.07.00

Danksagung

Ich danke allen Personen und Institutionen, die direkt oder indirekt an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp. Ich konnte mich zu jedem Zeitpunkt auf sein umfassendes fachliches Wissen, seine konstruktiven Anregungen und sein großes Engagement, auf seine Loyalität und seine direkte Art verlassen. Ohne diese säße ich wohl heute noch an meinen Auswertungen. Danke für die Motivation, die schnellen Antworten auch sonntags um 6 Uhr früh, für die herausragende Betreuung, für die gute Zeit.

Ebenso ein großer Dank an Frau Prof. Dr. Tanja Hochstrasser für die Unterstützung und stets kompetente Hilfe bei der Durchführung der Experimente und Auswertungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Mit-Doktorandin Frau Christin Reinbach danke ich für die stete Hilfe und Unterstützung, die Aufmunterungen, die positive Art und den guten Musikgeschmack im Labor. Danke für die tiefe Freundschaft, die geteilten Mittagessen und, dass sie mich 7 Tage die Woche während all der Stunden im Tierstall und Labor ausgehalten hat.

Besonderer Dank gilt allen Ko-Autoren der vorliegenden Publikationen, die durch ihre Arbeit wesentlich zum Gelingen beigetragen haben.

Weiter danke ich herzlichst den technischen MitarbeiterInnen des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München, insbesondere Frau Beate Aschauer, Frau Astrid Baltruschat, Frau Barbara Mosler, Frau Sarah Wübbel und Frau Sabine Tost. Dank ihrer Hilfsbereitschaft und Geduld fühlte ich mich nur noch halb so verloren im Wust der Färbungsprotokolle und Laborregeln.

Ich hoffe, dass wir mit den Ergebnissen dieser Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathomechanismen der Multiplen Sklerose geleistet haben und so der Zeitpunkt der Etablierung einer Kausaltherapie für MS-Patienten etwas näher rückt.