

Aus dem
Institut für Klinische Neuroimmunologie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Dendritische Pathologie in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose

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

vorgelegt von
Stefan Sebastian Konrad Syma

aus
Mannheim

Jahr
2024

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Mitberichtserstatter: Prof. Dr. Dr. Anna-Sophia Wahl
Prof. Dr. Patrick Harter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Christoph Mahler

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2024

Eidesstattliche Versicherung

Stefan Syma

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Dendritische Pathologie in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose

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

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

München, 1. Juli 2024

Stefan Syma

This work is licensed under CC BY-SA 4.0

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
Zusammenfassung	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Klinische Verlaufsformen	3
1.1.3 Pathologie	4
1.1.4 Diagnostik und Therapie	9
1.2 EAE als Modell der Multiplen Sklerose	11
1.2.1 Einführung des EAE-Modells	11
1.2.2 Chronische EAE-Modelle	12
1.3 Morphologie und Organisation spinaler Motoneurone	15
1.4 Spinale Pathologie in MS und EAE	17
2 Fragestellung und Zielsetzung	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Reagenzien	23
3.1.2 Materialien	24

3.1.3	Geräte	25
3.1.4	Software	25
3.1.5	Versuchstiere	26
3.2	Methoden	26
3.2.1	Induktion der EAE	26
3.2.2	Verhaltensanalysen	27
3.2.3	Histologie	29
3.2.4	Mikroskopie	31
3.2.5	Datenanalyse	31
4	Ergebnisse	35
4.1	Chronische MOG-induzierte EAE in Biozzi AB/H Mäusen	35
4.1.1	Verhaltensanalysen	35
4.1.2	Analyse der Immunpathologie	38
4.2	Analyse der dendritischen Pathologie	41
4.3	Analyse der synaptischen Pathologie	44
5	Diskussion	49
5.1	Chronische EAE als Modell der progredienten MS	49
5.1.1	Verhaltensanalysen	49
5.1.2	Histopathologische Analysen	53
5.2	Pathomechanismen der entzündlichen Schädigung von Dendriten und Synapsen	57
5.3	Therapeutische Interventionsmöglichkeiten	60
6	Schlussfolgerung	65
	Literaturverzeichnis	67
	Danksagung	95

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
ChAT	Choline-Acetyltransferase
CSF1R	Kolonie-stimulierender Faktor-1 Rezeptor
CREAE	chronisch-schubförmige EAE
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
GABA	γ -Aminobuttersäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IL-1β	Interleukin-1 β
i.v.	intravenös
Lfng	lunatic fringe
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose

NBQX	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzochinoxalin-2,3-dion
NRF1	nukleärer respiratorischer Faktor 1
PBS	Standard Phosphatpufferlösung
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PFA	Paraformaldehyd
PPMS	Primär Progrediente Multiple Sklerose
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RRMS	Schubförmig Remittierende Multiple Sklerose
SPMS	Sekundär Progrediente Multiple Sklerose
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

1.1	Fokale und diffuse Pathologie in Patienten mit progredienter MS	5
1.2	Darstellung der Neuriten eines einzelnen Motoneurons	16
1.3	Verteilung demyelinisierender Läsionen in der MS und EAE	18
4.1	Klinischer Verlauf der MOG-induzierten EAE in Biozzi AB/H Mäusen . .	36
4.2	Neurologische Evaluation mittels RotaRod- und Ataxie-Score	37
4.3	Ausdehnung und Verteilung der Läsionen zu den verschiedenen Analysezeit- punkten	39
4.4	Differenzierung der Immunzellinfiltrate in Läsionen zu den verschiedenen Analysezeitpunkten	40
4.5	Dendritische Pathologie in akuter und chronischer EAE	42
4.6	Synaptische Pathologie in akuter und chronischer EAE	45

Tabellenverzeichnis

1.1	Enzephalitogene Proteine und Epitope in Biozzi AB/H Mäusen	14
3.1	Beurteilungssystem der EAE-Symptomatik	27
3.2	Beurteilungssystem der Ataxie	28
3.3	Liste verwendeter Färbungen/Antikörper	30
3.4	Aufnahmeeinstellungen der konfokalen Mikroskopie	31

Zusammenfassung

Die MS als chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS stellt einen der häufigsten Gründe für Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar. Während bei der Behandlung des schubförmigen Verlaufs auf ein großes Repertoire wirksamer immunsuppressiver Therapien zurückgegriffen werden kann, zeigen dieselben Therapeutika bei Patienten mit progredienter MS keine oder nur eine unzureichende Wirkung. Zeitgleich ist vor allem die kontinuierliche Krankheitsprogression für das Ausmaß der anhaltenden Behinderung verantwortlich. Aus diesem Grund hat die Entwicklung effektiverer Therapieoptionen höchste Priorität. Dies bedarf allerdings eines besseren pathomechanistischen Verständnisses für den progredienten Verlauf. Dabei könnten vor allem chronische EAE-Modelle dazu dienen, Pathomechanismen zu entschlüsseln, die auch der progredienten MS zugrunde liegen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die neurodegenerativen Veränderungen der chronischen MOG-EAE in Biozzi AB/H Mäusen klinisch und histopathologisch zu charakterisieren. Im Fokus stand dabei die Evaluation der Veränderungen der Dendriten und Synapsen in der weißen Substanz des Rückenmarks.

Im Mausmodell waren dabei sowohl chronische als auch chronisch-schubförmige Verläufe zu beobachten. Zudem zeigte sich im späteren Verlauf der Erkrankung eine sukzessive Ausbildung spastischer Paresen und das Auftreten atypisch-ataktischer Symptome. Wir konnten zeigen, dass zusätzliche Verhaltensanalysen wie der RotaRod-Performance-Test und das Erheben eines Ataxie-Scores eine umfassendere Beschreibung und feinere Diskrimination der klinischen Defizite ermöglichen.

Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler Mikroskopie konnten wir nachweisen, dass es in Läsionen der EAE zu einer Retraktion von Dendriten der spinalen weißen Substanz kommt, wobei die Dichte der Synapsen an bestehenden Dendriten weitgehend un-

verändert bleibt. In der Zusammenschau mit weiteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe ergab sich, dass diese Dendritenschädigung überwiegend bereits im akuten entzündlichen Stadium der Erkrankung ausgelöst wird und im chronischen Krankheitsverlauf nicht wesentlich weiter fortschreitet.

Diese Form der Dendritenschädigung ist bisher in der MS nicht beschrieben, weshalb künftige Studien zeigen müssen, inwieweit diese Pathologie auch Teil der Neurodegeneration der progredienten MS ist. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Pathomechanismen ist Gegenstand aktueller Experimente und könnte neue Ansatzpunkte für neuroprotektive Therapieoptionen liefern.

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Allgemeines

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), von der weltweit schätzungsweise 2,8 Millionen Menschen betroffen sind [1], davon über 200.000 alleine in Deutschland [2]. Bei einem Manifestationsgipfel um das 30. Lebensjahr [2] ist die MS einer der häufigsten Gründe für Behinderung im jungen Erwachsenenalter [3]. Die jährliche Inzidenz lag im Jahr 2015 in Deutschland bei 18,2 pro 100.000 und die Prävalenz bei 0,32 %, wobei Frauen 2,4 mal häufiger betroffen waren als Männer [2]. Zudem ist über die Jahre ein stetiger Anstieg der Prävalenz zu verzeichnen, dieser ist vorwiegend durch eine längere Lebenszeit von MS-Patienten zu erklären, wobei auch ein Anstieg der Inzidenz insbesondere unter Frauen zu beobachten ist [4].

Während es bisher nicht möglich ist, eine genaue Ursache für die Entstehung der MS zu benennen, gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass sowohl Umweltfaktoren als auch eine genetische Prädisposition zum Erkrankungsrisiko beitragen. Auffallend sind die geographischen Prävalenzunterschiede mit zunehmender Prävalenz in Abhängigkeit von der Entfernung vom Äquator und besonders hoher Prävalenz in Europa, Nordamerika, Australien und Neuseeland [3]. Während genetische Faktoren vermutlich einen Teil der geographischen Häufung erklären, scheinen Unterschiede in der Sonnenlichtexposition und konsekutive Unterschiede der Vitamin-D-Spiegel einen größeren Einfluss auf diesen Zusammenhang zu haben [5]. Neben den Vitamin-D-Spiegeln gehören Rauchen und Übergewicht zu

den am besten untersuchten Risikofaktoren für die Entstehung der MS [5]. Der Einfluss genetischer Faktoren wird durch das familiär gehäufte Auftreten verdeutlicht. So haben Verwandte 1. Grades eines an MS Erkrankten ein Erkrankungsrisiko von 3 % [6], verglichen mit einer Prävalenz von 0,32 % in der Gesamtbevölkerung [2]. Bei monozygoten Zwillingen sind sogar Konkordanzraten von 25 % zu beobachten [6]. Dabei ist von einem komplexen polygenetischen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko auszugehen. In genomweiten Assoziationsstudien konnten über 200 genetische Varianten identifiziert werden, die mit der Entstehung der MS assoziiert sind [7]. Die meisten bisher untersuchten Varianten stehen dabei in einem immunregulatorischen Kontext, wobei sich auch Überschneidungen mit anderen Autoimmunerkrankungen finden lassen [8, 9]. Unter den identifizierten Risikogenen ist die HLA-Variante DRB*1501 hervorzuheben, welche den bisher stärksten Einfluss auf das Erkrankungsrisiko zu haben scheint [7].

Neben diesen Umweltfaktoren scheinen auch Infektionserkrankungen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der MS zu spielen. Vergleichbar mit anderen Autoimmunerkrankungen wird auch in der MS von einem Zusammenhang zwischen der Auftretenswahrscheinlichkeit der Erkrankung und dem Hygienestandard in der Bevölkerung ausgegangen [10]. Dies wäre ein weiterer Aspekt der zu dem zuvor beschriebenen geographischen Verteilungsmuster passen würde. Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus könnte sein, dass das vermehrte Auftreten von Infektionserkrankungen im Kindesalter zu einer reduzierten Aktivität von proinflammatorischen Th1-Zellen sowie einer vermehrten Aktivierung von antiinflammatorischen Th2-Zellen und regulatorischen T-Zellen führt und damit die Immuntoleranz fördert [11].

Unter den Infektionserkrankungen kommt der Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion eine besondere Bedeutung zu. Bei einer Seroprävalenz von über 90 % finden die meisten Infektionen im Kindesalter statt und verlaufen asymptomatisch, während Infektionen im Jugend- und Erwachsenenalter häufiger symptomatisch sind. Insbesondere diese symptomatischen Infektionen zeigen einen deutlichen Zusammenhang mit dem Auftreten der MS [12]. Eine groß angelegte epidemiologische Studie konnte dabei zeigen, dass das MS-Risiko nach einer EBV-Infektion um das 32-fache ansteigt, wobei MS-Fälle in seronegativen Patienten eine Ausnahme darstellen [13]. Die EBV-Infektion geht dabei der klinischen MS-Manifestation

mit einer mittleren Latenz von 7,5 Jahren voraus [13]. Ein Erklärungsansatz könnte eine allgemein dysregulierte Immuntoleranz nach EBV-Infektionen sein. Passend dazu lässt sich auch eine Assoziation zu anderen Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise dem systemischen Lupus Erythematoses beobachten [14]. Allerdings sind EBNA-1-spezifische Antikörper [15] und EBV-reaktive-T-Zellen [16] im Liquor von MS-Patienten ein Hinweis für einen weiterreichenden Einfluss der EBV-Infektion auf die Pathogenese der MS. Ein möglicher Zusammenhang ist eine Kreuzreaktivität von EBV-spezifischen Antikörpern [17, 18] und T-Zellen [19] mit ZNS-Antigenen. In einer neueren Studie konnte dabei in einer Subpopulation von MS-Patienten eine Kreuzreaktivität zwischen EBNA-1-spezifischen Antikörpern und dem glialen Zelladhäsionsmolekül GlialCAM nachgewiesen werden [18]. Des Weiteren zeigen auch CD8⁺ T-Zellen in MS-Patienten eine Reaktivität auf GlialCAM [18] und zudem ein breiteres Spektrum an EBV-spezifischen T-Zell-Rezeptoren [20].

Generell ist jedoch die Frage nach dem verantwortlichen Antigen und dessen Ursprung bisher ungeklärt, wobei zwei verschiedene Hypothesen diskutiert werden. Zum einen wäre eine externe Zufuhr des Antigens über Pathogene denkbar. Mechanismen wie molekulares Mimikry könnten in der Peripherie zur Aktivierung ZNS-reaktiver Lymphozyten führen. Demgegenüber steht ein ZNS-intrinsischer Ursprung. So wäre es auch möglich, dass ein initialer Untergang von Oligodendrozyten zur Freisetzung entsprechender körpereigener Antigene führt, die wiederum die Stimulation ZNS-spezifischer Lymphozyten zur Folge haben könnte. [21]

1.1.2 Klinische Verlaufsformen

Zu Beginn der Erkrankung präsentiert sich die MS typischerweise mit einem schubförmig-remittierenden Verlauf (RRMS) [22], bei dem sich Erkrankungsschübe und Remissionsphasen abwechseln, wobei sich die Symptome häufig wieder vollständig zurückbilden. Über 50 % der Patienten entwickeln in den darauffolgenden zehn Jahren eine sekundär-progrediente Verlaufsform (SPMS) [22]. Diese zeichnet sich durch eine konstant fortschreitende Progression neurologischer Defizite aus. Ein Verlauf mit weiterhin aufgesetzten Schüben ist jedoch ebenfalls möglich [23]. Dabei bestimmen insbesondere die sich während der

progressiven Erkrankungsphase entwickelnden Defizite maßgeblich das andauernde Behinderungsausmaß [24]. Zudem zeigen ca. 15 % der Patienten einen primär-progredienten Krankheitsverlauf (PPMS) ohne vorausgehende Krankheitsschübe [23]. Gemeinsamkeiten pathologischer Befunde und die Tatsache, dass Verwandte Betroffener einer Verlaufsform auch ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für einen anderen Verlauf der MS zeigen [25], sind Hinweise darauf, dass es sich bei diesen Verläufen eher um unterschiedliche Ausprägungen derselben Erkrankung handelt als um eigenständige Entitäten [26]. Eine mögliche Erklärung für den unterschiedlichen klinischen Verlauf wäre das zufällige Ausbleiben von Läsionen in eloquenten Hirnarealen in der PPMS [26]. Diese Theorie wird unter anderem dadurch gestützt, dass Patienten mit PPMS im Mittel ca. zehn Jahre später erkranken und damit der Manifestationszeitpunkt der PPMS zeitlich mit dem Übergang von Patienten mit RRMS zur SPMS übereinstimmt [23]. Auch die Tatsache, dass Patienten mit PPMS ebenfalls fokale Läsionen aufweisen [27] und dass in RRMS-Patienten nicht jede Läsion zu einem klinischen Defizit führt, sind passend zu dieser Theorie.

1.1.3 Pathologie

Aus historischer Sicht ist die MS als Erkrankung der weißen Substanz bekannt, wobei akut und fokal auftretende entzündliche Infiltrate durch die Demyelinisierung der Axone zu den charakteristischen histopathologischen Plaques des ZNS führen. Nach Läsionsmanifestation lassen sich im weiteren zeitlichen Verlauf eine beginnende Remyelinisierung, die Ausbildung von astrozytären Glianarben und neurodegenerative Veränderungen beobachten. Dabei wird zunehmend die Diversität der Pathologie deutlich und es zeigt sich ein breites Spektrum an fokalen wie diffusen Veränderungen in grauer und weißer Substanz (siehe Abbildung 1.1) mit sich wandelnden Charakteristiken im Verlauf der Erkrankung. [28]

Die klassisch aktiven Läsionen sind durch aktivierte Myelin-phagozytierende Makrophagen definiert [29]. Dabei zeigt sich eine komplexe kokardenförmige Organisation der Läsionen mit einem die Läsion umgebenden präphagozytischen Areal. In diesem Randbereich sind die Myelinscheiden noch weitgehend intakt, es zeigt sich allerdings bereits eine diffu-

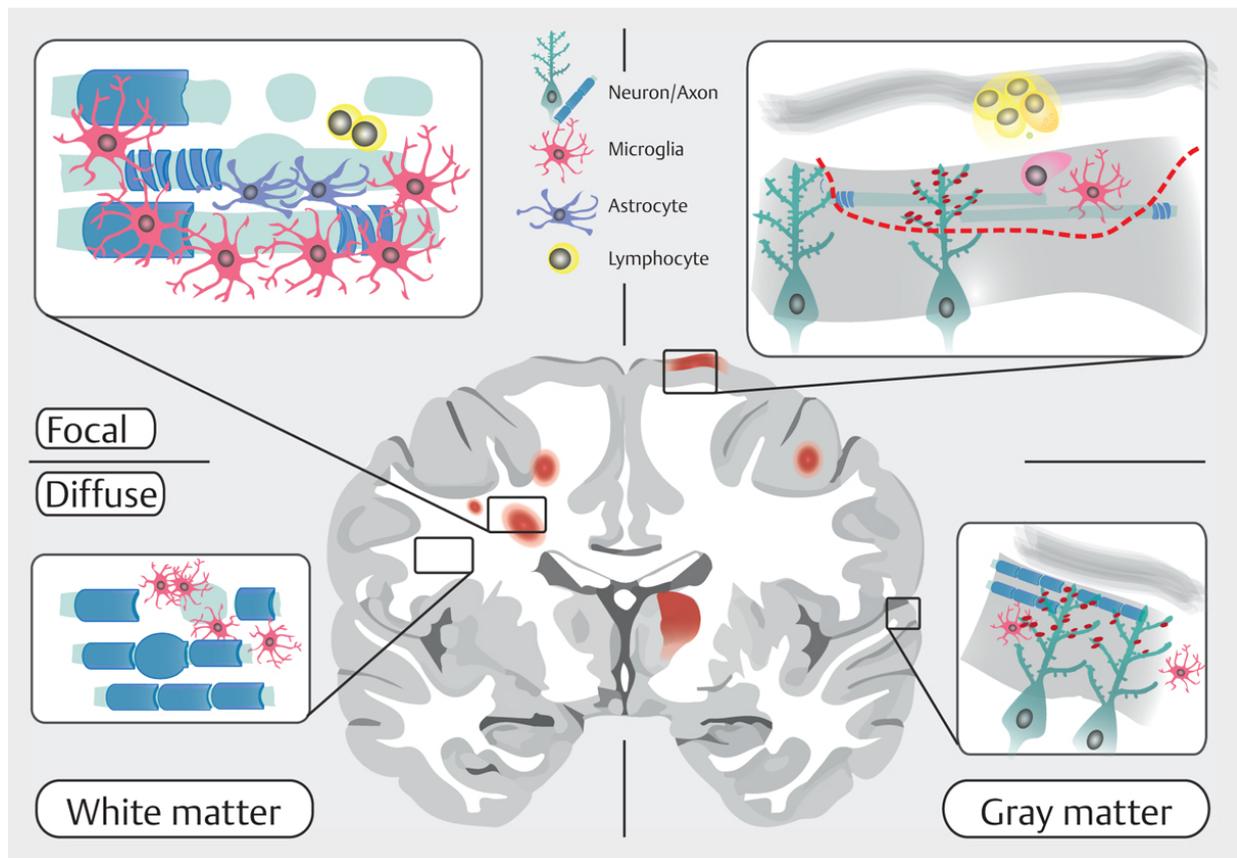


Abbildung 1.1: Fokale und diffuse Pathologie in Patienten mit progredienter MS

Schematische Darstellung der verschiedenen pathologischen Veränderungen in Patienten mit progredienter MS. Die obere Bildhälfte zeigt die fokalen Pathologien mit einer chronisch aktiven Läsion der weißen Substanz (links) und einer demyelinisierenden kortikalen Läsion (rechts). In der unteren Bildhälfte sind die diffusen Pathologien abgebildet mit einer diffusen mikroglialen Aktivierung in weißer (links) und grauer Substanz (rechts) sowie den diffusen axonalen Veränderungen (links) und der reduzierten Synapsendichte (rechts). Der koronare Anschnitt des Gehirns illustriert die Läsionsverteilung. Abbildung übernommen aus Schumacher et al., 2017 [26]. Die Nutzung der Abbildung bedarf einer Lizenzgenehmigung durch den Thieme Verlag.

se Aktivierung von Mikrogliazellen und Infiltration von CD8⁺ T-Zellen [30]. Des Weiteren lassen sich früh-aktive von spät-aktiven Läsionen unterscheiden. Dabei sind in spät-aktiven Läsionen im Zentrum bereits eine Abnahme der Dichte an Makrophagen und erste Zeichen der Remyelinisierung zu beobachten [31]. Diese akuten Formen der Läsionen sind insbesondere in den frühen Stadien der MS zu beobachten und bestimmen den schubförmigen Verlauf der Erkrankung.

Mit zunehmender Erkrankungsdauer werden chronisch-aktive und inaktive Läsionen häufiger [32]. Chronisch-aktive Läsionen zeichnen sich durch ein inaktives Zentrum und einen die Läsion umgebenden Randwall phagozytisch-aktiver Mikroglia aus. Das Zentrum dieser Läsionen zeigt eine ausgeprägte Astroglieose, wobei die Remyelinisierung weitgehend ausbleibt und die Anzahl an Makrophagen und Mikroglia im Zentrum deutlich geringer ist [33]. Diese chronisch-aktiven Läsionen finden sich nahezu ausschließlich in progredienten Erkrankungsstadien und tragen somit vermutlich zur Progression der Symptome bei [32]. Diese Vermutung wird u.a. durch eine longitudinale Magnetresonanztomografie (MRT)-Studie gestützt, welche zusätzliche Evidenz für die Ausbreitung der Läsionen im Randbereich liefern konnte [34].

Des Weiteren werden inaktive Läsionen mit defizienter Remyelinisierung [29] von vollständig remyelinisierten Läsionen, den sogenannten Schattenherden, abgegrenzt [31, 35]. Diese remyelinisierenden Herde sind dabei häufiger in frühen Stadien der Erkrankung anzutreffen [36]. Weshalb das Ausmaß der Remyelinisierung zwischen den verschiedenen Patienten und Läsionen so heterogen ist, bleibt jedoch weiterhin offen und ist vermutlich im Zusammenspiel verschiedener Faktoren begründet. Ein möglicher Erklärungsansatz ist eine generell abnehmende Remyelinisierungskapazität im Alter. Evidenz für diese Theorie kommt aus Tierversuchen, die eine schlechtere Remyelinisierungseffizienz in älteren Tieren zeigten [37, 38]. Als weitere Gründe werden der Verlust von Oligodendrozytenprogenitorzellen [39, 40] und die verminderte entzündliche Aktivität im Zentrum chronischer Läsionen [41, 42] diskutiert.

Neben diesen fokalen Läsionen der weißen Substanz sind demyelinisierende Läsionen auch in der grauen Substanz zu beobachten. Dabei treten die Läsionen nicht nur im Kortex sondern auch in subkortikalen Kerngebieten auf [43]. Insgesamt wurden verschiedene Pa-

thologien wie kortiko-subkortikale, perivaskuläre und subpiale Läsionen beschrieben [44]. Insbesondere die subpialen Läsionen treten vorwiegend in Patienten mit progredientem Verlauf auf und sind für den größten Teil der kortikalen Demyelinisierung verantwortlich [45]. Im Vergleich zu den akuten Läsionen der weißen Substanz enthalten diese subpialen Läsionen deutlich weniger Makrophagen, Mikroglia und T-Zellen [44], allerdings lassen sich Aggregate dicht gepackter Lymphozyten mit hohem Anteil an B-Zellen und Plasmazellen beobachten, welche follikelartige Strukturen ausbilden [46]. Dies legt die Vermutung nahe, dass der schädigende Einfluss auf die graue Substanz durch lösliche Faktoren entweder direkt oder indirekt über die Stimulation von Mikroglia mediiert sein könnte [47]. Passend dazu zeigen sich diese subpialen Infiltrate besonders prominent in tiefen Sulci, in denen die Liquorzirkulation abgeschwächt ist [43]. Im Vergleich zu Läsionen der weißen Substanz zeigen kortikale Läsionen lediglich eine gering ausgeprägte Störung der Bluthirnschranke [48]. Möglicherweise führt die Ausbildung der Lymphfollikel in kortikalen Läsionen zu einer vom peripheren Immunsystem weitgehend unabhängigen Entzündung und ermöglicht so das Bestehen trotz nahezu geschlossener Bluthirnschranke [49]. Dies wäre zudem ein möglicher Erklärungsansatz für die frustrane immunsuppressive Therapie in Patienten mit progredientem Verlauf [50, 28]. Dabei zeigt sich, dass der Pathologie der grauen Substanz eine besondere klinische Bedeutung zukommt. Insbesondere die ebenfalls auftretende kortikale Atrophie [51] sowie die kortikale Demyelinisierung [52] korrelieren mit dem Auftreten kognitiver Defizite, wobei auch die Ausbildung subpialer Lymphfollikel ein prognostisch ungünstiger Faktor zu sein scheint [46].

Über die besprochenen fokalen Pathologien hinaus zeigen sich in Patienten mit progredienter MS auch verschiedene Pathologien der normal erscheinenden weißen und grauen Substanz. Darunter sieht man eine geringfügige diffuse Infiltration durch T-Zellen, perivaskuläre Infiltrate und eine diffuse Aktivierung von Mikroglia, welche zur Ausbildung von Nestern neigen [45]. Diese diffuse mikrogliale Aktivierung lässt sich auch in vivo mittels MRT-Positronen-Emissions-Tomografie (PET) darstellen und spricht für eine generell gesteigerte entzündliche Aktivität im Gehirn von Patienten mit progredienter MS [53]. Kontrovers diskutiert wird, ob diese Nester aktiver Mikroglia den Ursprung neuer Läsionen darstellen [54]. Insbesondere das seltene Auftreten neuer Läsionen im späten Krank-

heitsverlauf [55] und die Tatsache, dass das Ausmaß der diffusen Pathologie nicht mit der Anzahl fokaler Läsionen korreliert [45], sind Argumente dagegen und unterstreichen die pathologischen Besonderheiten der progredienten MS.

Zusätzlich zu der im gesamten Gehirn gesteigerten entzündlichen Aktivität sind auch diffuse neurodegenerative Veränderungen festzustellen. Zum einen lassen sich fokale Schwellungen von Axonen in der normal erscheinenden weißen Substanz beobachten [45]. Diese diffuse axonale Pathologie korreliert dabei nicht mit der Anzahl fokaler Läsionen, weshalb eine fortgeleitete axonale Degeneration als alleinige Ursache unwahrscheinlich ist [45, 26]. Zum anderen ist eine generelle Atrophie der grauen Substanz zu beobachten. Dabei sind neben dem Kortex [51] auch die graue Substanz des Rückenmarks [56] und subkortikale Kerngebiete wie Thalamus und Basalganglien betroffen [57]. Für die kortikale Atrophie konnte nachgewiesen werden, dass sie vor allem auf den Verlust axonaler Verbindungen und kortikaler Neurone zurückzuführen ist [58]. Die Bedeutung der Atrophie der grauen Substanz wird insbesondere in Korrelationsstudien deutlich. Dabei zeigt sich ein klarer Zusammenhang zwischen kognitiver Funktion und kortikaler sowie subkortikaler Atrophie [51, 57], während der Behinderungsgrad der Patienten stärker von der Atrophie der spinalen grauen Substanz abhängig ist [56]. Eine weitere Beobachtung ist die reduzierte Dicke der retinalen Ganglienzellschicht, welche sich auch unabhängig vom Auftreten einer Optikusneuritis zeigt [59]. Der Verlust retinaler Ganglienzellen scheint dabei ein guter Surrogatparameter für die Atrophie der gesamten grauen Substanz zu sein [60] und korreliert sowohl mit dem Ausmaß kognitiver als auch motorischer Defizite [61]. Besonders interessant ist, dass die Dicke der retinalen Ganglienzellschicht als Prädiktor der Krankheitsprogression funktioniert und sich mittels optischer Kohärenztomografie gut in vivo bestimmen lässt [62].

Ein weiterer Aspekt der Neurodegeneration ist der Verlust synaptischer Kontakte. Diese Pathologie ist in verschiedener Ausprägung in der gesamten grauen Substanz zu beobachten. Am stärksten betroffen sind die entzündlich aktiven Bereiche kortikaler Läsionen [63], wobei die Abnahme der Synapsendichte auch subkortikale Kerne [64] und die normal erscheinende graue Substanz betrifft [65, 63]. Pathomechanistisch werden verschiedene Vorgänge diskutiert. Zum einen kann ein mikroglialer Abbau synaptischen Materials beob-

achtet werden [66]. Dabei ist nicht ganz klar, ob die Phagozytose synaptischer Bestandteile der Grund oder die Konsequenz des Synapsenverlusts ist [66, 64]. In experimentellen Modellen lässt sich zudem nachweisen, dass entzündliche Mediatoren wie Interferon- γ [67] und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [68] einen schädigenden Einfluss auf Synapsen haben. Ein weiterer Aspekt ist die fortgeleitete Degeneration der Synapsen nach vorangegangener Axonschädigung. Dabei ist dies sowohl anterograd nach Schädigung afferenter Axone als auch retrograd-transsynaptisch nach Axonotomie der efferenten Axone denkbar [65]. In Zusammenschau ist von einer multifaktoriellen Pathologie auszugehen und eine Kombination aus direkt entzündlichem Effekt sowie einer fortgeleiteten Degeneration nach axonaler Schädigung wahrscheinlich.

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Die Diagnosestellung der MS erfolgt durch den Nachweis der zeitlichen und räumlichen Dissemination von Läsionen des ZNS [69]. Neben der klinischen Präsentation ist dabei die MRT-Bildgebung essenzieller Bestandteil der Diagnostik und ermöglicht die Diagnosestellung zum Teil bereits nach erstmaliger Vorstellung des Patienten. Ergänzend erfolgt eine Analyse des Liquors und die Messung der Latenzzeiten evozierter Potentiale.

Aufgrund der Sensitivität des MRTs und der Tatsache, dass nicht jede Läsion klinisch manifest wird [70], hat sich der MRT-Verlauf als wichtiges Kriterium in klinischen Studien etabliert. Das Auftreten neuer radiologischer Läsionen korreliert dabei mit der Schubrate [71] und ist dementsprechend vor allem geeignet, um den Nutzen von Therapeutika für die Behandlung des schubförmigen Verlaufs zu evaluieren. [72]

Zur Beurteilung der fortschreitenden Neurodegeneration von Patienten mit progredienter MS wird die Atrophie des Gehirns, des Rückenmarks oder einzelner Kompartimente, beispielsweise des Kortex oder subkortikaler Kerngebiete bestimmt [72]. Die im MRT bestimmte Atrophie wird dabei vor allem in klinischen Studien als Indikator für den Krankheitsprogress genutzt, wohingegen diese Parameter aufgrund des großen technischen Aufwands und der hohen Variabilität für die klinische Praxis als Verlaufsparemeter ungeeignet sind [73].

Die langsame Dynamik der Atrophie als Beurteilungsparameter erschwert dabei die Evaluation von Therapien der progredienten MS. Fortschritte in der Bildgebung, wie die Darstellung kortikaler Läsionen mittels 7-Tesla-MRT [74] oder die Entwicklung neuer PET-Tracer, welche beispielsweise die mikrogliale Aktivierung darstellen können [75, 53], könnten in Zukunft dazu dienen, das Ausmaß der Krankheitsprogression von Patienten mit progredienter MS besser zu bestimmen. [73]

Für die Behandlung der MS stehen zahlreiche immunsuppressive und immunmodulatorische Therapien zur Verfügung, die für die Therapie der RRMS zugelassen sind. Diese Therapien reduzieren dabei sowohl die Häufigkeit neuer Läsionen als auch die Schubfrequenz der Patienten [72]. Problematisch ist allerdings die Übertragbarkeit dieser Therapien auf den progredienten Verlauf der Erkrankung, wobei fast alle Therapeutika keine oder keine ausreichende Wirkung zeigten [73]. Daher beschränken sich die verfügbaren Therapieoptionen für die Behandlung von Patienten mit progredienter MS auf einzelne zugelassene Medikamente. Interessant ist der Effekt des B-Zell-depletierenden Antikörpers Ocrelizumab, welcher für die Therapie der PPMS zugelassen ist [76]. Die Wirksamkeit von Ocrelizumab verdeutlicht die Bedeutung der B-Zellen für die Krankheitsprogression und zeigt, dass eine speziell auf die Pathogenese der progredienten MS ausgerichtete immunmodulatorische Therapie von besonderer Bedeutung ist [26].

Vor dem Hintergrund, dass die meisten anderen Immunsuppressiva jedoch nicht auf die progrediente MS übertragbar sind, wächst zunehmend das Interesse an neuroprotektiven und regenerativen Therapieoptionen [73]. Dabei ist auch hier der Weg nicht geradlinig und viele Therapien, von denen man sich zunächst eine Wirkung erhofft hatte, zeigten in klinischen Studien keinen ausreichenden Effekt. Dies gilt sowohl für die Therapien mit Natriumkanalblockern [77] als auch mit Glutamatantagonisten [78, 79, 80], Cannabinoiden [81] und für die Therapie mit Biotin [82].

Zuletzt sind neben den pharmakologischen Therapieoptionen auch physiotherapeutisch-rehabilitative Maßnahmen anzuführen. Eine Steigerung der körperlichen Aktivität und der Fitness von MS-Patienten scheint sich dabei sowohl positiv auf die körperliche als auch kognitive Funktion auszuwirken [83], möglicherweise unter anderem über die Verbesserung der synaptischen Funktion. [73]

1.2 EAE als Modell der Multiplen Sklerose

1.2.1 Einführung des EAE-Modells

Die Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) ist das meistgenutzte Tiermodell der MS und spiegelt als autoimmune Erkrankung des ZNS wichtige pathologische Eigenschaften der MS wieder. Somit trägt die EAE zu einem besseren pathomechanistischen Verständnis bei und ermöglicht die Untersuchung neuer Therapieoptionen [84]. Dabei ist zu beachten, dass zwischen der EAE und der MS große Unterschiede bestehen und die Induktion der EAE ein offensichtlich artifizieller Vorgang ist. Die Unterschiede beider Erkrankungen spiegeln sich auch in der limitierten Aussagekraft präklinischer Daten wider [85]. Dennoch ist die EAE Grundlage großer Teile des pathogenetischen Verständnisses der MS und Ausgangspunkt von Therapeutika wie Glatirameracetat [86] und Natalizumab [87].

Am gängigsten ist die EAE in Mäusen und Ratten, wobei auch andere Modellorganismen existieren und potentielle Vorteile bieten. So haben beispielsweise Primaten als Modellorganismus besondere Vorzüge durch ihre phylogenetische Nähe zum Menschen [88]. Insbesondere die EAE in Mäusen hat in den vergangenen Jahren an Popularität gewonnen. Dies ist vor allem der leichten Handhabung, den vergleichsweise geringen Kosten und der großen Auswahl transgener Mausstämmen zuzuschreiben [89].

Die klassische Form ist die aktive EAE, bei der die Erkrankung durch Injektion von ZNS-Homogenisat oder einzelner enzephalitogener Peptide bzw. Proteine ausgelöst wird, wobei dies in der Regel unter Zuhilfenahme von Freund-Adjuvans [90] und Pertussis-Toxin [91] erfolgt, um eine entsprechend stärkere Immunreaktion hervorzurufen und höhere Inzidenzraten zu erhalten. Anzumerken ist, dass sich die Empfindlichkeit gegen bestimmte Antigene zwischen verschiedenen Mausstämmen unterscheidet. Die verschiedenen Antigene führen zu jeweils unterschiedlichen klinischen Verläufen mit spezifischen pathologischen Eigenschaften der Erkrankung [92]. Häufig genutzt ist die durch Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)₃₅₋₅₅-induzierte EAE in C57BL/6 Mäusen. Diese eignet sich im Besonderen um die T-Zell-medierte Pathogenese der Erkrankung zu untersuchen, wobei die große Verfügbarkeit an transgenen Varianten des C57BL/6 Mausstammes einen entscheidenden

Vorteil darstellt [92]. Anzumerken ist jedoch der akute monophasische Krankheitsverlauf ohne Krankheitsprogression [93, 94], welcher einen substantiellen Unterschied zur MS darstellt. Hinsichtlich des klinischen Verlaufs zeigt beispielsweise die chronisch-schubförmige EAE (CREAE) in Biozzi AB/H Mäusen MS-typischere Charakteristiken [95].

Zu den Kritikpunkten an der aktiven EAE zählen des Weiteren die Verwendung von Adjuvantien, die Zufuhr des Antigens und generell, dass die Erkrankung durch externe Manipulationen induziert werden muss. Weiterentwicklungen der EAE wie die passive EAE und spontane EAE adressieren ebendiese Probleme [92], entweder durch den adoptiven Transfer ZNS-reaktiver T-Zellen [96] oder die Expression transgener T-Zellrezeptoren [97]. Dabei haben alle EAE-Varianten einen besonderen Nutzen für bestimmte Fragestellungen, da kein EAE-Modell in der Lage ist, die gesamte Komplexität der Pathologie und Pathogenese der MS abzubilden.

1.2.2 Chronische EAE-Modelle

Schwierigkeiten ergeben sich insbesondere bei der Suche nach einem Modell, welches die pathologischen Eigenschaften und den klinischen Verlauf der progredienten MS widerspiegelt [94]. Dabei wird häufig auf chronische EAE-Modelle zurückgegriffen, von denen man sich erhofft, die entsprechenden neurodegenerativen aber auch entzündlichen Veränderungen beobachten zu können. Hier sind chronische Verlaufsformen ohne Krankheitsprogression von chronisch-schubförmigen Verläufen und Verläufen mit einer kontinuierlichen Krankheitsprogression zu unterscheiden.

Ein etabliertes Modell ist die CREAE in Biozzi AB/H Mäusen. Die Mauslinie ist einer Population von Schweizer Albinomäusen entsprungen, welche einer Selektion nach der Höhe ihrer Antikörpertiter nach intravenöser (i.v.) Applikation von Schaferythrozyten unterzogen wurde [98]. Die dadurch entstandene Inzuchtlinie mit hohen Antikörpertitern (engl. "Antibody high", AB/H) hat sich in der Folge als besonders anfällig gegen eine Reihe von verschiedenen experimentellen Autoimmunerkrankungen gezeigt, darunter auch die EAE [95]. Die klassische EAE in Biozzi AB/H Mäusen wird durch die Immunisierung mit Rückenmarkhomogenisat induziert und zeigt gute Induktionsraten ohne relevante Mortali-

tät bei einem zuverlässig reproduzierbaren chronisch-schubförmigen Verlauf [99, 100]. Dabei wird dem chronischen Verlauf neben den auftretenden Krankheitsschüben eine mitunter progrediente Symptomatik zugesprochen [101, 102]. Histopathologisch ist die Infiltration des ZNS durch CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen sowie die Proliferation von Mikroglia zu beobachten [99]. Typisch für die EAE ist die T-Zell-medierte Pathologie. Dabei lässt sich sowohl der Krankheitsbeginn als auch die folgenden Krankheitsschübe der CREAE durch die Depletion von CD4⁺ T-Zellen verhindern [103, 101, 104], während die Depletion von CD8⁺ T-Zellen [103] oder B-Zellen [104] nicht in der Lage ist, den Krankheitsverlauf zu beeinflussen.

Die EAE in Biozzi AB/H Mäusen lässt sich mit einer Reihe weiterer Antigene induzieren [95] (siehe Tabelle 1.1). Unter anderem zählt auch MOG zu den relevanten Proteinen in diesem Kontext, wobei nicht alle Epitope gleichermaßen enzephalitogen sind und sich der klinische Verlauf zwischen verschiedenen Epitopen unterscheidet [105]. Die mit dem vollständigen Protein induzierte Erkrankung ist bezüglich der Schwere der Erkrankung vergleichbar mit der durch Rückenmarkhomogenisat induzierten EAE und zeigt ebenfalls einen chronisch-schubförmigen Verlauf [105]. Als Oberflächenprotein bietet MOG Autoantikörpern eine mögliche Angriffsfläche [106], wobei die demyelinisierenden Eigenschaften MOG-spezifischer Antikörper im Tiermodell bereits nachgewiesen werden konnten [107]. Des Weiteren deuten neben dem Vorkommen von Anti-MOG-Antikörpern [107] MOG-spezifische T-Zellen [108] in MS-Patienten auf eine besondere pathologische Relevanz von MOG als Autoantigen hin.

Alternativ lässt sich die MOG-CREAE auch in SJL [105] und NOD Mäusen [109] induzieren, wobei die EAE in SJL Mäusen häufig besonders schwer verläuft und mit einer erhöhten Mortalität einhergeht [105]. Ob eine CREAE auch wirklich besser geeignet ist als eine EAE mit monophasischem Krankheitsverlauf, um die pathologischen Eigenschaften der progredienten MS zu untersuchen, ist allerdings unklar. So stammen erwähnenswertere Erkenntnisse zur Neurodegeneration aus der akuten EAE in C57BL/6 Mäusen [110, 111]. Neben der EAE ist auch das Cuprizone-Modell anzuführen. Hier kommt es zu einer T-Zell-unabhängigen Apoptose von Oligodendrozyten mit konsekutiver Demyelinisierung, axonaler Schädigung und mikroglialer Aktivierung [94]. Es wird davon ausgegangen,

Tabelle 1.1: Enzephalitogene Proteine und Epitope in Biozzi AB/H Mäusen

ZNS-Antigen	Protein, Epitope und (Spezies)	Klinischer Verlauf der EAE	Literaturverweis
MBP	MBP 12-26 (Maus)	Akut, leicht	Amor et al., 1996
MAG	MAG 97-112 (Maus)	Akut, leicht	Morris-Downes et al., 2002
PLP	PLP (Rind)	Chronisch-schubförmig	Amor et al., 1993
	PLP 56-70 (Maus)	Chronisch-schubförmig	Amor et al., 1993
MOG	rek. MOG 1-125 (Ratte)	Chronisch-schubförmig	Amor et al., 1994
	MOG 8-22 (Maus)	Chronisch-schubförmig	Amor et al., 1994
	MOG 35-55 (Maus)	Chronisch, akut	Amor, nicht publiziert
	rek. MOG 1-116 (Maus)	Chronisch-schubförmig	Smith et al., 2005
α B-Crystallin	α B-Crystallin 1-16 (Maus)	Akut, leicht	Thoua et al., 2000
GFAP	rek. GFAP	Akut, schwer	Amor et al., nicht publiziert
CNPase	CNPase (Maus Peptide)	Keine Erkrankung	Morris-Downes et al., 2002
OSP	OSP (Maus Peptide)	Keine Erkrankung	Morris-Downes et al., 2002
HSP25		Keine Erkrankung	Amor et al., nicht publiziert

Übersicht über verschiedene enzephalitogene Antigene und deren entsprechenden klinischen Verlauf in Biozzi AB/H Mäusen. Tabelle adaptiert von Amor et al., 2005 [95].

dass Cuprizone als Kupferchelator zu einer mitochondrialen Dysfunktion der Oligodendrozyten führt und so die beschriebene Pathologie auslöst [112]. Die Hypothese, dass ein initialer Untergang von Oligodendrozyten in einigen Patienten ursächlich für die Bildung neuer Läsionen sein könnte [113], hat zu neuem Interesse an diesem Modell geführt. Durch die Kombination der EAE mit dem Cuprizone-Modell konnte gezeigt werden, dass der durch Cuprizone bedingte Untergang von Oligodendrozyten die Infiltration peripherer Immunzellen begünstigt [114].

Unabhängig vom gewählten Modell ist die Symptomevaluation der chronischen EAE mit gewissen Schwierigkeiten verbunden. Während sich in der akuten Phase der Erkrankung Lähmungserscheinungen vom Schwanz bis zu den Vorderläufen streng aufsteigend ausbilden und so die zuverlässige Erhebung des klassischen EAE-Scores ermöglichen, zeigen Mäuse im weiteren Verlauf der Erkrankung häufig ein Mischbild unvollständiger Paresen des Schwanzes und der Hinterläufe mit einer sich sukzessive ausbildenden Spastik [101, 100]. Dadurch wird die präzise Zuordnung eines Punktwertes aus dem EAE-Score erschwert. Diese Problematik kann mithilfe zusätzlicher Verhaltensanalysen adressiert werden, wobei sich bisher keine einheitliche Methodik etablieren konnte.

1.3 Morphologie und Organisation spinaler Motoneurone

Die Motoneurone des Rückenmarks sind in Lamina IX der grauen Substanz lokalisiert und in Säulen organisiert. Dabei können α - und γ -Motoneurone unterschieden werden. Während α -Motoneurone große multipolare Neurone sind, welche der Ansteuerung extrafusaler Muskulatur dienen, sind γ -Motoneurone kleiner und für die Innervation intrafusaler Muskulatur verantwortlich. Der verwendete Neurotransmitter ist Acetylcholin, weshalb die Motoneurone zur Population der Choline-Acetyltransferase-(ChAT)-positiven Neurone gehören. Neben Motoneuronen zeigen auch den Zentralkanal umgebene Interneurone und vegetative Neurone des Ncl. intermedius im Seitenhorn des Rückenmarks ein ChAT-positives Färbeverhalten. Die Identifikation von Motoneuronen gelingt vor allem durch die unterschiedliche Lokalisation der Neurone. Dabei ist eine Zuordnung sogar bis hin zu den entsprechenden Motoneuronsäulen einzelner Muskelgruppen möglich. Bei der Unterscheidung von α - und γ -Motoneuronen ist neben der Größe der Neurone die ChAT-Immunreaktivität ein wichtiger Anhaltspunkt, wobei α -Motoneurone eine geringere Reaktivität als γ -Motoneurone zeigen. [115]

Die Organisation der Dendriten innerhalb des Rückenmarks ist ausgesprochen komplex. So zeigen einige Neurone Dendritenverläufe, die nicht auf das Neuropil der grauen Substanz beschränkt bleiben, sondern weit in die weiße Substanz reichen. Bestimmte Neuronengruppen zeichnen sich dabei durch eine besonders prominente Ausprägung dieser in der weißen Substanz befindlichen Dendriten aus und weisen jeweils spezifische charakteristische Eigenschaften bezüglich der Ausbreitung, des Verlaufs und der Morphologie der Dendriten auf. Die meisten dieser Neurone sind entweder im Vorderhorn oder im lateralen Bereich der Lamina VII lokalisiert. Zu diesen Neuronen zählen u.a. α -Motoneurone (siehe Abbildung 1.2), deren Dendriten in den ventralen und laterale Funiculus penetrieren. Diese Dendriten zeigen innerhalb der weißen Substanz einen geraden Verlauf mit nur wenigen Aufzweigungen, ohne Dornenfortsätze aber mit gelegentlichen irregulären Varikositäten. Dendriten der weißen Substanz neigen zur Ausbildung organisierter Dendritenbündel, in welchen sich eine besonders hohe Dichte synaptischer Kontakte findet, wobei der funktionelle Hintergrund dieser Anordnung nicht geklärt ist. Eine Hypothese ist, dass das Zusammenlaufen der

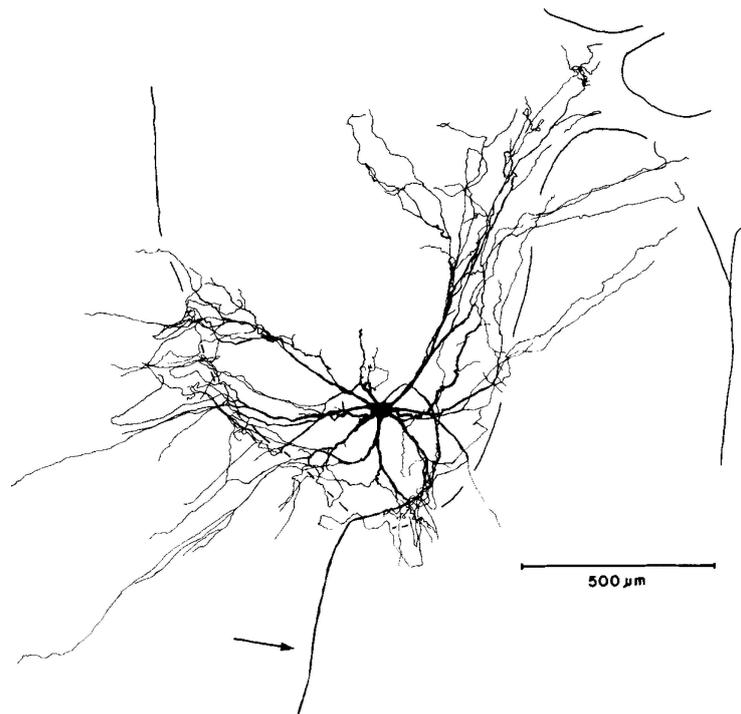


Abbildung 1.2: Darstellung der Neuriten eines einzelnen Motoneurons

Zeichnerische Rekonstruktion eines einzelnen α -Motoneurons der Nackenmuskulatur im Vorderhorn des Rückenmarks einer Katze; intrazelluläre Meerrettichperoxidase (HRP)-Färbung; Rekonstruktion basierend auf lichtmikroskopischen Aufnahmen von 13 konsekutiven 100 μm dicken transversalen Schnitten; die Grenze der grauen Substanz ist schemenhaft skizziert, der Pfeil markiert das Axon. Abbildung übernommen aus Rose und Richmond, 1981 [116].

Dendriten wichtig für die Synchronisation der Aktivität von Motoneurongruppen ist [117]. Generell ist anzumerken, dass über die Funktion von Dendriten in der spinalen weißen Substanz bisher wenig bekannt ist. [116, 118]

1.4 Spinale Pathologie in MS und EAE

Spinale Veränderungen sind in bis zu 83 % der MS-Patienten radiologisch nachweisbar [119], wobei das reine spinale Läsionsausmaß nur mangelhaft mit klinischen Defiziten korreliert. Parameter wie die Querschnittfläche [120] oder das Volumen des Rückenmarks [121] haben sich als bessere prognostische Parameter bezüglich der Krankheitsprogression und des Behinderungsausmaßes erwiesen. Wie zuvor bereits erwähnt, ist die Atrophie der grauen Substanz des Rückenmarks in Patienten mit progredienter MS besonders ausgeprägt [56, 122]. Zudem konnten einige Studien ein gehäuftes Auftreten von Läsionen im zentralen Rückenmark von SPMS-Patienten nachweisen [123, 124]. In Zusammenschau mit den Daten zur kortikalen Pathologie von MS-Patienten sind diese Ergebnisse ein weiterer Hinweis darauf, dass die Beteiligung der grauen Substanz einen entscheidenden Faktor in der Progression der Erkrankung darstellt. Bedingt wird die Atrophie der grauen Substanz durch den Untergang von Axonen [44] sowie den Verlust von Synapsen und Neuronen [125].

Im Vergleich zur MS zeigen die meisten EAE-Modelle eine vorwiegend auf das Rückenmark beschränkte Läsionsverteilung (siehe Abbildung 1.3) [126]. Histologisch zeigt sich dabei eine perivaskulär und subpial beginnende Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen [99] sowie Aktivierung von Mikroglia [127]. In der Folge kommt es zu einer axonalen Schädigung [93], Demyelinisierung [93] und dem Untergang von Neuronen [128]. Die entzündlich bedingte Schädigung von Neuronen kann dabei sowohl durch die Demyelinisierung als auch die axonale Schädigung und den Verlust bzw. die Dysfunktion von Synapsen erklärt werden [129]. Dabei steht insbesondere die Pathologie der Synapsen im Fokus aktueller Forschung, da eine potentiell reversible Synaptopathie einen Ansatzpunkt für neue Therapeutika der progredienten MS darstellen könnte [129]. Im EAE-Modell lässt sich ein Synapsenverlust in verschiedenen Regionen des ZNS nachweisen, wie dem Striatum [110] und dem Hippocampus [130], wobei wenig Daten zur Synapsenpathologie auf spinaler

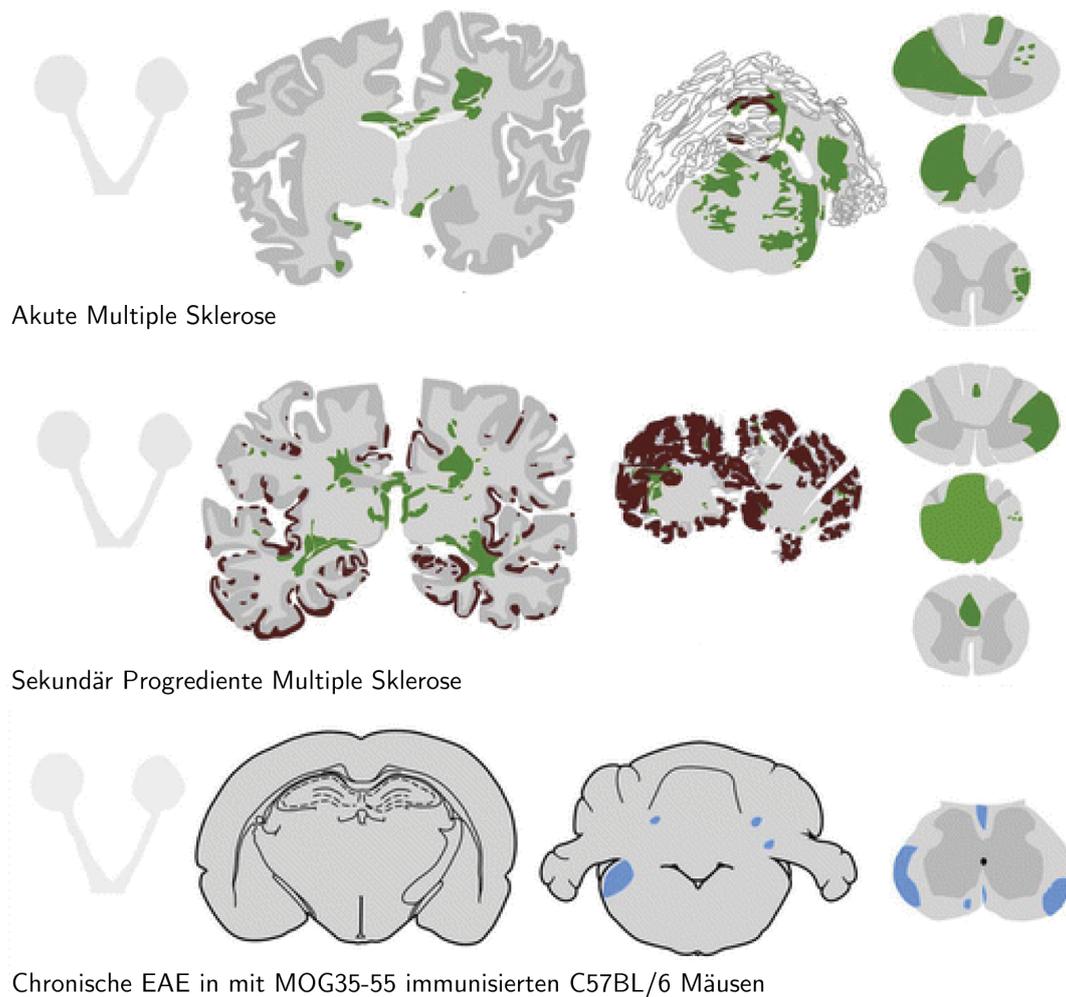


Abbildung 1.3: Verteilung demyelinisierender Läsionen in der MS und EAE

Darstellung der Läsionsverteilung demyelinisierender Läsionen in der MS und EAE anhand von Camera Lucida Zeichnungen projiziert auf Schemazeichnungen des Nervus opticus, Gehirns und Rückenmarks. Farblich sind unterschiedliche Läsionsformen dargestellt; Grün: primär demyelinisierende Läsionen, Blau: sekundär demyelinisierende Läsionen, Braun: kortikale Demyelinisierung. Abbildung adaptiert von Lassmann et al., 2017 [126].

Ebene vorliegen. Alternativ kann auch die Schädigung von Dendriten ursächlich für eine gestörte synaptische Transmission sein, wie sie in der EAE beispielsweise im Hippocampus von Mäusen [130] und dem somatosensorischen Kortex von Ratten [131] beschrieben wurde. Bisher ist die Pathologie von Dendriten jedoch sowohl in der MS als auch der EAE wenig untersucht.

Da die meisten EAE-Modelle ausschließlich Läsionen in der weißen Substanz aufweisen, ergeben sich weitreichende Limitationen für die Evaluation der Pathologie der grauen Substanz. Variationen der EAE wie der Transfer von β -Synuclein-reaktiven T-Zellen in Ratten [132] oder die zusätzliche kortikale Injektion von Zytokinen in zuvor immunisierte Mäuse [133] umgehen diese Problematik und ermöglichen es, die Pathologie kortikaler Läsionen im EAE-Modell zu untersuchen. Eine Möglichkeit, neurodegenerative Veränderungen in spinalen Läsionen der klassischen aktiven EAE zu untersuchen, ergibt sich aus der Morphologie spinaler Motoneurone. Wie zuvor beschrieben, zeigen Motoneurone ausgedehnte Dendritenbäume, die zum Teil weit in die weiße Substanz reichen. Diese anatomische Besonderheit haben wir uns in dieser Studie für die Evaluation der Dendriten- und Synapsenpathologie innerhalb von Läsionen der spinalen weißen Substanz zu Nutze gemacht.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Die MS als chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS ist einer der häufigsten Gründe für Behinderung im jungen Erwachsenenalter. Dabei akkumulieren persistierende neurologische Defizite vorwiegend im progredienten Verlauf der Erkrankung. Zeitgleich ist ebendiese Krankheitsphase den aktuellen immunsuppressiven Therapien am wenigsten zugänglich. Die Entwicklung effektiver Therapieoptionen für die Behandlung der progredienten MS erfordert deshalb dringend ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen. Erste Studien zeigen, dass insbesondere neurodegenerative Veränderungen, wie der Verlust von Synapsen, eine zentrale Rolle in der Progression der Erkrankung einzunehmen scheinen. In welchem Ausmaß chronische EAE-Modelle diese Pathologien abbilden, ist bisher unklar.

In dieser Arbeit soll zunächst die chronische MOG-EAE in Biozzi AB/H Mäusen bezüglich des klinischen Verlaufs reevaluiert werden und die Symptomatik durch Zuhilfenahme weiterer Verhaltenstests umfassender beschrieben werden. Des Weiteren sollen diese Verhaltenstests bezüglich ihres zusätzlichen Nutzens in der Evaluierung chronischer EAE-Symptomatik getestet werden.

In einem nächsten Schritt soll mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler Mikroskopie untersucht werden, ob die Dendriten der weißen Substanz von den neurodegenerativen Veränderungen im Rückenmark betroffen sind. Hierzu soll die Länge der Dendriten und die Dichte der Synapsen quantifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Immunhistochemie

Hitze-inaktiviertes Pferdeserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Normales Ziegenserum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
ChAT-Antikörper von der Ziege	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Synapsin-1-Antikörper vom Kaninchen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MAP-2-Antikörper vom Huhn	Abcam plc., Cambridge, Großbritannien
Sekundärer Antikörper vom Esel gegen Kaninchen-Immunglobuline, Alexa Fluor 488 gekoppelt	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Sekundärer Antikörper vom Esel gegen Huhn-Immunglobuline, Cyanin-3 gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridge, Großbritannien
Sekundärer Antikörper vom Esel gegen Meerschweinchen-Immunglobuline, CF 633 gekoppelt	Biotium Inc., Fremont, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Sekundärer Antikörper vom Esel gegen Ziegen-Immunglobuline, Alexa Fluor 680 gekoppelt	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sakura Finetek Tissue-Tek O.C.T.	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Vectashield farbstoffstabilisierendes Fixiermittel	Vector Laboratories Ltd., Peterborough, Großbritannien

Immunisierung

Rekombinantes MOG 1-125 (Ratte)	Hergestellt in Escherichia coli im eigenen Labor
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Unvollständiges Freund-Adjuvans	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Mycobacterium tuberculosis H37Ra	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pertussistoxin aus Bordetella pertussis	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Bremer Pharma GmbH, Warburg, Deutschland
Xylazin	Riemser Arzneimittel AG, Greifswald, Deutschland

Sonstige

Standard Phosphatpufferlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isofluran	Abbott AG, Baar, Schweiz
Heparin-Natrium	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Materialien

Falcon konische Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Eppendorf-Röhrchen 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einmalspritzen 1 und 10 ml	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Kanülen verschiedene Größen (Sterican)	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Butterfly-Nadel 21G (Venofix A)	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
48-Loch-Titerplatten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger und Deckgläser für die Mikroskopie	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland

3.1.3 Geräte

Mikroskope

Leica SP8X WLL Konfokalmikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica SP8 Konfokalmikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Olympus invertiertes Weitfeldmikroskop	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Olympus KL 1500 LCD	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland

Sonstige

Ugo Basile RotaRod	Ugo Basile SRL, Gemonio, Italien
Ismatec IPC Mehrkanal-Schlauchpumpe	Richmond Scientific Ltd., Chorley, Großbritannien
Dissektionsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Mixer (neoLab)	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mini Rocker-Shaker MR-1	Biosan, Riga, Latvia
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Kryostat Leica CM1950	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland

3.1.4 Software

Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
Adobe Photoshop	Adobe Inc., San José, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Adobe Illustrator	Adobe Inc., San José, Kalifornien, Vereinigte Staaten
ImageJ	Frei zugängliche Software
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, Vereinigte Staaten
LaTeX	Frei zugängliche Software

3.1.5 Versuchstiere

Für alle Experimente wurden Biozzi AB/H Mäuse verwendet. Die Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte entweder im Tierhaus des LMU Klinikums oder in der Core Facility Animal Models des Biomedizinischen Centrums der LMU München. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal fünf Tieren bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h gehalten und erhielten Futter wie Wasser ad libitum. Die Käfige enthielten Einstreu, Nestmaterial, Kartonröhren und rote einsehbare Plastikhäuser. Käfigeigene Lüftungssysteme sorgten dabei für eine konstante Temperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 10 %. Die Versuchstiere wurden gemäß der gesetzlichen Vorgaben gehalten und alle Versuche erfolgten im Rahmen eines von der Regierung Oberbayerns genehmigten Tierversuchsantrags. Die Tierversuche erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, in Zusammenarbeit mit Martin Kerschensteiner, Christoph Mahler und Saskia List.

3.2 Methoden

3.2.1 Induktion der EAE

Die Induktion der EAE erfolgte anhand eines bereits etablierten Protokolls [134]. Dazu wurden adulte Biozzi AB/H Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Pro Tier wurde aus einer Lösung von 50-300 µg MOG₁₋₁₂₅ in Natriumacetat (pH 3) mit einem Gesamtvolumen von 125 µl und 125 µl vollständigem Freund-Adjuvans eine Emulsion hergestellt. Das vollständige Freund-Adjuvans enthielt 4-10 mg/ml abgetötetes Mycobacterium tuberculosis. Zur Immunisierung wurden jeweils 100 µl pro Flanke und 50 µl an der Schwanzbasis intrakutan appliziert. Jedes Tier erhielt zwei Immunisierungen, die erste an Tag 0, die zweite an Tag 7. Jeweils am Tag der Immunisierung sowie am Folgetag wurden zusätzlich 200-500 ng Pertussistoxin gelöst in 100 µl sterilem PBS intraperitoneal injiziert. Die Immunisierungen erfolgten unter Anästhesie mit Ketamin und Xylazin.

3.2.2 Verhaltensanalysen

EAE-Symptomatik

Ab dem Zeitpunkt der Immunisierung wurden die Tiere täglich gewogen und klinisch untersucht. Die neurologische Evaluation erfolgte dabei anhand einer etablierten EAE-Symptom-Skala. Dieses Scoring-System bildet die EAE-assoziierte Symptomatik auf einer Skala von 0 bis 5 ab. Die Beurteilungskriterien sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen. Neben der neurologischen Symptomatik wurden die Mäuse auf Verhaltensveränderungen sowie auf Zeichen einer vorliegenden Inkontinenz untersucht.

Tabelle 3.1: Beurteilungssystem der EAE-Symptomatik

0	Keine neurologischen Symptome
0,5	Geminderter Tonus der Schwanzmuskulatur
1	Lähmung des Schwanzes
1,5	Ganginstabilität oder verlangsamtes Umdrehen aus Rückenlage
2	Schwäche der Hinterläufe
2,5	Schwäche der Hinterläufe mit partiellem Nachziehen
3	Vollständige Lähmung der Hinterläufe
3,5	Schwäche der Vorderläufe
4	Vollständige Lähmung der Vorderläufe
5	Tod

Ataxie-Score

Zur Beurteilung ataktischer Symptome wurde ein klinisches Beurteilungssystem verwendet, welches initial für ein Mausmodell der spinozerebellären Ataxie entwickelt wurde [135]. In diesem Score wird die Balance auf der Käfigkante, der Klammerreflex der Hinterbeine, das Gangbild und das Vorliegen einer Kyphose beurteilt. Für jede Kategorie werden abhängig von der Symptomausprägung 0 bis 3 Punkte vergeben und die Summe berechnet. Der maximal erreichbare Summenwert liegt dementsprechend bei 12 Punkten. Die genauen Beurteilungskriterien sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Beurteilungssystem der Ataxie

Kategorie	Punktwert	Beschreibung
Balance auf der Käfigkante	0	Die Maus behält die Balance beim Gang auf der Käfigkante und geht koordiniert in den Käfig zurück.
	1	Die Maus verliert zeitweise den Halt auf der Käfigkante, wirkt aber koordiniert.
	2	Die Maus benutzt die Hinterbeine nicht, das Zurückgehen in den Käfig ist unkoordiniert.
	3	Die Maus fällt von der Käfigkante oder wackelt und verweigert den Gang auf der Käfigkante.
Klammerreflex der Hinterbeine	0	Die Hinterbeine der am Schwanz hochgehobenen Maus sind durchgehend über die Beobachtungszeit von 10 s vom Abdomen weggestreckt.
	1	Ein Hinterbein zeigt über mindestens 50 % der Zeit eine klammernde Haltung.
	2	Beide Hinterbeine zeigen über mindestens 50 % der Zeit zeitweise eine klammernde Haltung.
	3	Die Hinterbeine zeigen über mindestens 50 % der Zeit durchgehend eine klammernde Haltung und liegen dabei am Abdomen an.
Gangbild	0	Das Gewicht wird von allen vier Extremitäten gleichermaßen getragen, das Abdomen berührt den Boden nicht und beide Hinterbeine sind gleichermaßen an der Bewegung beteiligt.
	1	Die Maus zeigt ein leicht humpelndes Gangbild oder einen leichten Tremor.
	2	Die Maus zeigt ein ausgeprägt humpelndes Gangbild, ein gesenktes Becken, eine außenrotierte Fußstellung während dem Laufen oder einen ausgeprägten Tremor.
	3	Die Maus hat Schwierigkeiten sich vorwärts zu bewegen und das Abdomen berührt den Boden.
Kyphotische Haltung	0	Während dem Laufen streckt sich die Wirbelsäule ohne Probleme, die Maus zeigt keine persistente Kyphose.
	1	Die Maus zeigt eine milde Kyphose, ist aber in der Lage die Wirbelsäule aktiv zu strecken.
	2	Während dem Laufen streckt sich die Wirbelsäule nicht mehr vollständig, die Maus zeigt eine persistente aber milde Kyphose.
	3	Die Maus zeigt sowohl im Laufen als auch im Sitzen eine ausgeprägt kyphotische Haltung.

RotaRod-Performance-Test

Die motorische Koordinationsfähigkeit, Leistungsfähigkeit und Erschöpfbarkeit wurde mittels des RotaRod-Performance-Test beurteilt. Die RotaRod-Aktivität wurde dabei als Laufzeitsumme über 8 Runden à 120 s bei einer konstanten Geschwindigkeit von 40 Umdrehungen/min ermittelt. Die Runden schlossen sich dabei mit 10 s Pause aneinander an. Gesunde Kontrollmäuse waren dabei in der Lage, alle 8 Runden vollständig zu absolvieren und hatten damit eine Gesamtlaufzeit von 960 s und 70 s Pausenzeit. Fiel eine Maus vorzeitig herunter, begann sie erst wieder zur nächsten Runde. Ihre Laufzeit verkürzte sich somit und ihre Pausenzeit verlängerte sich. Vor dem Testlauf wurden die Mäuse bei reduzierter Geschwindigkeit an das Gerät gewöhnt. Mäuse mit ausgeprägten Paresen wurden vom RotaRod-Performance-Test ausgeschlossen.

3.2.3 Histologie

Aufbereitung des Gewebes

Die Euthanasie der Mäuse erfolgte durch eine überdosierte Isofluran-Narkose. Zur Perfusion und Fixierung des Gewebes wurde zügig im Anschluss nach dem sicheren Eintreten des Todes das Herz über eine horizontale Thorakotomie auf Höhe des Zwerchfells freigelegt. Ein Gefäßzugang zum Spülen wurde mit einer 21 G Butterfly-Nadel über den linken Ventrikel geschaffen. Der Abfluss erfolgte über eine Inzision am rechten Herzohr. Zunächst wurde das Gewebe mit einer Heparin-PBS-Lösung (20 I.U. Heparin/ml PBS) perfundiert, um das Gefäßsystem möglichst von Blut zu befreien. Als Indikator für eine ausreichende Perfusion wurde das vollständige Abblassen des Lebergewebes abgewartet. Anschließend wurde zur Fixierung das Gewebe mit 15 ml PFA (4 %) perfundiert. Die erfolgreiche Fixation des Gewebes zeigte sich durch eine deutliche Zunahme der Steifigkeit. Die Flussrate betrug jeweils 4,4 ml/min. Anschließend wurden die Wirbelsäule und der Schädel vom restlichen Gewebe befreit und zur weiteren Fixation in PFA (4 %) bei 4 °C gelagert. Die Dauer der Lagerung in PFA betrug abhängig von den geplanten Färbungen zwischen 3 und 12 h. Die Präparation von Gehirn und Rückenmark geschah nach abgeschlossener Fixation mikroskopisch assistiert.

Anfertigung der Gefrierschnitte

Vor der Anfertigung der Gefrierschnitte wurde das Gewebe zum Schutz vor Gefrierbrüchen in einer hochkonzentrierten Saccharoselösung (30 %) gelagert, bis das Gewebe nicht mehr obenauf schwamm. Anschließend wurde das Gewebe in Tissue-Tek eingebettet, auf einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch gefroren und bei -20 °C gelagert. Die Schnittdicke der Gefrierschnitte betrug 30 µm. Bei Bedarf wurden die Schnitte in einer Lösung aus 25 % PEG, 25 % Glycerol und 50 % PBS bei -20 °C gelagert und mit zeitlichem Abstand gefärbt.

Immunfluoreszenz-Färbungen

Um unspezifisches Binden der sekundären Antikörper zu verhindern, wurden die Schnitte mit einer Lösung aus 5–20 % Pferdeserum und bis zu 0,3 % Triton X-100 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte in einer Lösung aus 0,1–0,3 % Triton X-100 und bis zu 10 % Pferdeserum für 36–48 h bei 4 °C. Die hierfür verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern erfolgte in einer Lösung aus 0,1–0,3 % Triton X-100 und 2,5–10 % Pferdeserum für 4 h bei Raumtemperatur. Die hierfür verwendeten Antikörper sind ebenfalls in Tabelle 3.3 aufgeführt. Um unspezifisches Signal zu reduzieren, wurden ausreichend Waschschrte mit PBS durchgeführt und die Antikörperlösungen vor Gebrauch für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Tabelle 3.3: Liste verwendeter Färbungen/Antikörper

Färbung/Antigen	Spezies	Verdünnung	Konjugat
DAPI	–	1:10000	–
ChAT	Ziege	1:500	–
Synapsin-1	Kaninchen	1:500	–
MAP-2	Huhn	1:1000	–
Ziegen-IgG	Esel	1:400	Alexa Fluor 488
Kaninchen-IgG	Esel	1:500	Alexa Fluor 488
Hühner-IgG	Esel	1:500	Cyanin-3
Kaninchen-IgG	Esel	1:400	Alexa Fluor 594

4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI); Choline-Acetyltransferase (ChAT); Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP-2); Immunglobulin G (IgG).

3.2.4 Mikroskopie

Für die Mikroskopie wurden Leica SP8 Konfokalmikroskope verwendet. Ein Teil der Aufnahmen wurde dabei in der Core Facility Bioimaging im Biomedizinischen Centrum der LMU durchgeführt. Die genauen Aufnahmeeinstellungen sind dabei der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Tabelle 3.4: Aufnahmeeinstellungen der konfokalen Mikroskopie

Experiment	Objektiv	Pixelgröße	Färbung	Laser (λ)	Detektor (λ)
Dendritenlänge	40x/1,3 Öl	0,135 μm	DAPI	405 nm, UVL	425-470 nm, HyD
			Cy3 (MAP-2)	553 nm, WLL	580-610 nm, HyD
			Polarisations- filter	WLL	PMT
Motoneuronendichte	20x/0,75	0,567 μm	AF488 (ChAT)	488 nm, AL	500-560 nm, HyD
Synapsendichte (Dendriten)	63x/1,4 Öl	0,078 μm	AF488 (Synapsin-1)	488 nm, WLL	500-535 nm, HyD
			Cy3 (MAP-2)	553 nm, WLL	580-610 nm, HyD
			Polarisations- filter	WLL	PMT
Synapsendichte (Somata)	63x/1,4 Öl	0,09 μm	AF488 (ChAT)	488 nm, AL	500-560 nm, HyD
			AF594 (Synapsin-1)	561 nm, DPSSL	580-640 nm, PMT

Cyanin-3 (Cy3); Alexa Fluor (AF); Ultraviolett-Laser (UVL); Weißlicht-Laser (WLL); Argon-Laser (AL); Dioden-gepumpter Festkörperlaser (DPSSL); Hybridphotodetektor (HyD); Photomultiplier-Röhre (PMT).

3.2.5 Datenanalyse

Die Auswertung von Bilddateien erfolgte in der frei zugänglichen Analysesoftware ImageJ. Die Aufnahmen wurden jeweils für Helligkeit und Kontrast korrigiert, um vergleichbare Tonwerte zu erhalten. Die Bildverarbeitung zu Darstellungszwecken erfolgte mittels Adobe Photoshop und Adobe Illustrator. Die graphische Darstellung der Daten und statistische Testung erfolgte mittels GraphPad Prism 9.

Analyse der Dendritenlänge

Die Auswertung der Dendritenlänge erfolgte an Projektionsbildern konfokaler Aufnahmen (5 Schnittbilder mit einem Abstand von jeweils 1,25 μm). Hierzu wurde die Summe der Länge aller Dendritenabschnitte der weißen Substanz einer Region in Bezug zu der zirkumferenziellen Länge der grauen Substanz gesetzt. Als Dendriten wurden dabei gut abgrenzbare MAP-2-positive Strukturen jeglicher Länge gewertet. Durch diese Auswertungsmethode sind auch kurze Dendritenfragmente mit gewertet, welche sich vermehrt in Läsionen fanden. Die Läsionsgrenze sowie die Grenze zwischen grauer und weißer Substanz wurden mittels Polarisationskontrastaufnahmen bestimmt. Beim Ausmessen der Zirkumferenz der grauen Substanz wurden Neuropilaufläufer nicht mitgemessen, wodurch falsch niedrige relative Messwerte vermieden wurden. Um für die ungleichmäßige Verteilung der Dendriten in der weißen Substanz zu kontrollieren, wurden die Kontrollen in gleicher Höhe und Region ausgewählt. Die Ermittlung der Höhe erfolgte vergleichend mithilfe eines Bildatlas [115]. Neben gesunden Kontrolltieren wurde auch jeweils die gegenüberliegende Seite als interne Kontrolle ausgewertet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die kontralaterale Seite ein geringeres Läsionsausmaß aufwies. Pro Region wurde ein Mindestabschnitt von 50 μm der Zirkumferenz auf drei Schnitten analysiert. In die Auswertung wurden nur Läsionen mit einem maximalen Abstand von 50 μm zur grauen Substanz eingeschlossen.

Analyse der Motoneuronendichte

Die Analyse der Motoneuronendichte erfolgte an konfokalmikroskopischen Übersichtsaufnahmen des gesamten Rückenmarkquerschnitts. Dazu wurde die Anzahl ChAT-positiver Neurone pro Vorderhorn manuell ausgezählt. Genutzt wurden Anschnitte des lumbosakralen Übergangs (L4-S3), bestimmt anhand des oben bereits erwähnten Bildatlas [115].

Analyse der Synapsendichte

Die Synapsendichte wurde an Motoneuronensomata und Dendriten der weißen Substanz anhand konfokaler Aufnahmen ausgewertet. Die Auszählung der Synapsen erfolgte dabei manuell. Als Synapsen wurden gut abgrenzbare Synapsin-1-positive Strukturen gewertet,

welche entweder mit den Somagrenzen oder den Dendriten kolokalisierten.

Die Motoneurone wurden anhand des ChAT-positiven Signals, einer entsprechenden Größe und ihrer Lokalisation identifiziert. Um eine einheitlichere Population zu erhalten, wurden Neurone lumbaler Vorderhörner der Höhe L4-L6 möglichst aus Säulen der glutealen oder ischiokruralen Muskulatur ausgewählt. Dies erfolgte ebenfalls vergleichend mithilfe des Bildatlas [115]. Die Auswertung der Synapsendichte erfolgte in einzelnen Schnittbildern der Neurone und ausschließlich in Anschnitten auf Höhe des Nukleus sowie an scharf abgrenzbaren Somagrenzen. Pro Tier wurden zehn Neurone ausgewertet.

Die Dendriten der weißen Substanz wurden anhand des MAP-2-Signals ausgewählt. Dabei wurden für die Analyse der Synapsendichte nur Dendritenanschnitte mit einer Mindestlänge von 5 μm ausgewertet. Die Läsionsgrenze sowie die Grenze zwischen grauer und weißer Substanz wurden mittels der Polarisationskontrastaufnahme bestimmt. Um für die ungleichmäßige Verteilung der Dendriten in der weißen Substanz zu kontrollieren, wurden die Kontrollen entsprechen der Höhe und Region passend ausgewählt. Neben gesunden Kontrolltieren wurde auch hier jeweils die gegenüberliegende Seite als interne Kontrolle ausgewertet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die kontralaterale Region außerhalb von Läsionen lag. Pro Aufnahme wurden mindestens 30 Dendritenanschnitte (Auswahl aus elf konsekutiven Schnittbildern mit einem Abstand von jeweils 1 μm) und pro Region drei Schnitte ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Chronische MOG-induzierte EAE in Biozzi AB/H Mäusen

Um ein besseres Verständnis des chronischen Verlaufs MOG-induzierter EAE in Biozzi AB/H Mäusen zu bekommen, führten wir mithilfe von Verhaltenstests und histologischen Analysen eine Basischarakterisierung des Modells durch. Die Immunisierung und klinische Evaluation der Versuchstiere sowie die Prozessierung der Gewebe aller folgenden Experiment erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, in Zusammenarbeit mit Martin Kerschensteiner, Christoph Mahler und Saskia List.

4.1.1 Verhaltensanalysen

Der klinische Verlauf gestaltete sich in mit MOG₁₋₁₂₅ immunisierten Biozzi AB/H Mäusen heterogen und zeigte entweder eine chronisch-persistierende Symptomatik, einen schubförmigen Verlauf oder eine langfristige Remission (siehe Abbildung 4.1). Gemein war allen Mäusen ein uniformer Krankheitsbeginn mit mittlerem Symptombeginn an Tag 17 und mittlerem Erkrankungsmaximum an Tag 19 nach EAE-Induktion sowie eine nachfolgende Remission. Der weitere Verlauf zeigte hingegen interindividuelle Unterschiede.

Für die folgenden Untersuchungen haben wir anhand des klinischen Verlaufs folgende Analysezeitpunkte definiert: Akute Erkrankung (2-3 Tage nach Symptombeginn), Remission (Reduktion des EAE-Scores um mindestens einen Punkt für mindestens 2 Tage), zweiter Krankheitsschub (Zunahme des EAE-Scores nach vorangegangener Remission um mindestens einen Punkt für mindestens 2 Tage), chronische Erkrankung (persistierender

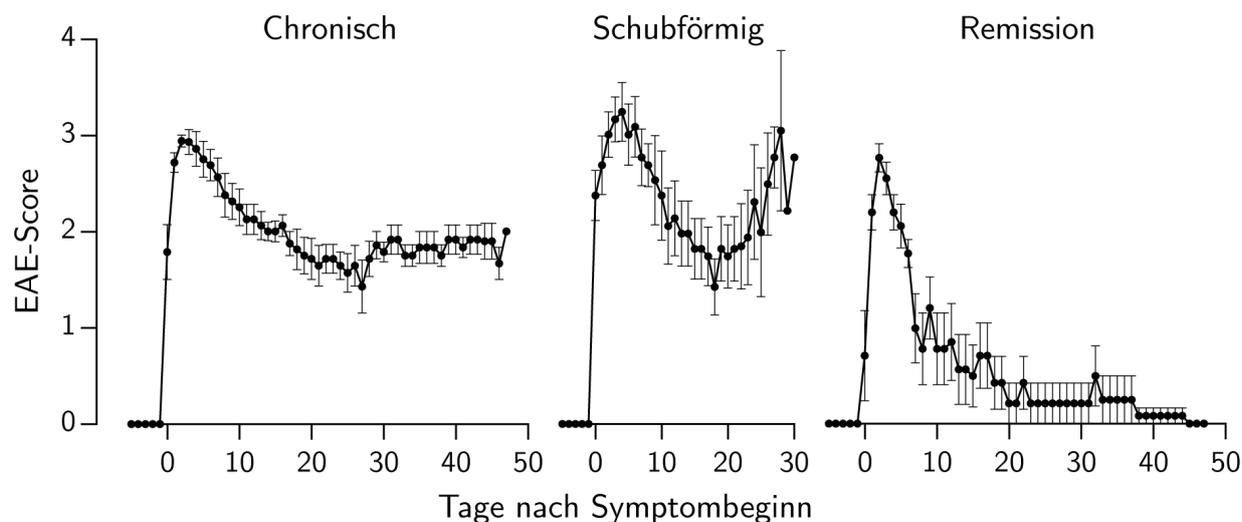


Abbildung 4.1: Klinischer Verlauf der MOG-induzierten EAE in Biozzi AB/H Mäusen
Verlauf von täglich erhobenem EAE-Score \pm SEM ab Symptombeginn in Biozzi AB/H Mäusen mit chronischem Verlauf ($n = 8$), schubförmigem Verlauf ($n = 7$) und Remission ($n = 7$); Zusammenarbeit mit Saskia List.

EAE-Score 60 Tage nach EAE-Induktion) und langfristige Remission (60 Tage nach EAE-Induktion EAE-Score von 0).

Basierend auf der Beobachtung, dass die neurologische Symptomatik im späteren Verlauf der EAE nur noch unzureichend durch den EAE-Score abgebildet wird und Mäuse zunehmend spastische und ataktische Symptome präsentieren, wurde in Zusammenarbeit mit Saskia List sowohl ein RotaRod-Performance-Test durchgeführt als auch ein Ataxie-Score [135] erhoben, um diese Defizite besser darstellen zu können (siehe Abbildung 4.2).

Der RotaRod-Performance-Test als Testverfahren der motorischen Koordinationsfähigkeit von Mäusen ist bereits seit Jahrzehnten etabliert [136, 137] und auch sein Nutzen für die Evaluation der EAE-Symptomatik ist mehrfach beschrieben [138, 100, 139]. Um zu prüfen, ob neben den Defiziten der motorischen Koordinationsfähigkeit im späten Verlauf der Erkrankung auch eine schnellere Erschöpfbarkeit eintritt, haben wir die Laufzeiten von 8 Testrunden normalisiert zur mittleren Laufzeit aller Runden dargestellt (siehe Abbildung 4.2 A). Diese Darstellungsweise adressiert die interindividuellen Performanceunterschiede sowie die Problematik, dass einige Tiere in Runde 1 vermutlich aufgrund unzureichender Gewöhnung schlechter abschnitten. Es zeigte sich ab Runde 4 eine kontinuierliche Abnahme der relativen Laufzeiten auf ein mittleres Minimum von $0,69 \pm 0,11$ in Runde 8. Dement-

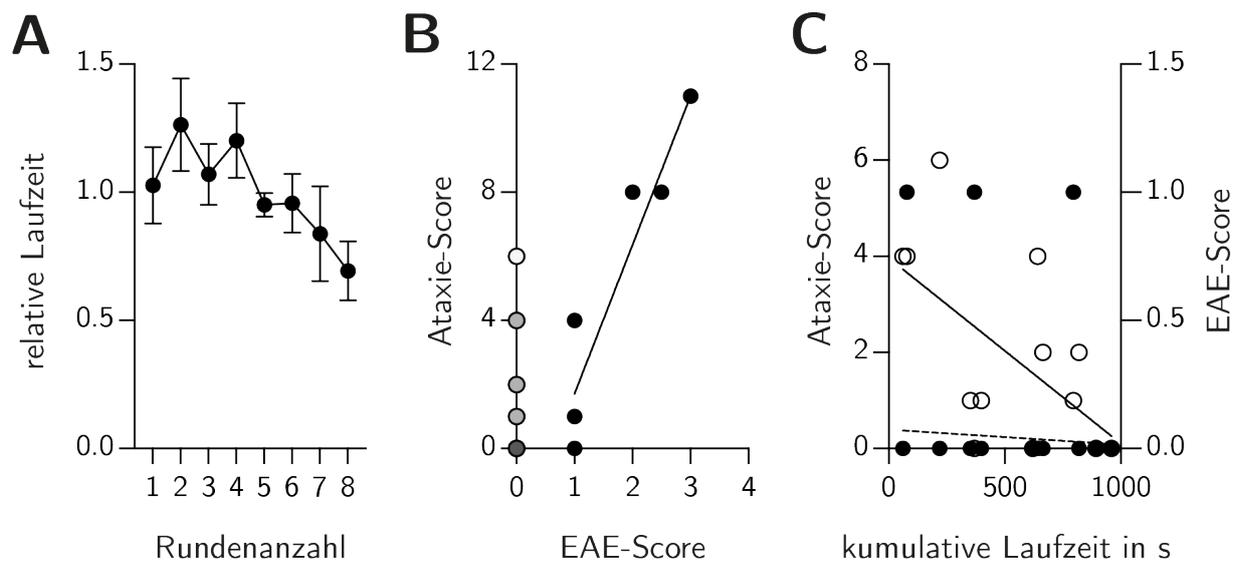


Abbildung 4.2: Neurologische Evaluation mittels RotaRod- und Ataxie-Score

A) Relative Laufzeit \pm SEM pro Runde bezogen auf die mittlere Laufzeit aller Runden im RotaRod-Test; 90d nach Immunisierung; $n = 8$ Tiere. **B)** Korrelation zwischen Ataxie- und EAE-Score; schwarze Punkte: Tiere mit einem EAE-Score > 0 ($n = 6$); graue Punkte: Tiere mit einem EAE-Score = 0 (dunkelgrau: $n = 3$, hellgrau: $n = 2$, weiß: $n = 1$, gesamt: $n = 10$); 90d nach Immunisierung; Lineare Regression der Ataxie- und EAE-Scores von Tieren mit einem EAE-Score > 0 ($r^2 = 0,88$, $p = 0,006$). **C)** Lineare Regression der Ataxie-Scores (Kreise und durchgezogene Linie, $r^2 = 0,35$, $p = 0,033$) und EAE-Scores (Punkte und gestrichelte Linie, $r^2 = 0,05$, $p = 0,48$) mit der kumulativen Laufzeit im RotaRod-Test; 90d nach EAE-Induktion; $n = 13$ Tiere. **A-C)** Zusammenarbeit mit Saskia List.

sprechend ist davon auszugehen, dass neben den motorischen Defiziten auch eine schnellere Erschöpfbarkeit der Mäuse zu den verkürzten Laufzeiten im RotaRod-Performance-Test führte.

Der verwendete Ataxie-Score wurde als Instrument zur Beurteilung der Symptomatik von Mausmodellen zerebellärer Ataxie konzipiert [135]. Vergleichbare ataktische Symptome konnten wir jedoch auch in einigen Mäusen unseres EAE-Modells beobachten. Dabei erwies sich dieser Ataxie-Score als eine einfache und handhabbare Methodik zur Objektivierung und Quantifikation der auftretenden aber nicht typischen EAE-Symptome. Da die Testitems des Ataxie-Scores größtenteils von einer intakten Motorik abhängig sind, kam es zwangsläufig bei Mäusen mit einem höheren EAE-Score auch zu auffälligen Ergebnissen im Ataxie-Score. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 4.2 B als lineare Regression zwischen dem Ataxie-Score und dem EAE-Score von Tieren mit einem EAE-Score größer 0 dargestellt und zeigt eine hohe Korrelation ($r^2 = 0,88$ und $p = 0,006$). Allerdings fiel auf, dass ein Teil der Mäuse mit einem EAE-Score von 0 einen zum Teil erheblichen Summenwert im Ataxie-Score erreichte. Dies ist passend zu der oben angeführten Beobachtung, dass im späten Krankheitsverlauf die im EAE-Score gemessenen Defizite nicht das vollständige Spektrum der EAE-Symptome erfassen.

Um zu testen, wie stark der RotaRod-Performance-Test vom Ataxie- bzw. vom EAE-Score abhängig ist, führten wir eine lineare Regression zwischen den Scores und der kumulativen Laufzeit durch (siehe Abbildung 4.2 C). Dabei zeigt der Ataxie-Score eine geringe aber signifikante Korrelation mit der Laufzeit im RotaRod-Test ($r^2 = 0,35$ und $p = 0,033$), während der EAE-Score im Bereich niedriger Punktwerte nicht mit dem RotaRod-Test zu korrelieren scheint ($r^2 = 0,046$ und $p = 0,48$). An dieser Stelle ist anzumerken, dass Mäuse mit ausgeprägten Paresen vom RotaRod-Test ausgeschlossen wurden, da hier eine sinnvolle Durchführung mit den von uns verwendeten RotaRod-Einstellungen nicht möglich war.

4.1.2 Analyse der Immunpathologie

Ausgehend von den zuvor definierten Gruppen hat Saskia List den Einfluss der Analysezeitpunkte auf das Läsionsausmaß der weißen Substanz des Rückenmarks untersucht (siehe

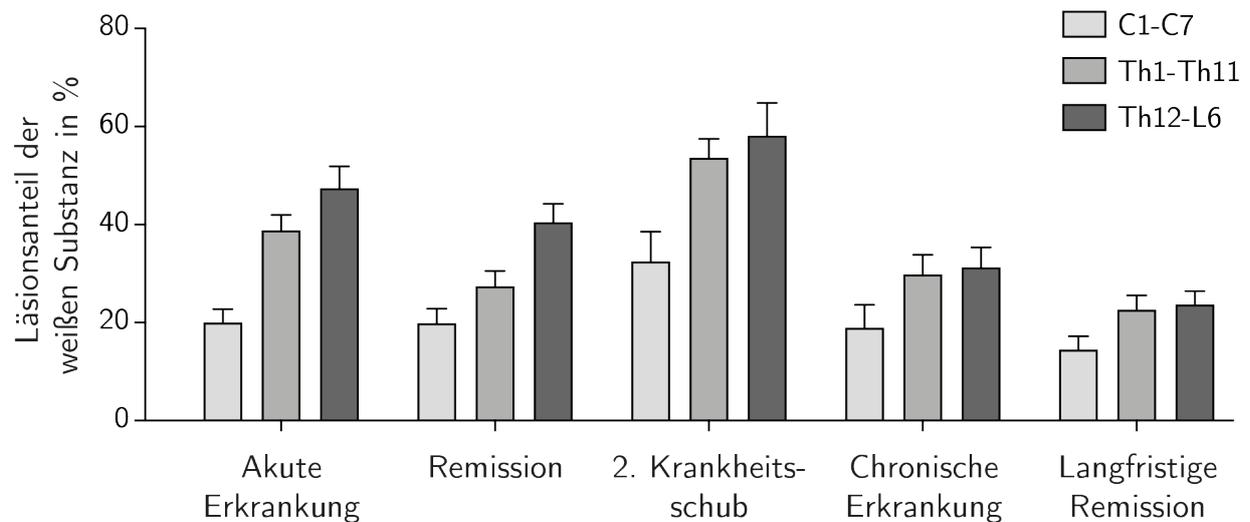


Abbildung 4.3: Ausdehnung und Verteilung der Läsionen zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

Läsionsausmaß verschiedener Höhen des Rückenmarks (zervikal, thorakal und lumbal) als Anteil demyelinisierter Fläche der weißen Substanz in Prozent + SEM zu den zuvor beschriebenen Analysezeitpunkten: Akute Erkrankung (C1-C7: n = 10 Schnitte; Th1-Th11: n = 12 Schnitte; Th12-L6: n = 11 Schnitte aus jeweils 5 Tieren), Remission (C1-C7: n = 6 Schnitte; Th1-Th11: n = 5 Schnitte; Th12-L6: n = 7 Schnitte aus jeweils 3 Tieren), 2. Krankheitsschub (C1-C7: n = 10 Schnitte; Th1-Th11: n = 7 Schnitte; Th12-L6: n = 12 Schnitte aus jeweils 5 Tieren), chronische Erkrankung (C1-C7: n = 11 Schnitte; Th1-Th11: n = 14 Schnitte; Th12-L6: n = 10 Schnitte aus jeweils 5 Tieren) und langfristige Remission (C1-C7: n = 14 Schnitte; Th1-Th11: n = 16 Schnitte; Th12-L6: n = 11 Schnitte aus jeweils 7 Tieren); Auswertung an konfokalmikroskopischen Schnittbildern; Läsionen definiert als demyelinisierte Areale anhand einer MBP-Färbung; vorläufige Daten von Saskia List (Stand 29.01.2022).

Abbildung 4.3). Hierzu bestimmte sie den prozentualen Anteil demyelinisierter Fläche an der Gesamtfläche der weißen Substanz verschiedener Höhen und Zeitpunkte. Als demyelinisierte Fläche wurden MBP-negative Areale sowie atypische MBP-positive Strukturen innerhalb der weißen Substanz gewertet. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Läsionslast zwischen den verschiedenen Analysezeitpunkten. Mäuse während der akuten Phase der Erkrankung (Th12-L6: $47,5 \pm 4,4$ %) sowie Mäuse mit einem zweiten Krankheitsschub (Th12-L6: $58,2 \pm 6,6$ %) wiesen besonders große Läsionen auf. Zum Zeitpunkt der chronischen Erkrankung (Th12-L6: $31,3 \pm 4,0$ %) und langfristigen Remission (Th12-L6: $23,7 \pm 2,8$ %) war der Läsionsanteil hingegen deutlich geringer, wobei zwischen diesen beiden Gruppen kein Unterschied bestand.

Um die immunpathologischen Unterschiede der verschiedenen klinischen Verläufe zu analysieren, hat Saskia List die Immunezellinfiltrate der Läsionen verschiedener Analysezeitpunkte bezüglich ihrer Zusammensetzung aus Mikroglia (Iba1⁺/CD45⁻), Lymphozyten (Iba1⁻/CD45⁺) und Makrophagen (Iba1⁺/CD45⁺) untersucht (siehe Abbildung 4.4). Hier zeigte sich, dass Läsionen der akuten Phase der Erkrankung besonders dichte Infiltrate aufwiesen, welche vorwiegend aus Lymphozyten und Makrophagen bestanden (Mikroglia: $1146,3 \pm 153,5 \text{ mm}^{-2}$, Lymphozyten: $1729,1 \pm 385,0 \text{ mm}^{-2}$, Makrophagen: $1338,9 \pm 270,0 \text{ mm}^{-2}$). Hingegen waren in Läsionen zum Zeitpunkt der chronischen Erkrankung und langfristigen Remission Mikroglia die prädominante Zellpopulation, wobei die Zellinfiltrate insgesamt deutlich weniger dicht waren. Auch bezüglich der Zusammensetzung der Immunezellinfiltrate zeigte sich kein Unterschied zwischen der chronischen Erkrankung (Mikroglia: $580,4 \pm 148,4 \text{ mm}^{-2}$, Lymphozyten: $88,9 \pm 20,7 \text{ mm}^{-2}$, Makrophagen: $217,3 \pm 52,6 \text{ mm}^{-2}$) und langfristigen Remission (Mikroglia: $608,6 \pm 77,2 \text{ mm}^{-2}$, Lymphozyten: $68,3 \pm 11,3 \text{ mm}^{-2}$, Makrophagen: $182,5 \pm 42,5 \text{ mm}^{-2}$).

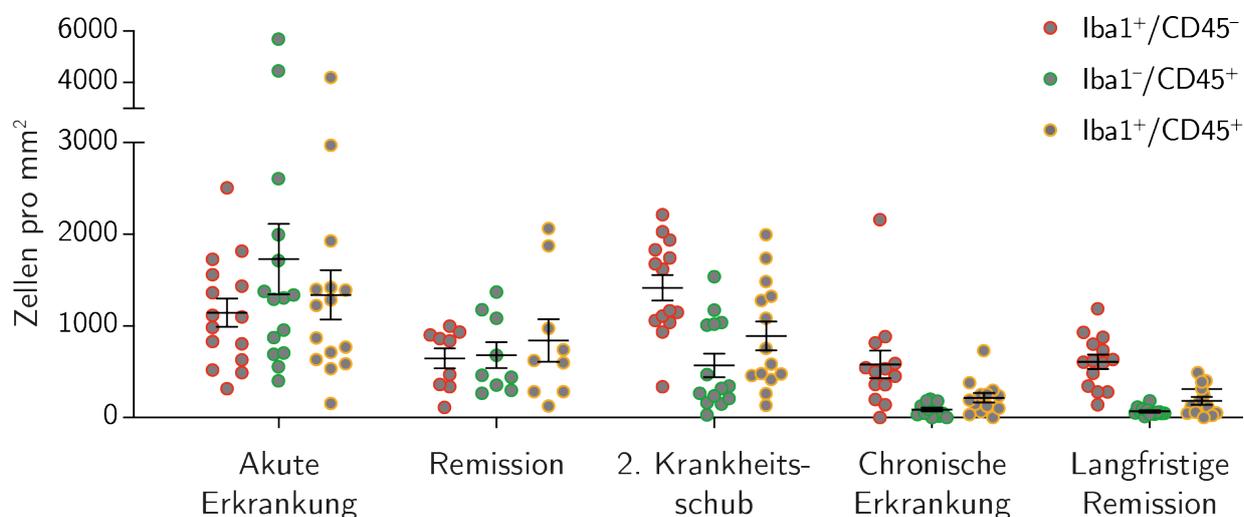


Abbildung 4.4: Differenzierung der Immunezellinfiltrate in Läsionen zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

Zellendichte (Mittelwert \pm SEM) der Mikroglia (Iba1⁺/CD45⁻), Lymphozyten (Iba1⁻/CD45⁺) und Makrophagen (Iba1⁺/CD45⁺) in Läsionen zu den jeweiligen Analysezeitpunkten (akute Erkrankung: n = 15 Läsionen aus 5 Tieren, Remission: n = 9 Läsionen aus 3 Tieren, 2. Krankheitsschub: n = 14 Läsionen aus 5 Tieren, chronische Erkrankung: n = 13 Läsionen aus 5 Tieren, langfristige Remission: n = 14 Läsionen aus 5 Tieren); Auswertung an konfokalmikroskopischen Schnittbildern; vorläufige Daten von Saskia List (Stand 29.01.2022).

4.2 Analyse der dendritischen Pathologie

Um die neurodegenerativen Veränderungen in diesem Modell zu untersuchen, analysierten wir die Länge von Dendriten der spinalen weißen Substanz innerhalb demyelinisierter Läsionen (siehe Abbildung 4.5). Zum Analysezeitpunkt der chronischen Erkrankung (siehe Abbildung 4.5 B) zeigte sich eine deutliche Reduktion der relativen Dendritenlänge innerhalb von Läsionen sowohl im Vergleich zu der gesunden Kontrolle (Kontrolle: $1,00 \pm 0,04$, Läsion: $0,42 \pm 0,04$, $p = <0,0001$; Werte normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollen) als auch gegenüber der kontralateralen Seite (kontralaterale Seite: $0,90 \pm 0,08$, $p = 0,0003$; Wert normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollen). Da besonders tief in die weiße Substanz reichende Läsionen insgesamt eher selten waren, ergab sich, dass die der Läsion gegenüberliegende Seite in allen analysierten Schnitten weniger betroffen war und somit als interne Kontrollregion genutzt werden konnte. Dabei zeigte die Dendritenlänge der kontralateralen Seite keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der gesunden Kontrolle (Differenz = $0,1$, $p = 0,33$, Differenz der auf den Mittelwert der Kontrollen normalisierten Messwerte). Der Vorteil der kontralateralen Seite als interne Kontrollregion ergibt sich aus der präziseren Zuordnung der analysierten Region innerhalb des Schnittes und der übereinstimmenden Höhe innerhalb des Rückenmarks. Aufgrund der heterogenen Verteilung von Dendriten innerhalb der weißen Substanz hat die möglichst präzise Zuordnung der Kontrollregion eine besondere Bedeutung.

Für ein besseres Verständnis des Zeitpunktes der Schädigung hat Michael Keilholz in unserem Labor in einem vergleichbaren Versuchsaufbau die relative Dendritenlänge in C57BL/6 Mäusen mit akuter EAE untersucht (siehe Abbildung 4.5 C). Auch hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der relativen Dendritenlänge in Läsionen gegenüber gesunden Kontrollen (Kontrolle: $1,00 \pm 0,04$, Läsion: $0,34 \pm 0,04$, $p = <0,0001$; Werte normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollen). Dabei war das Ausmaß der Schädigung vergleichbar mit dem des chronischen Zeitpunktes. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Schädigung bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung stattfindet, und über den Verlauf der Erkrankung bestehen bleibt.

Um die Vergleichbarkeit der Daten von Michael Keilholz und denen dieser Arbeit zu

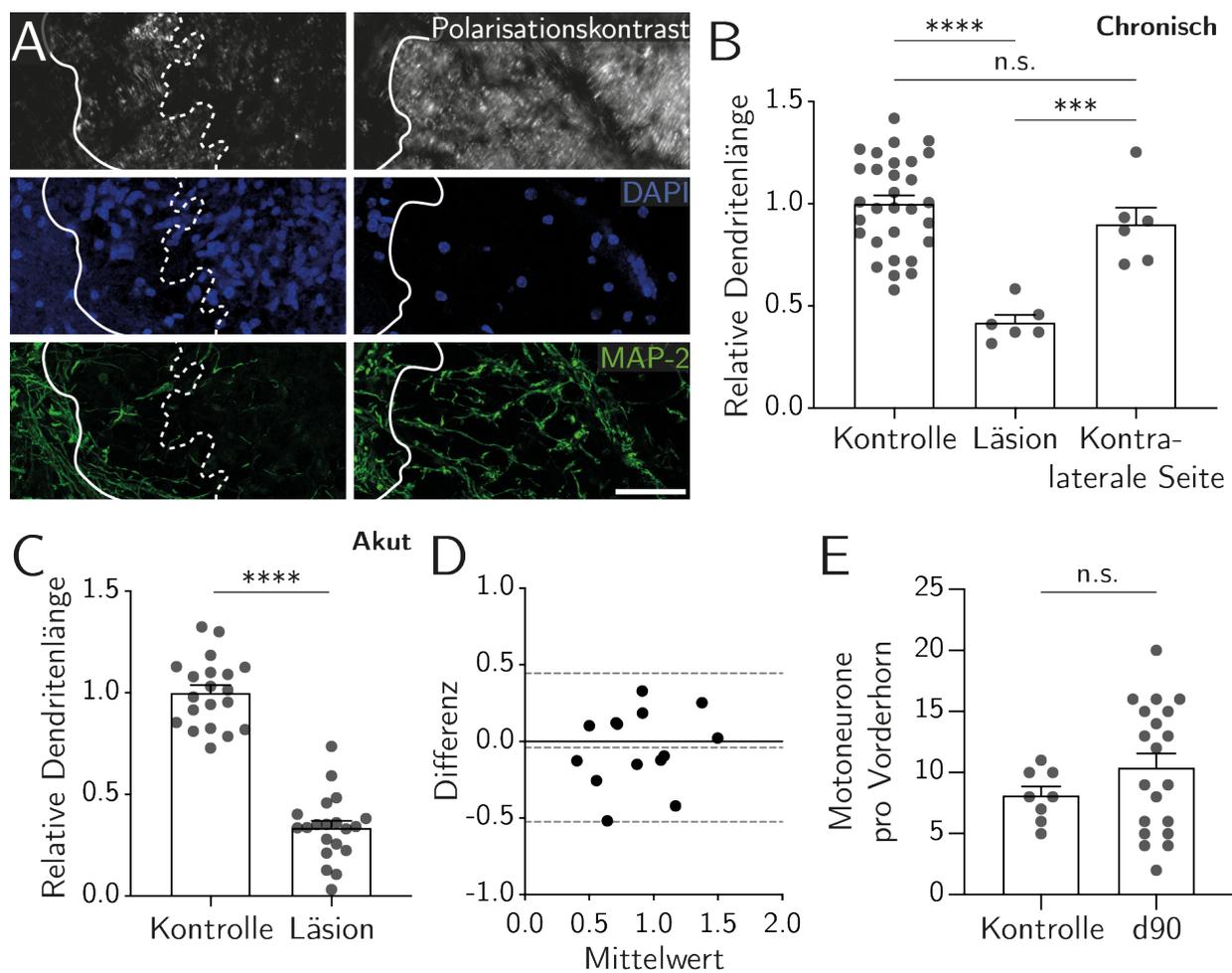


Abbildung 4.5: Dendritische Pathologie in akuter und chronischer EAE

Abbildung 4.5: Dendritische Pathologie in akuter und chronischer EAE

A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Übergangs zwischen grauer und weißer Substanz des Rückenmarks 60 Tage nach EAE-Induktion im Bereich einer Läsion (links) und der entsprechenden kontralateralen Seite (rechts); oben: myelinisierte Areale in grau (Polarisationskontrast), Mitte: Zellinfiltrate in blau (DAPI), unten: Dendriten in grün (MAP-2); durchgezogene Linie: Grenze der grauen Substanz; gestrichelte Linie: Läsionsgrenze; Maßstabsleiste: 50 μm . **B)** Relative Dendritenlänge (Mittelwert + SEM) bezogen auf die Länge des Zirkumferenzabschnitts der grauen Substanz und dem Mittelwert der Kontrollen; Auswertung erfolgte an konfokalmikroskopischen Aufnahmen wie in A dargestellt; $n = 6$ Läsionen und $n = 6$ kontralaterale Regionen von 4 Mäusen 60 Tage nach EAE-Induktion und $n = 30$ Kontrollregionen von 5 Kontrolltieren; Ungepaarter t-Test zwischen Kontrolle und Läsion ($p = <0.0001$), zwischen Läsion und kontralateraler Seite ($p = 0,0003$) sowie zwischen Kontrolle und kontralateraler Seite ($p = 0,33$). **C)** Relative Dendritenlänge (Mittelwert + SEM) in C57BL/6 Mäusen mit akuter EAE ($n = 20$ Regionen aus 6 Mäusen 2-4 Tage nach Symptombeginn) und gesunden Kontrollen ($n = 20$ Regionen aus 5 Mäusen); ungepaarter t-Test zwischen Kontrolle und Läsion ($p = <0,0001$); vorläufige Daten von Michael Keilholz (Stand 13.09.2021). **D)** Darstellung der Untersucher-abhängigen Reliabilität von Michael Keilholz und Stefan Syma als Bland-Altman-Diagramm; Differenz = $\text{Messwert}_{(\text{Michael Keilholz})} - \text{Messwert}_{(\text{Stefan Syma})}$; $n = 14$ Regionen; gestrichelte Linien: mittlere Differenz $\pm 1,96 \sigma$. **E)** Anzahl ChAT⁺-Neurone pro Vorderhorn (Mittelwert + SEM) des lumbosakralen Übergangs (L4-S3) in Mäusen 90 Tage nach EAE-Induktion ($n = 20$ Vorderhörner aus 5 Tieren) und gesunden Kontrollen ($n = 8$ Vorderhörner aus 2 Tieren); Analyse an konfokalmikroskopischen Übersichtsaufnahmen.

kontrollieren, haben wir die Untersucher-abhängige Reliabilität geprüft. Hier zeigt sich im Bland-Altman-Diagramm eine geringe mittlere Differenz bei jedoch verhältnismäßig großen Abweichungen der Einzelmesswerte (mittlere Differenz $\pm 1,96 \sigma = -0,04 \pm 0,49$). Diese Abweichungen sind vorwiegend durch Unterschiede in der Auswahl des Auswertungsareals erklärt. Aufgrund der geringen mittleren Differenz ist jedoch nicht von einem systematischen Fehler auszugehen. Zudem wird die Vergleichbarkeit der Werte auch über die Darstellungsweise als relative Messwerte zum Mittelwert der Kontrollen sichergestellt.

Da die Reduktion der Dendritenlänge auch ein sekundärer Effekt eines Verlustes von Motoneuronen sein könnte, haben wir die Anzahl an ChAT⁺-Neuronen in Vorderhörnern des lumbosakralen Übergangs bestimmt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und Mäusen 90 Tage nach EAE-Induktion (Kontrolle: $8,1 \pm 0,7$, d90: $10,4 \pm 1,2$, $p = 0,25$). Es ist jedoch anzumerken, dass die Bestimmung der Neuronenanzahl stark von den angeschnittenen Neuronengruppen abhängig und somit sehr höhenvariabel ist, wodurch die starke Streuung der Werte zu erklären ist.

4.3 Analyse der synaptischen Pathologie

Um zu untersuchen, inwieweit auch Synapsen von einer strukturellen Schädigung betroffen sind, haben wir die Dichte der Synapsen an Dendriten der weißen Substanz analysiert (siehe Abbildung 4.6 A-F). Dabei zeigte sich in Läsionen zum Zeitpunkt der chronischen Erkrankung (siehe Abbildung 4.6 B) eine geringe aber signifikante Abnahme der relativen Synapsendichte im Vergleich zur Kontrolle (Läsion: $0,86 \pm 0,06$, Kontrolle: $1,00 \pm 0,02$, $p = 0,018$; Werte normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollen), wohingegen kein Unterschied im Vergleich zu der kontralateralen Seite bestand (kontralaterale Seite: $0,86 \pm 0,06$; Wert normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollen).

Da auch die relative Synapsendichte der kontralateralen Seite betroffen war, ergab sich die Frage, ob dieses Ergebnis durch eine nicht ausreichend präzise Zuordnung der Kontrollregion bedingt sein könnte. Um dies auszuschließen, haben wir die Synapsendichte verschiedener Regionen des Rückenmarks miteinander verglichen (siehe Abbildung 4.6 C). Hierzu wurde die Synapsendichte gesunder Kontrollmäuse sowohl an Dendriten des ventra-

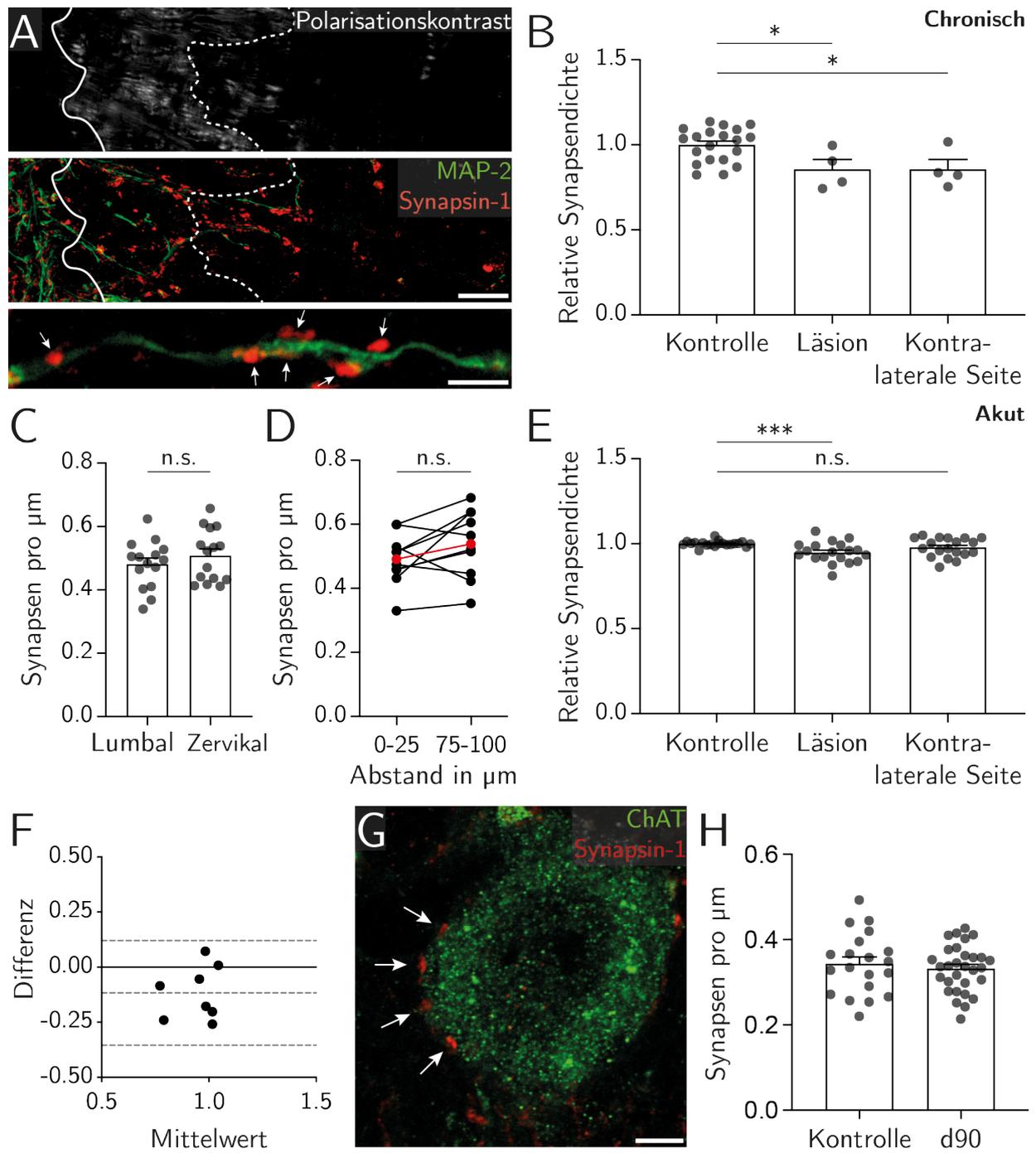


Abbildung 4.6: Synaptische Pathologie in akuter und chronischer EAE

Abbildung 4.6: Synaptische Pathologie in akuter und chronischer EAE

A) Konfokalmikroskopische Aufnahme des Übergangs zwischen grauer und weißer Substanz des Rückenmarks im Bereich einer Läsion 60 Tage nach EAE-Induktion; myelinisierte Areale in grau (Polarisationskontrast), Dendriten in grün (MAP-2), Synapsen in rot (Synapsin-1); durchgezogene Linie: Grenze der grauen Substanz; gestrichelte Linie: Läsionsgrenze; Pfeile: einzelne Synapsen; Maßstabsleiste oben: 20 μm , Maßstabsleiste unten: 5 μm . **B)** Relative Synapsendichte (Mittelwert + SEM) bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen gemessen an Dendriten der weißen Substanz in Läsionen chronischer EAE ($n = 4$ Läsionen aus 3 Mäusen 60 Tage nach EAE-Induktion), außerhalb von Läsionen auf der kontralateralen Seite ($n = 4$ kontralaterale Regionen aus 3 Mäusen 60 Tage nach EAE-Induktion) und gesunden Kontrollen ($n = 20$ Kontrollregionen aus 5 Kontrolltieren); Auswertung erfolgte an konfokalmikroskopischen Aufnahmen wie in A dargestellt; ungepaarter t-Test zwischen Kontrolle und Läsion ($p = 0,018$) und zwischen Kontrolle und interner Kontrollregion ($p = 0,018$). **C)** Synapsendichte (Mittelwert + SEM) als Synapsen pro μm Dendritenlänge an Dendriten des lumbalen Funikulus lateralis (lumbal) sowie des zervikalen Funikulus ventralis (zervikal); zervikal und lumbal jeweils $n = 15$ Regionen aus 5 gesunden Kontrolltieren; ungepaarter t-Test: $p = 0,34$. **D)** Synapsendichte als Synapsen pro μm Dendritenlänge an Dendriten der weißen Substanz in unterschiedlichem Abstand zur grauen Substanz; $n = 10$ Regionen aus 2 gesunden Kontrolltieren; Darstellung als verbundene Messwertpaare der einzelnen Regionen; rotes Messwertpaar: Mittelwert \pm SEM; gepaarter t-Test: $p = 0,092$. **E)** Relative Synapsendichte (Mittelwert + SEM) in C57BL/6 Mäusen mit akuter EAE ($n = 19$ Läsionen und $n = 19$ kontralaterale Regionen aus 6 Mäusen 2-4 Tage nach Symptombeginn) und gesunden Kontrollen ($n = 20$ Kontrollregionen aus 5 Kontrolltieren); ungepaarter t-Test zwischen Kontrolle und Läsion ($p = 0,0008$) und zwischen Kontrolle und interner Kontrollregion ($p = 0,093$); vorläufige Daten von Michael Keilholz (Stand 13.09.2021). **F)** Darstellung der Untersucher-abhängigen Reliabilität von Michael Keilholz und Stefan Syma als Bland-Altman-Diagramm; Differenz = $\text{Messwert}_{(\text{Michael Keilholz})} - \text{Messwert}_{(\text{Stefan Syma})}$; $n = 8$ Regionen; gestrichelte Linien: mittlere Differenz $\pm 1,96 \sigma$. **G)** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines Motoneurons (ChAT⁺) im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks 90 Tage nach EAE-Induktion in normal erscheinender grauer Substanz; Pfeile: Synapsin-1⁺-Präsynapsen; Maßstabsleiste: 5 μm . **H)** Synapsendichte (Mittelwert + SEM) als Synapsen pro μm Somagrenze ChAT⁺-Neurone im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks in Mäusen 90 Tage nach EAE-Induktion ($n = 30$ Neurone aus 3 Tieren) und gesunden Kontrollen ($n = 20$ Neurone aus 2 Tieren); Analyse an konfokalmikroskopischen Aufnahmen wie in G dargestellt.

len Funikulus des zervikalen Rückenmarks als auch an Dendriten des lateralen Funikulus des lumbalen Rückenmarks quantifiziert, wobei sich ein nur geringfügiger und nicht signifikanter Unterschied ergab (zervikal: $0,48 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$, lumbal: $0,51 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$, $p = 0,34$).

Aufgrund der zentripetalen Ausbreitung der Läsionen in der weißen Substanz bestand die Möglichkeit, dass die Auswertung in Läsionen tendenziell in einem größeren Abstand zu der grauen Substanz erfolgte als die Auswertung in Kontrollregionen. Um auszuschließen, dass dies einen Einfluss auf den Unterschied in der Synapsendichte zwischen Kontrolle und Läsion hat, haben wir die Synapsendichte an Dendriten in Abhängigkeit des Abstandes zur grauen Substanz untersucht (siehe Abbildung 4.6 D). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Analysegruppen (0-25 μm : $0,49 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$, 75-100 μm : $0,54 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$, $p = 0,092$).

Um zu untersuchen, ob zuvor beschriebene Regenerationsvorgänge [110] möglicherweise die eigentliche Ausprägung der Pathologie kaschieren, hat Michael Keilholz in einem ähnlichen Versuchsaufbau die Synapsendichte in C57BL/6 Mäusen mit akuter EAE analysiert (siehe Abbildung 4.6 E). Auch hier zeigte sich eine zwar signifikante aber dennoch nur geringfügige Reduktion der relativen Synapsendichte, wobei das Ausmaß der Schädigung im Vergleich zum Zeitpunkt der chronischen Erkrankung sogar noch geringer ausgeprägt war (Kontrolle: $1,000 \pm 0,004$, Läsion: $0,95 \pm 0,01$, $p = 0,0008$; Werte normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollen). Anders als zum chronischen Zeitpunkt zeigte sich in der akuten EAE zwischen der gesunden Kontrolle und der kontralateralen Seite kein signifikanter Unterschied (kontralaterale Seite: $0,98 \pm 0,01$, $p = 0,093$; Wert normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollen).

Auch für die Quantifikation der Synapsendichte wollten wir die Vergleichbarkeit der Analyse von Michael Keilholz und der dieser Arbeit untersuchen. Hierzu haben wir wieder die Untersucher-abhängige Reliabilität getestet (siehe Abbildung 4.6 F), wobei sich in dieser Auswertung neben den verhältnismäßig großen Abweichungen der Einzelmesswerte eine auch etwas größere mittlere Differenz zeigte (mittlere Differenz $\pm 1,96 \sigma = -0,12 \pm 0,24$). Diese Untersucher-abhängige Differenz in der Quantifikation der Synapsendichte ist vor allem auf Unterschiede in der Interpretation des Synapsin-1-Signals zurückzuführen. Aufgrund der relativen Darstellungsweise der Daten ist ein Vergleich dennoch möglich.

In MS-Patienten lässt sich ein Verlust von Synapsen auch in der normal-erscheinenden grauen Substanz beobachten [65, 64]. Dementsprechend haben wir die Dichte der Synapsen auch an Motoneuronensomata außerhalb von Läsionen untersucht (siehe Abbildung 4.6 G, H). Hier zeigte sich 90 Tage nach EAE Induktion kein Unterschied der Synapsendichte im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Kontrolle: $0,34 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$, d90: $0,33 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$).

In Zusammenschau der Daten lässt sich festhalten, dass ein Verlust von Synapsen in diesem Modell vorwiegend durch den Verlust von Dendriten bedingt ist. Eine isolierte Reduktion der Synapsendichte liegt allenfalls in geringem Ausmaß vor.

5 Diskussion

5.1 Chronische EAE als Modell der progredienten MS

5.1.1 Verhaltensanalysen

Wie zuvor bereits ausgeführt, lässt sich die EAE mit verschiedenen Antigenen in unterschiedlichen Mausstämmen induzieren, wobei die Kombination aus jeweiligem Antigen und Mausstamm den klinischen Verlauf bestimmt. In dieser Arbeit wurde die EAE mit MOG₁₋₁₂₅ in Biozzi AB/H Mäusen induziert. Gemäß der bisherigen Literatur führt dies zu einem chronisch-schubförmigen Verlauf, welcher vergleichbar mit der durch Rückenmark-homogenisat induzierten CREAE in Biozzi AB/H Mäusen ist [105, 95].

Entgegen dieser Beobachtungen zeigte die chronische MOG-EAE in unseren Versuchen eine heterogene klinische Präsentation mit sowohl chronisch-persistierenden als auch schubförmigen Verläufen sowie Verläufen mit vollständiger und langfristiger Remission. Dabei ist unklar, was diese unterschiedlichen EAE-Phänotypen bedingt. Bekannt ist, dass intrinsische und extrinsische Faktoren die Inzidenz und Krankheitsschwere der EAE beeinflussen [140, 141, 142], ob sie allerdings auch einen Einfluss auf die Art des klinischen Verlaufs haben können, ist nicht bekannt. Festzuhalten ist, dass sich im gleichen Wurf verschiedene Verlaufsformen beobachten ließen, wodurch Faktoren wie Alter, Stress, Ernährung und Haltebedingungen als Ursache unwahrscheinlich werden. Dabei ist anzumerken, dass 6 von 7 Mäusen mit schubförmigem Verlauf weiblich waren, während sich in den anderen Verlaufsformen kein klarer geschlechtsspezifischer Unterschied beobachten ließ. Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass die Immunisierung mit unterschiedlichen MOG-Epitopen zu unterschiedlichen klinischen Verläufen führt [105, 95]. So entwickeln Biozzi AB/H Mäuse,

welche mit dem MOG-Peptid 8-22 immunisiert werden, eine CREAE mit ausgeprägten Remissionsphasen, während die Immunisierung mit dem MOG-Peptid 35-55 eine CREAE induziert, die nach dem zweiten Schub in einen chronisch-persistierenden Verlauf übergeht [95]. Ob der Unterschied in der klinischen Präsentation möglicherweise durch die Konkurrenz verschiedener Epitope um die Dominanz in der Immunantwort erklärt werden kann, lässt sich in diesem Kontext schwierig beantworten. Insbesondere, da die funktionelle Relevanz der Konkurrenz von T-Zellen um verschiedene Antigene *in vivo* unklar ist [143]. Histopathologisch bedingt vermutlich vor allem das Ausmaß der akuten Schädigung, inwieweit eine Remission im weiteren Verlauf noch möglich ist und bestimmt somit, ob sich chronisch-persistierende Defizite manifestieren. Demgegenüber steht das Auftreten neuer Krankheitsschübe, welches durchaus mit neuer entzündlicher Aktivität einhergeht.

Der heterogene Verlauf des Modells führt dabei zu einigen Limitationen. So wird die Reproduzierbarkeit der einzelnen Verläufe reduziert und die Planbarkeit von Versuchen eingeschränkt. Andererseits bietet diese Situation die Möglichkeit, immunologische und histologische Unterschiede zwischen den Verläufen im direkten Vergleich innerhalb des gleichen Modells zu untersuchen.

Im chronischen Verlauf lässt sich in allen Mäusen mit residueller Symptomatik die Entwicklung einer fortschreitenden Spastik beobachten, unabhängig davon, ob ein zweiter Krankheitsschub folgt oder nicht. Die Symptomatik entwickelt sich dabei über den Verlauf mehrerer Wochen nach Beginn der Erkrankung und führt zu einer fortschreitenden Einschränkung der motorischen Funktion. Diese in der EAE auftretende Spastik wird in der CREAE teilweise als progrediente Symptomatik neurodegenerativen Ursprungs interpretiert, welche auch dann entsteht, wenn weitere Schübe durch immunsuppressive Interventionen unterbunden werden [101]. Pathophysiologisch liegt einer Spastik die Schädigung des ersten Motoneurons zugrunde. Dabei ist zu beachten, dass sich die spastische Symptomatik allerdings erst mit einer gewissen Latenz ausbildet [144]. Aufgrund des bekannten Ausmaßes der axonalen Schädigung in der akuten Phase der Erkrankung [111] liegt es nahe, dass, sobald der initiale Schaden ausgeprägt genug ist und die entsprechenden Fasertrakte betroffen sind, sich im weiteren Verlauf eine Spastik entwickeln wird. Dies würde auch erklären, weshalb weder Unterschiede im weiteren Krankheitsverlauf noch eine spä-

tere immunsuppressive Therapie einen Einfluss auf die Entstehung der Spastik haben. Inwieweit der akuten Erkrankung chronischer EAE-Modelle eine fortschreitende neurodegenerative Pathologie folgt, ist weitgehend unbekannt und soll im Verlauf noch genauer diskutiert werden. Dass derartige Prozesse einen Einfluss auf die spastische Symptomatik haben könnten, wäre durchaus denkbar, ist aber für die Erklärung der zu beobachtenden Spastik nicht zwangsläufig notwendig. Zudem ist anzumerken, dass die Symptomatik von Patienten mit progredienter MS weit über die Entstehung einer Spastik hinausgeht und die Übertragbarkeit zwischen der CREAE und der progredienten MS vielmehr an gemeinsamen pathologischen Eigenschaften und deren zugrunde liegenden Mechanismen als an Gemeinsamkeiten des klinischen Verlaufs festzumachen ist.

Für eine umfassendere Beschreibung der neurologischen Defizite erfolgte die Evaluation der motorischen Funktion mithilfe des RotaRod-Performance-Tests. Durch das Testregime mit acht konsekutiven Testrunden konnten wir zeigen, dass 90 Tage nach EAE-Induktion auch eine schnellere Erschöpfbarkeit die reduzierte kumulative Laufzeit bedingt. Interessant wäre dabei ein Vergleich zu früheren Zeitpunkten, um zu klären, wann sich diese Erschöpfbarkeit ausbildet. Eine ausgeprägte Erschöpfbarkeit ist dabei ein häufig zu beobachtendes Symptom in einer Reihe verschiedener chronischer Erkrankungen, wobei erwähnt sein soll, dass die körperliche Erschöpfbarkeit nur ein Teil der Beschwerden des als Fatigue bezeichneten Symptomkomplexes ist. Im Rahmen der MS betrifft diese pathologische Erschöpfbarkeit ca. 80 % der Patienten und ist damit das am häufigsten vorliegende Symptom [145]. In der Literatur finden sich hierzu eine Reihe verschiedener peripherer und zentraler Pathomechanismen, welche die Entstehung chronischer Erschöpfungssyndrome erklären können. Darunter werden u.a. proinflammatorische Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie eine veränderte glutamaterge synaptische Transmission und muskuläre Dysfunktionen als mögliche Ursachen genannt [146]. Im Kontext unserer chronischen EAE ist eine muskuläre Erschöpfung als Resultat der begleitend bestehenden spastischen Symptome eine naheliegende Erklärung. Um diese Aussage validieren zu können, wäre jedoch eine bessere, wenn möglich quantitative, Testung der Spastik notwendig. Bisher existieren hierzu allerdings keine standardisierten Testmethoden. Neben klinischen Scores könnte die Bestimmung des Dehnungswiderstands der Muskulatur eine vergleichsweise einfache quantitative Alternati-

ve [101] zu elektrophysiologischen Messmethoden sein. Muskuläre Erschöpfbarkeit ist dabei nicht ausschließlich als Folge eines muskulären Defizits zu verstehen, sondern tritt auch als Folge einer eingeschränkten spinalen und supraspinalen Innervation auf [147]. Dementsprechend ist es vorstellbar, dass auch die Deafferenzierung spinaler Motoneurone durch axonale, dendritische und synaptische Schädigung zu dieser gesteigerten Erschöpfbarkeit beitragen.

Ein Teil der Mäuse mit chronischer EAE entwickelt zudem eine atypische ataktische Symptomatik, die über den klassischen EAE-Score nicht erfasst wird. Insbesondere in Mäusen mit einem unauffälligen oder milden EAE-Score zeigt der Ataxie-Score seinen Nutzen. Während wir in der chronischen MOG-EAE diese atypische Symptomatik lediglich in einem Teil der Mäuse beobachteten, sind in der Literatur einige EAE-Modelle beschrieben, die vorwiegend mit einer solchen atypischen Symptomatik einhergehen [148, 149, 150, 151]. In diesen Studien wird zum Teil ein Scoring-System verwendet, das Merkmale wie z.B. eine Kyphose, eine schräge Kopfhaltung, ein verändertes Gangbild, spastische Symptome und Störungen der Propriozeption beurteilt, und abhängig von den vorliegenden Symptomen einen Punktwert zwischen 0 und 5 zuordnet [148, 149]. Dabei ist anzumerken, dass viele dieser Symptome in der klinischen Beurteilung zum einen nicht klar trennbar sind und zum anderen keine zwangsläufige hierarchische Ordnung zwischen diesen Symptomen besteht. In dem von uns angewandten Ataxie-Score finden sich im Vergleich zum atypischen EAE-Score einige Überschneidungen in den beurteilten Merkmalen. Allerdings werden dabei diese Symptome isoliert in ihrer Ausprägung beurteilt und erst hinterher als Summenwert zusammengefasst, wodurch eine realistischere Einschätzung der Krankheitsschwere erreicht wird. Eine deutliche Limitation ist dabei die Abhängigkeit des Ataxie-Scores vom EAE-Score, sodass in Mäusen mit ausgeprägten Paresen der Ataxie-Score falsch hohe Werte ergibt. Die atypischen EAE-Modelle gehen mit entzündlichen Infiltraten des Hirnstamms und Zerebellums einher, wodurch sich die zuvor beschriebenen Symptome gut erklären lassen. Vergleichbare Läsionen ließen sich auch in einzelnen Mäusen mit chronischer MOG-EAE beobachten (Daten nicht gezeigt). In welchem Ausmaß, mit welcher Frequenz und zu welchem Zeitpunkt diese Infiltration stattfindet, erfordert dabei weitere Untersuchungen.

Bei der Analyse der Abhängigkeit des RotaRod-Performance-Tests vom Ataxie- bzw.

EAE-Score zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Punktwert im Ataxie-Score und der Laufzeit im RotaRod-Test, während niedrige EAE-Scores die Laufzeit nicht beeinflussten. Die Ergebnisse anderer Studien haben mehrfach den Zusammenhang zwischen dem EAE-Score und der Laufzeit im RotaRod-Test dargestellt [138, 139]. Dieser zeigt sich allerdings nur in Mäusen mit höheren EAE-Scores und kann somit nur bei niedrigeren Drehgeschwindigkeiten, am besten mit einem akzelerierenden Modus, evaluiert werden. Aufgrund unserer Testeinstellungen mit einer vergleichsweise hohen und konstanten Drehgeschwindigkeit, mussten wir Mäuse mit ausgeprägten Paresen ausschließen. Allerdings ermöglichen diese Einstellungen eine bessere Diskriminierung von leichteren Defiziten, welche zu späten Zeitpunkten der chronischen EAE insgesamt häufiger zu beobachten sind. Allgemein lässt sich aus diesen Daten schlussfolgern, dass die reduzierte Laufzeit von Mäusen, welche keinen relevanten EAE-Score aufweisen, durch Symptome bedingt ist, welche im EAE-Score nicht adäquat erfasst werden wie Ataxie, Spastik oder Fatigue.

Letztendlich testen der EAE-Score, der RotaRod-Test sowie der Ataxie-Score jeweils unterschiedliche Komponenten der Symptomatik und die Kombination der drei Testverfahren ermöglicht eine umfassendere Beschreibung der Defizite. Dabei ist noch einmal hervorzuheben, dass insbesondere ausgeprägtere Paresen der Hinterläufe, wie sie für die akute Phase der Erkrankung typisch sind, die Testung des Ataxie-Scores und den RotaRod-Test erschweren. Auch unter Berücksichtigung des nicht zu vernachlässigenden Mehraufwandes werden diese Testverfahren vor allem in Interventionsstudien zusätzlichen Nutzen bringen, für die der sensitive Nachweis von Unterschieden in der Symptomschwere im chronischen Verlauf der Erkrankung von besonderem Interesse ist.

5.1.2 Histopathologische Analysen

Die in der EAE zu beobachtenden aufsteigenden Paresen spiegeln sich auch in der Organisation spinaler Läsionen wider und sind Ausdruck der zentripetalen Ausbreitung sowie der kaudal betonten Lokalisation der Entzündung. Die Daten von Saskia List zeigten, dass das Läsionsausmaß vor allem in der akuten Phase der Erkrankung besonders ausgeprägt war. Verglichen hierzu zeigten sowohl Mäuse mit chronisch-persistierenden Symptomen als

auch Mäuse in langfristiger Remission geringer ausgeprägte Läsionen. Dabei ist es unwahrscheinlich, dass dieser Unterschied durch eine Remyelinisierung bedingt ist. Bekannt ist, dass die dünnen Myelinscheiden remyelinisierter Axone ein deutlich schwächeres Färbeverhalten zeigen und nur elektronenmikroskopisch zuverlässig dargestellt werden können [152], sodass Areale mit beginnender Remyelinisierung in dieser Auswertung mit in die demyelinisierte Fläche eingefasst worden wären. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass der geringere Läsionsanteil der späten Analysezeitpunkte weniger auf Regenerationsvorgänge, sondern eher auf Unterschiede im initialen Läsionsausmaß zurückzuführen ist.

Zwischen der chronischen Erkrankung und der langfristigen Remission war erstaunlicherweise kein Unterschied im Läsionsausmaß zu erkennen. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass die Ausbildung persistenter neurologischer Defizite auf eine ausreichende Schädigung der entsprechenden Fasertrakte zurückzuführen ist. Ein unterschiedliches Läsionsausmaß hätte die klinischen Unterschiede gut erklären können, scheint jedoch nicht zu bestehen. Möglicherweise existieren Unterschiede nur in der Läsionslokalisation sowie der lokalen Läsionsausprägung, was die unterschiedliche Symptomatik ebenfalls erklären würde. Dass eine fortschreitende entzündliche Aktivität Ursprung der chronisch-persistierenden Symptomatik ist, ist aufgrund der geringen Dichte der Immunzellinfiltrate in Läsionen dieser Mäuse unwahrscheinlich.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Evaluation neurodegenerativer Veränderungen. Die Analyse der Dendritenlänge zeigte dabei, dass die entzündlichen Läsionen der EAE mit einer ausgeprägten Schädigung von Dendriten einhergeht. In Zusammenschau mit den Daten von Michael Keilholz wird deutlich, dass diese Schädigung bereits zu einem frühen Zeitpunkt, in der akuten Phase der Erkrankung, stattfindet, und dass es im Verlauf der Erkrankung zu keiner Progression dieses Dendritenschadens kommt.

Eine Schädigung von Dendriten lässt sich in verschiedenen Krankheitsbildern wie zum Beispiel der Alzheimer-Demenz aber auch in anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen beobachten [153]. Dabei zeigt die Dendritenpathologie ein breites Spektrum an möglichen Veränderungen, angefangen bei dem Verlust von Dornfortsätzen über die Ausbildung fokaler Schwellungen bis hin zur Atrophie von Dendriten und einer reduzierten Komplexität der Dendritenarchitektur. In unseren Versuchen war in erster Linie die Länge der Dendri-

ten betroffen, wobei in einzelnen Mäusen auch die zuvor erwähnten fokalen Schwellungen beobachtet werden konnten. Diese Schwellungen von Dendriten in der weißen Substanz des Rückenmarks wurden bereits nach EAE-Induktion in Ratten beschrieben [154]. Eine ähnliche dendritische Pathologie, welche aber auch die Länge der Dendriten betrifft, wurde in der EAE bisher im somatosensorischen Kortex von Ratten [131] und im Hippocampus von Mäusen [130] beobachtet. Zum Teil wurde in diesen Studien über eine leichte Rückbildung der Schädigung im Krankheitsverlauf berichtet [154, 131]. Auch beim Vergleich der Daten von Michael Keilholz und denen dieser Arbeit zeigte sich, dass in Läsionen zum Zeitpunkt der chronischen Erkrankung die relative Dendritenlänge 8 % länger war als zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung. Aufgrund der Verwendung eines anderen Mausstammes und einer leicht abweichenden Auswertungsmethode ist diese Differenz allerdings mit Vorsicht zu interpretieren. Dennoch konnten zumindest Untersucher-abhängige Unterschiede zum einen durch die Testung der Untersucher-abhängigen Reliabilität und zum anderen durch die relative Darstellungsweise ausgeschlossen werden.

Die Auswertung der Dendritenlänge in Regionen, in denen die entzündlichen Infiltrate weniger nahe an die graue Substanz heranreichten, zeigte, dass die Schädigung vorwiegend innerhalb der Läsionen stattfindet. Der Zusammenhang zwischen entzündlicher Aktivität und dendritischer Schädigung wurde auch in den zuvor genannten Studien beobachtet [154, 131, 130]. Aufgrund dieser Beobachtung war es möglich, die weniger betroffene kontralaterale Seite als interne Kontrollregion zu verwenden, sodass eine präzisere Zuordnung von Kontroll- und Analyseregion möglich wurde. Dieser Zuordnung kommt durch die stark heterogene Verteilung von Dendriten innerhalb der weißen Substanz eine besondere Bedeutung zu. Dennoch ist anzumerken, dass eine diffuse Dendritenschädigung außerhalb von Läsionen nicht komplett auszuschließen ist. Immerhin besteht zwischen der relativen Dendritenlänge der gesunden Kontrolle und der kontralateralen Seite ein, wenn auch nicht signifikanter Unterschied von 10 %.

Ein nicht auszuschließender Faktor, der zu der reduzierten Dendritenlänge beitragen könnte, ist ein Verlust an Neuronen im Rückenmark. Unsere Daten zeigen zwar keinen Unterschied in der Dichte der Motoneurone zwischen Kontrolltieren und Mäusen 90 Tage nach EAE-Induktion, jedoch weist diese Analyse einige technische Limitationen auf. Da die

Anzahl der Motoneurone im Rückenmark stark von den jeweils angeschnittenen Neuronengruppen abhängig und somit stark höhenvariabel ist, erfordert eine zuverlässige Analyse ein stereologisches Vorgehen. Mit einer derartigen Auswertungsmethode konnte eine andere Studie in C57BL/6 Mäusen nachweisen, dass es im Verlauf der EAE durchaus zu einer Abnahme der Dichte spinaler Neuronen kommen kann [128]. In dieser Studie wurde sogar von einem Unterschied von über 50 % berichtet. Dabei ist anzumerken, dass ein so großer Unterschied auch in einer orientierenden Analyse hätte auffallen müssen. Da die Ergebnisse an dieser Stelle nicht konklusiv sind, aber durchaus Implikationen für die Interpretation der Dendritenschädigung haben, muss in nachfolgenden Experimenten die Neuronendichte in unserem Modell erneut evaluiert werden.

Begleitend zu der Schädigung von Dendriten haben wir den Einfluss der Läsionen auf die Synapsendichte untersucht. Während die absolute Anzahl von Synapsen durch die Abnahme der Dendritenlänge zwangsläufig reduziert ist, zeigte sich die Dichte der Synapsen an bestehenden Dendriten innerhalb der Läsionen nur geringfügig vermindert. Ein Verlust von Synapsen wurde in der EAE in Mäusen [110, 130] und in Ratten [131] bereits in verschiedenen Regionen des ZNS nachgewiesen. Dieser Verlust wurde meist in einem frühen Stadium der Erkrankung beobachtet und zeigte sich im Verlauf teilweise reversibel [110]. Die Ergebnisse von Michael Keilholz zeigen dabei, dass die Synapsendichte an Dendriten der weißen Substanz auch während der akuten Phase der Erkrankung nur geringfügig reduziert ist. Im Vergleich zeigt der chronische Zeitpunkt sogar eine etwas geringere Synapsendichte. Diese Differenz ist aufgrund der geringen Ausprägung und der auch hier leicht unterschiedlichen Methodik ebenfalls vorsichtig zu interpretieren.

Da eine Abnahme der Synapsendichte in der EAE stellenweise in einem wesentlich größeren Ausmaß nachgewiesen wurde [110, 131], stellt sich die Frage, weshalb dieser Unterschied an Dendriten der spinalen weißen Substanz so gering ist. Eine mögliche Erklärung könnte die zeitgleiche dendritische Schädigung sein. Die meisten Studien, die einen Verlust von Synapsen in der EAE beschreiben, weisen diesen in zerebralen ZNS-Regionen nach [110, 131], in denen wesentlich weniger entzündliche Infiltrate zu finden sind. Die Selektion von besonders ausgeprägten spinalen Läsionen könnte somit über den damit verbundenen dendritischen Schaden eine Reduktion der Synapsendichte kaschieren. Dabei ist jedoch

anzumerken, dass wir auch an Dendriten der kontralateralen Seite und an Motoneuronensomata keine Abnahme der Synapsendichte beobachten konnten, wobei beides Regionen mit einer geringeren entzündlichen Aktivität sind.

Ein weiterer Aspekt ist, dass die Studien, die einen zerebralen Verlust von Synapsen untersuchen, in der Regel den Verlust dendritischer Dornfortsätze analysieren [110, 131]. Im Gegensatz hierzu weisen die Dendriten der spinalen weißen Substanz keine Dornfortsätze auf [116] und die synaptischen Kontakte befinden sich allesamt direkt auf dem Dendritenschaft. In-vivo-Mikroskopie-Daten liefern dabei Hinweise darauf, dass Synapsen, die den Dendritenschaft kontaktieren, stabiler sind als solche, die sich an Dornfortsätzen befinden [155, 156]. Inwiefern sich eine weniger dynamische Synapsenplastizität auch in eine höhere Resistenz gegenüber einer immun-medierten Synapsenschädigung übersetzt, bleibt diskutabel, würde sich jedoch gut in das Gesamtbild einfügen und eine mögliche Erklärung für die zu beobachtenden Unterschiede spinaler und zerebraler Synapsenpathologie liefern.

Auch muss beachtet werden, dass nicht jede Form der Synapsenpathologie sich zwangsläufig in einem Verlust von Synapsen äußert und die synaptische Transmission auch von erhaltenen Synapsen gestört sein kann [157]. Eine mehrfach diskutierte Beobachtung ist die Dysbalance von glutamaterger und GABAerger synaptischer Aktivität. Trotz einiger widersprüchlicher Ergebnisse weist die Zusammenschau bisheriger Studien insgesamt auf eine gesteigerte glutamaterge und reduzierte GABAerge Aktivität hin. Diese Konstellation könnte in der Folge wiederum eine exzitotoxische Schädigung der Neuronen bedingen. [129]

5.2 Pathomechanismen der entzündlichen Schädigung von Dendriten und Synapsen

Die exzitotoxische Schädigung ist ein wichtiges pathophysiologisches Konzept, bei dem davon ausgegangen wird, dass eine anhaltende Übererregung zu einer strukturellen Schädigung von Synapsen, Dendriten und schlussendlich dem gesamten Neuron führt. Eine zentrale Komponente dieses Mechanismus ist der exzitatorische Einfluss durch Glutamat. Sowohl in der EAE als auch in der MS wurde eine gestörte Homöostase des Glutamat-

haushalts beobachtet [158]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Glutamat in akuten Läsionen sowie in Regionen normal erscheinender weißer Substanz mit der Schwere der Erkrankung und der Krankheitsprogression von MS-Patienten korreliert [159, 160, 161]. Die erhöhten Glutamatspiegel sind dabei am ehesten ein Resultat des Zusammenspiels von vermehrter Freisetzung aus Synapsen und Immunzellen [162, 163] bei gleichzeitig gestörter Aufnahme durch Gliazellen [164, 165, 157] sowie einem gestörten Glutamatmetabolismus [166] [167].

Eine entscheidende Rolle in der Entstehung der synaptischen Übererregung wird den von aktivierten Mikroglia freigesetzten Zytokinen TNF- α und Interleukin-1 β (IL-1 β) zugesprochen. Sowohl TNF- α [164] als auch IL-1 β [157] führen zu einer reduzierten Expression der Glutamattransporter und hemmen damit die Wiederaufnahme von Glutamat. Zudem bedingt TNF- α eine vermehrte Verfügbarkeit von AMPA-Rezeptoren [110]. Diese Konstellation von sich akkumulierendem Glutamat bei gleichzeitig erhöhter Glutamatempfindlichkeit äußert sich in einer gesteigerten Erregbarkeit der Neurone. Die Hypothese ist nun, dass bei anhaltender Entzündung dieser Mechanismus die zu beobachtenden strukturellen Schäden von Synapsen, Dendriten und Neuronen bedingt [129, 168].

Der genaue Mechanismus, über den diese Schädigung stattfindet, ist dabei nicht bekannt. Eine Möglichkeit ist, dass die pathologisch gesteigerte Aktivität von AMPA- und NMDA-Rezeptoren über den dadurch vermehrten Einstrom von Ca²⁺-Ionen zur Aktivierung von Proteasen [169, 170] und Kinasen [171] führt, was wiederum eine Destabilisierung des Zytoskeletts von Synapsen und Dendriten zur Folge hat.

Ein weiterer Pathomechanismus, der an dieser Stelle besprochen werden soll, ist der Phagozyten-mediierte Verlust von Synapsen. Bekannt ist, dass Synapsen und Dendriten während der Entwicklung des ZNS hoch dynamische Strukturen darstellen, deren Auf- und Abbau aktivitätsabhängig ist [172]. Dysfunktionale Synapsen werden hierbei durch Komplementfaktoren markiert und in der Folge von Mikroglia phagozytiert [173]. Diese Komplement-vermittelte Phagozytose von Synapsen findet beispielsweise auch in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz statt [174]. Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus auch in der MS zum Tragen kommen könnte, stammen dabei sowohl aus dem EAE-Modell [175, 176] als auch aus Post-Mortem-Analysen von MS-Patienten

[66, 176]. Anzumerken ist, dass neben den Komplementfaktoren auch andere Signalwege die Phagozytose von Synapsen vermitteln können und dass an dieser Stelle möglicherweise mehrere Mechanismen zusammenwirken. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer anderen Studie in einem kortikalen MS-Modell nachweisen, dass hohe Ca^{2+} -Spiegel in Dornfortsätzen und Dendriten kortikaler Neurone einen wichtigen Indikator für den Verlust von Synapsen darstellen und mit der Phagozytose von synaptischem Material einhergehen [133]. Wie genau dabei die erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen zu der Phagozytose von Synapsen führen und woher das Kalzium stammt ist bisher unbekannt. Auch bleibt zu klären, inwiefern der Phagozyten-medierte Synapsenverlust und die exzitotoxische Schädigung miteinander in Verbindung stehen. Prinzipiell wäre es denkbar, dass eine pathologisch gesteigerte glutamaterge Stimulation von AMPA- und NMDA-Rezeptoren über eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration die Expression von Phagozytosesignalen bedingt und somit den Synapsenverlust auslöst. Die Markierung zur Phagozytose könnte dabei entweder direkt über die erhöhten Ca^{2+} -Spiegel reguliert werden oder als Konsequenz einer Destabilisierung und Schädigung des Zytoskeletts erfolgen [133]. Des Weiteren zeigt sich in dem kortikalen MS-Modell vor allem ein Verlust exzitatorischer Synapsen und eine Hypoaktivität der Neurone [133]. Diese verminderte Aktivität könnte als Hinweis gewertet werden, dass der Phagozytose-medierte Synapsenverlust unabhängig von einer exzitotoxischen Schädigung stattfinden kann. Im Kontext der zuvor besprochenen Hypothese ließe sich aber auch argumentieren, dass der Verlust exzitatorischer Synapsen der exzitotoxischen Schädigung folgt und schlussendlich in einer Hypoaktivität der Neurone resultiert.

Neben dem Phagozyten-medierten Verlust von Synapsen konnte eine andere Studie in einem Mausmodell für Schädel-Hirn-Trauma zeigen, dass in einem inflammatorischen Kontext auch die Schädigung von Dendriten Mikroglia-abhängig geschieht. So zeigte diese Studie unter anderem eine reduzierte astrozytäre Expression neurotropher Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle wie beispielsweise des Notch-Regulators *lunatic fringe* (Lfng), aber auch eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors *nuclear respiratory factor 1* (NRF1), welcher ebenfalls mit dem Neuritenwachstum assoziiert ist. Eine der Hirnschädigung vorangegangene Depletion von Mikroglia normalisierte hingegen das Expressionsprofil von Astrozyten und Neuronen und reduzierte die Dendritenschädigung. [177]

Der zuvor erwähnte Notch-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle sowohl in der Neurogenese als auch der ZNS-Homöostase [178]. Im Kontext der MS ist der Notch-Signalweg vorwiegend im Hinblick auf seine Rolle in der Entwicklung von Oligodendrozyten und Lymphozyten untersucht. Daten aus dem EAE-Modell liefern Hinweise dafür, dass eine Inhibition von Notch sowohl die Remyelinisierung verbessert [179] als auch einen antiinflammatorischen Effekt zeigt [180]. Dabei ist anzumerken, dass der Effekt des Notch-Signalwegs stark kontextabhängig und seine Wirkweise in den zuvor beschriebenen Beobachtungen unzureichend verstanden ist. Ebenso ist der Einfluss von Notch auf die neurodegenerativen Veränderungen der MS wenig untersucht.

Neben den zuvor erwähnten Effekten ist für diese Arbeit von besonderem Interesse, dass der Notch-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Morphogenese von Dendriten spielt. Eine Studie an hippocampalen Neuronen adulter Mäuse konnte zeigen, dass Notch dabei nicht nur die Entwicklung neuronaler Stammzellen beeinflusst, sondern auch direkt das Dendritenwachstum in postmitotischen Neuronen reguliert [181]. So liegt es nahe, dass die im entzündlichen Milieu alterierte Expression von Signalmolekülen des Notch-Signalwegs möglicherweise auch in der Pathogenese der Dendritenschädigung im EAE-Modell eine Rolle spielt.

5.3 Therapeutische Interventionsmöglichkeiten

Die therapeutischen Ansatzpunkte ergeben sich aus den besprochenen Pathomechanismen und können die exzitotoxische Wirkung von Glutamat, den Einfluss der Zytokine, die Dendritenstabilität oder die phagozytische Aktivität adressieren. Ziel künftiger Studien sollte dabei die Aufklärung des Schädigungsmechanismus sowie die Evaluation der Therapeutika auf ihre neuroprotektive Wirkung im Kontext der EAE sein.

Vielversprechende Ergebnisse zeigt dabei die Blockade von Glutamatrezeptoren im EAE-Modell. So zeigt sowohl die Inhibition von AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren einen positiven Einfluss auf die neurologischen Defizite der EAE [182, 183, 184]. Mögliche Effekte beschränken sich dabei nicht nur auf die Prävention einer neuronalen Schädigung, sondern können auch immunmodulatorisch wirken, die Integrität der Bluthirnschranke schützen und

den Untergang von Oligodendrozyten verhindern [167]. Vorangegangene Studien konnten dabei zeigen, dass die Blockade von AMPA-Rezeptoren durch den Antagonisten NBQX den Verlust spinaler Neurone verhindert [182], sowie dass die Inhibition von NMDA-Rezeptoren über Amantadin oder Memantin die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen reduziert [184] und dass Memantin die Infiltration von Immunzellen hemmt sowie die Funktion der Bluthirnschranke verbessert [183].

Während eine Wirkweise über multiple Mechanismen für die Erfolgsaussichten eines Therapeutikums positiv zu bewerten ist, erschwert dies gleichzeitig die Aufklärung der Pathogenese. Diese Problematik ergibt sich nicht nur bei der Blockade von Glutamatrezeptoren, sondern auch bei den nachfolgend besprochenen Therapieoptionen.

Die Zusammenschau des plausiblen Pathomechanismus, der positiven präklinischen Daten und der Hinweise auf einen gestörten Glutamathaushalt in MS-Patienten scheint zunächst vielversprechend für den Erfolg einer anti-glutamatergen Therapie. Abgesehen von einem positiven Einfluss von Amantadin auf die Gehfähigkeit von Patienten [185] waren die Ergebnisse der sonstigen klinischen Studien bisher jedoch ernüchternd [78, 79, 80]. Der Nachweis einer möglichen Wirksamkeit ist dabei vermutlich abhängig von der korrekten Dosisfindung und der Identifikation einer profitierenden Subpopulation, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme von Biomarkern wie der Glutamatkonzentration oder pro-inflammatorischer Zytokine [167]. Des Weiteren bedarf es eines besseren mechanistischen Verständnisses zum einen der neurodegenerativen Pathologie von Patienten mit progredienter MS und zum anderen des Wirkmechanismus der anti-glutamatergen Therapie [186].

Neben einer direkten Blockade der glutamatergen Transmission wäre auch ein früherer Eingriff in die Pathogenese denkbar, beispielweise über die Inhibition entzündlicher Mediatoren wie TNF- α . So führt der TNF- α -Antagonist Etanercept in Mäusen mit EAE nach intrathekaler Applikation zu einer Normalisierung der exzitatorischen postsynaptischen Ströme striataler Neurone [187]. TNF- α ist dabei eigentlich ein potentes pro-inflammatorisches Zytokin, von dem aber unter bestimmten Umständen auch eine anti-inflammatorische Wirkung ausgehen kann [188, 189]. Therapieversuche von MS-Patienten mit anti-TNF- α -Antikörpern zeigten zudem keine Verbesserung der neurologischen Symptomatik, sondern schienen sogar die Krankheitsaktivität zu steigern [190]. Diese ungewollten pro-inflammat-

rischen Effekte sind möglicherweise das Resultat der unselektiven Antagonisierung von TNF- α , wodurch auch anti-inflammatorische Signalwege gehemmt werden [191]. Eine selektive Modulation der TNF- α -Rezeptoren könnte hingegen diese Problematik umgehen [191].

Auch die Stabilisierung des Zytoskeletts von Dendriten könnte eine Interventionsmöglichkeit darstellen. Eine Zielstruktur könnte dabei die Rho-Kinase (ROCK) sein [192]. Die ROCK ist ein Effektor des kleinen G-Proteins Rho, welchem ein maßgeblicher stabilisierender Einfluss auf Dendriten zugesprochen wird [193]. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass die Antagonisierung von ROCK in der Lage ist, die Retraktion neuronaler Zellfortsätze zu verhindern [194]. Möglicherweise ist dieser Effekt auf die ROCK-abhängige Phosphorylierung von MAP-2 zurückzuführen, welche den stabilisierenden Einfluss von MAP-2 auf Mikrotubuli behindert [195] und dadurch eine Destabilisierung des Zytoskeletts bedingen könnte. Eine Stimulation des Rho/ROCK-Signalweges wäre beispielsweise in Folge einer Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren möglich [171]. ROCK-Inhibitoren wie Fasudil [196] oder das Derivat FSD-C10 [197] sind dabei in der Lage, den klinischen Verlauf im EAE-Modell positiv zu beeinflussen und das Ausmaß der Entzündung zu reduzieren. Es ist hervorzuheben, dass die ROCK durch ihre grundlegende Funktion in der Organisation des Zytoskeletts in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert ist und unter anderem auch für die Zellmigration sowie für die Phagozytose benötigt wird [198]. Inwieweit die Antagonisierung von ROCK in der EAE einen direkten stabilisierenden Einfluss auf Dendriten hat, muss sich in der Zukunft noch zeigen. Zudem sind Interventionen, die in grundlegende zelluläre Prozesse eingreifen, wie der Rho/ROCK-Signalweg oder auch der zuvor besprochene Notch-Signalweg, kritisch bezüglich unerwünschter Nebeneffekte zu prüfen. Daher ist anzunehmen, dass Maßnahmen, die den auslösenden Mechanismus adressieren, eine bessere Alternative darstellen, wie beispielsweise die Inhibition phagozytischer Zellen.

Um besser einschätzen zu können, inwiefern eine solche Intervention die in dieser Arbeit beobachtete Pathologie beeinflussen kann, muss jedoch zunächst der Pathomechanismus besser verstanden sein. Ein essentieller Punkt wird die Evaluation des Ausmaßes sein, in dem es zur Phagozytose von dendritischem Material kommt. Eine Interventionsmöglichkeit wäre die Inhibition des Kolonie-stimulierenden Faktor-1 Rezeptors (CSF1R), welcher eine

essentielle Rolle in der Entwicklung und Stimulation von Mikroglia und Makrophagen spielt [199, 200]. Die Blockade dieses Rezeptors hemmt die Infiltration von Makrophagen, die Proliferation von Mikroglia und reduziert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [201, 133]. In einem Mausmodell für Schädel-Hirn-Trauma konnte gezeigt werden, dass die Antagonisierung des CSF1R die Schädigung von Dendriten reduziert [177]. Gleichzeitig lindert die CSF1R-Inhibition auch die Symptome im EAE-Modell, sowohl während der akuten Erkrankung als auch bei späterem Therapiebeginn im chronischen Verlauf [201]. Im kortikalen MS-Modell konnte unsere Arbeitsgruppe zudem zeigen, dass die Inhibition des CSF1R auch den Phagozyten-medierten Verlust von Synapsen verhindern kann [133]. Sollte sich in nachfolgenden Experimenten für die Schädigung der Dendriten im EAE-Modell ebenfalls eine Phagozyten-abhängige Pathogenese abzeichnen, wäre die Blockade des CSF1R sicherlich eine vielversprechende Therapieoption.

6 Schlussfolgerung

Die Pathologie der grauen Substanz ist ein zentrales histopathologisches Merkmal von Patienten mit progredienter MS [26]. Unter anderem zeigt sich ein substantieller anhaltender Verlust von Synapsen in der grauen Substanz, auch außerhalb von Läsionen [65, 64]. Die Abbildung dieser pathologischen Eigenschaften in Tiermodellen bleibt auf Einzelaspekte limitiert und grundlegende Fragen, beispielsweise nach dem Ursprung dieser Schädigung, sind unbeantwortet.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass es in Läsionen der MOG-EAE zu einer Schädigung von Dendriten der spinalen weißen Substanz kommt, wobei die Dichte der Synapsen an diesen Dendriten weitgehend unverändert bleibt. Diese Form der Dendritenschädigung ist bisher in der MS nicht beschrieben und über die Funktion der Dendriten, die sich in der weißen Substanz des Rückenmarks befinden, ist wenig bekannt. Eine funktionelle Bedeutung ist dennoch naheliegend, insbesondere, da ein großer Teil dieser Dendriten Motoneuronen entspringt [116]. Auf jeden Fall trägt der Untergang dieser Dendritenabschnitte über den damit einhergehenden Verlust von Synapsen zu der Deafferenzierung spinaler Motoneurone bei und stellt mutmaßlich ein Hindernis für die Regeneration synaptischer Kontakte dar.

Interessant wäre, inwieweit diese Form der Neurodegeneration auch Teil der Pathologie der progredienten MS ist. Dabei ist es denkbar, dass die Schädigung von Dendriten sowohl einen Teil der spinalen Pathologie ausmacht als auch eine allgemeine Veränderung in der geschädigten grauen Substanz darstellt und mit zu der zu beobachtenden Atrophie beiträgt.

Um zu klären, inwiefern die dendritische Pathologie sich auch als therapeutischer Ansatzpunkt eignet, bedarf es zunächst eines besseren pathomechanistischen Verständnisses. Hierzu sind Interventionen in den zuvor besprochenen Signalwegen wie dem Rho/ROCK-

und Notch-Signalweg denkbar, wobei hier möglichst selektive Maßnahmen wünschenswert sind, beispielsweise über induzierbare Zelltyp-spezifische Knock-Outs der entsprechenden Zielgene. Aber auch die Evaluation, in welchem Ausmaß es zur exzitotoxischen oder phagozytischen Schädigung von Dendriten kommt, wäre sinnvoll um zu verstehen, ob diese Mechanismen eine isolierte Synapsen- oder eine kombinierte Synapsen- und Dendritenpathologie bedingen.

Literaturverzeichnis

- [1] Clare Walton, Rachel King, Lindsay Rechtman, Wendy Kaye, Emmanuelle Leray, Ruth Ann Marrie, Neil Robertson, Nicholas La Rocca, Bernard Uitdehaag, Ingrid van der Mei, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14):1816–1821, 2020.
- [2] Jakob Holstiege, Annika Steffen, Benjamin Goffrier, and Jörg Bätzing. Epidemiologie der Multiplen Sklerose – eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. *Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland*, 2017.
- [3] World Health Organization et al. Atlas: multiple sclerosis resources in the world 2008. 2008.
- [4] Nils Koch-Henriksen and Per Soelberg Sørensen. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology*, 9(5):520–532, 2010.
- [5] Alberto Ascherio and Kassandra L Munger. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention — an update. 36(02):103–114, 2016.
- [6] CJ Willer, DA Dymont, NJ Risch, AD Sadovnick, GC Ebers, Canadian Collaborative Study Group, et al. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22):12877–12882, 2003.
- [7] Sergio E Baranzini and Jorge R Oksenberg. The genetics of multiple sclerosis: from 0 to 200 in 50 years. *Trends in genetics*, 33(12):960–970, 2017.

- [8] AH Beecham, NA Patsopoulos, DK Xifara, MF Davis, A Kempainen, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 45(11):1353–1360, 2013.
- [9] Kyle Kai-How Farh, Alexander Marson, Jiang Zhu, Markus Kleinewietfeld, William J Housley, Samantha Beik, Noam Shosh, Holly Whitton, Russell JH Ryan, Alexander A Shishkin, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*, 518(7539):337–343, 2015.
- [10] John O Fleming and Thomas D Cook. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology*, 67(11):2085–2086, 2006.
- [11] Diane L Sewell, Emily K Reinke, Laura H Hogan, Matyas Sandor, and Zsuzsa Fabry. Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. *Immunology letters*, 82(1-2):101–110, 2002.
- [12] Evan L Thacker, Fariba Mirzaei, and Alberto Ascherio. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Annals of neurology*, 59(3):499–503, 2006.
- [13] Kjetil Bjornevik, Marianna Cortese, Brian C Healy, Jens Kuhle, Michael J Mina, Yumei Leng, Stephen J Elledge, David W Niebuhr, Ann I Scher, Cassandra L Munger, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578):296–301, 2022.
- [14] Judith A James, John B Harley, and R Hal Scofield. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*, 18(5):462–467, 2006.
- [15] Sabine Cepok, Dun Zhou, Rajneesh Srivastava, Stefan Nessler, Susanne Stei, Konrad Büssow, Norbert Sommer, Bernhard Hemmer, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 115(5):1352–1360, 2005.
- [16] Andreas Lossius, Jorunn N Johansen, Frode Vartdal, Harlan Robins, Benth Jūratė Šaltytė, Trygve Holmøy, and Johanna Olweus. High-throughput sequencing of

- TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+ T cells. *European journal of immunology*, 44(11):3439–3452, 2014.
- [17] Kenneth H Rand, Herbert Houck, Nancy D Denslow, and Kenneth M Heilman. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) associated oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 173(1):32–39, 2000.
- [18] Tobias V Lanz, R Camille Brewer, Peggy P Ho, Jae-Seung Moon, Kevin M Jude, Daniel Fernandez, Ricardo A Fernandes, Alejandro M Gomez, Gabriel-Stefan Nadj, Christopher M Bartley, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*, 603(7900):321–327, 2022.
- [19] Heather LE Lang, Helle Jacobsen, Shinji Ikemizu, Christina Andersson, Karl Harlos, Lars Madsen, Peter Hjorth, Leif Sondergaard, Arne Svejgaard, Kai Wucherpfennig, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nature immunology*, 3(10):940–943, 2002.
- [20] Tilman Schneider-Hohendorf, Lisa Ann Gerdes, Béatrice Pignolet, Rachel Gittelman, Patrick Ostkamp, Florian Rubelt, Catarina Raposo, Björn Tackenberg, Marianne Riepenhausen, Claudia Janoschka, et al. Broader Epstein-Barr virus-specific T cell receptor repertoire in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 219(11), 2022.
- [21] Bernhard Hemmer, Martin Kerschensteiner, and Thomas Korn. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 14(4):406–419, 2015.
- [22] M Trojano, D Paolicelli, A Bellacosa, and S Cataldo. The transition from relapsing-remitting MS to irreversible disability: clinical evaluation. *Neurological sciences*, 24(5):268–270, 2003.
- [23] David H Miller and Siobhan M Leary. Primary-progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 6(10):903–912, 2007.

- [24] Christian Confavreux, Sandra Vukusic, Thibault Moreau, and Patrice Adeleine. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 343(20):1430–1438, 2000.
- [25] BG Weinshenker, D Bulman, W Carriere, J Baskerville, and GC Ebers. A comparison of sporadic and familial multiple sclerosis. *Neurology*, 40(9):1354–1354, 1990.
- [26] Adrian-Minh Schumacher, Christoph Mahler, and Martin Kerschensteiner. Pathologie und Pathogenese der progredienten Multiplen Sklerose: Konzepte und Kontroversen. *Aktuelle Neurologie*, 44(07):476–488, 2017.
- [27] Orhun H Kantarci, Christine Lebrun, Aksel Siva, Mark B Keegan, Christina J Azevedo, Matilde Inglese, Mar Tintoré, Braeden D Newton, Françoise Durand-Dubief, Maria Pia Amato, et al. Primary progressive multiple sclerosis evolving from radiologically isolated syndrome. *Annals of neurology*, 79(2):288–294, 2016.
- [28] Hans Lassmann, Wolfgang Brück, and Claudia F Lucchinetti. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology*, 17(2):210–218, 2007.
- [29] Wolfgang Brück, Phyllis Porada, Sigrid Poser, Peter Rieckmann, Folker Hanefeld, Hans A Kretzschmarch, and Hans Lassmann. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 38(5):788–796, 1995.
- [30] Christina Marik, Paul A Felts, Jan Bauer, Hans Lassmann, and Kenneth J Smith. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? *Brain*, 130(11):2800–2815, 2007.
- [31] JW Prineas, RO Barnard, EE Kwon, LR Sharer, and E-S Cho. Multiple sclerosis: Remyelination of nascent lesions. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 33(2):137–151, 1993.

- [32] Josa M Frischer, Stephen D Weigand, Yong Guo, Nilufer Kale, Joseph E Parisi, Istvan Pirko, Jay Mandrekar, Stephan Bramow, Imke Metz, Wolfgang Brück, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Annals of neurology*, 78(5):710–721, 2015.
- [33] John W Prineas, Eunice E Kwon, Eun-Sook Cho, Leroy R Sharer, Michael H Barnett, Emilia L Oleszak, Brad Hoffman, and Bryan P Morgan. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 50(5):646–657, 2001.
- [34] Martina Absinta, Pascal Sati, Matthew Schindler, Emily C Leibovitch, Joan Ohayon, Tianxia Wu, Alessandro Meani, Massimo Filippi, Steven Jacobson, Irene CM Cortese, et al. Persistent 7-tesla phase rim predicts poor outcome in new multiple sclerosis patient lesions. *The Journal of clinical investigation*, 126(7):2597–2609, 2016.
- [35] Peter Patrikios, Christine Stadelmann, Alexandra Kutzelnigg, Helmut Rauschka, Manfred Schmidbauer, Henning Laursen, Per Soelberg Sorensen, Wolfgang Brück, Claudia Lucchinetti, and Hans Lassmann. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*, 129(12):3165–3172, 2006.
- [36] T Goldschmidt, J Antel, FB König, W Brück, and T Kuhlmann. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology*, 72(22):1914–1921, 2009.
- [37] FJ Sim, GL Hinks, and RJM Franklin. The re-expression of the homeodomain transcription factor Gtx during remyelination of experimentally induced demyelinating lesions in young and old rat brain. *Neuroscience*, 100(1):131–139, 2000.
- [38] Simon A Shields, Jennifer M Gilson, William F Blakemore, and Robin JM Franklin. Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination. *Glia*, 28(1):77–83, 1999.
- [39] WM Carroll, AR Jennings, and LJ Ironside. Identification of the adult resting progenitor cell by autoradiographic tracking of oligodendrocyte precursors in experimental CNS demyelination. *Brain*, 121(2):293–302, 1998.

- [40] Jacques Penderis, Simon A Shields, and Robin JM Franklin. Impaired remyelination and depletion of oligodendrocyte progenitors does not occur following repeated episodes of focal demyelination in the rat central nervous system. *Brain*, 126(6):1382–1391, 2003.
- [41] Anna Setzu, Justin D Lathia, Chao Zhao, Karen Wells, Mahendra S Rao, Charles Ffrench-Constant, and Robin JM Franklin. Inflammation stimulates myelination by transplanted oligodendrocyte precursor cells. *Glia*, 54(4):297–303, 2006.
- [42] Mark R Kotter, Chao Zhao, Nico van Rooijen, and Robin JM Franklin. Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. *Neurobiology of disease*, 18(1):166–175, 2005.
- [43] Alexandra Kutzelnigg and Hans Lassmann. Cortical demyelination in multiple sclerosis: a substrate for cognitive deficits? *Journal of the neurological sciences*, 245(1-2):123–126, 2006.
- [44] John W Peterson, Lars Bö, Sverre Mörk, Ansi Chang, and Bruce D Trapp. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, 50(3):389–400, 2001.
- [45] Alexandra Kutzelnigg, Claudia F Lucchinetti, Christine Stadelmann, Wolfgang Brück, Helmut Rauschka, Markus Bergmann, Manfred Schmidbauer, Joseph E Parisi, and Hans Lassmann. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 128(11):2705–2712, 2005.
- [46] Roberta Magliozzi, Owain Howell, Abhilash Vora, Barbara Serafini, Richard Nicholas, Maria Puopolo, Richard Reynolds, and Francesca Aloisi. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*, 130(4):1089–1104, 2007.
- [47] Owain W Howell, Cheryl A Reeves, Richard Nicholas, Daniele Carassiti, Bishan Radotra, Steve M Gentleman, Barbara Serafini, Francesca Aloisi, Federico Roncaroli,

- Roberta Magliozzi, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*, 134(9):2755–2771, 2011.
- [48] Jack van Horsen, Bianca P Brink, Helga E de Vries, Paul van der Valk, and Lars Bø. The blood-brain barrier in cortical multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuro-pathology & Experimental Neurology*, 66(4):321–328, 2007.
- [49] Francesca Aloisi and Ricardo Pujol-Borrell. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, 6(3):205–217, 2006.
- [50] Edgar Meinl, Markus Krumbholz, and Reinhard Hohlfeld. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of Neurology*, 59(6):880–892, 2006.
- [51] Maria Rita Piras, Immacolata Magnano, Edoardo Domenico Giorgio Canu, Kai Stephan Paulus, Wanda Maria Satta, A Soddu, Maurizio Conti, Antonio Achene, G Solinas, and I Aiello. Longitudinal study of cognitive dysfunction in multiple sclerosis: neuropsychological, neuroradiological, and neurophysiological findings. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(7):878–885, 2003.
- [52] Marco Rovaris, Massimo Filippi, Luca Minicucci, Giuseppe Iannucci, Giuseppe Santuccio, Francesca Possa, and Giancarlo Comi. Cortical/subcortical disease burden and cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *American Journal of Neuroradiology*, 21(2):402–408, 2000.
- [53] Elena Herranz, Costanza Giannì, Céline Louapre, Constantina A Treaba, Sindhuja T Govindarajan, Russell Ouellette, Marco L Loggia, Jacob A Sloane, Nancy Madigan, David Izquierdo-Garcia, et al. Neuroinflammatory component of gray matter pathology in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 80(5):776–790, 2016.
- [54] CJA De Groot, E Bergers, W Kamphorst, R Ravid, CH Polman, F Barkhof, and P Van der Valk. Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions:

- increased yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. *Brain*, 124(8):1635–1645, 2001.
- [55] H Lassmann. The architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathology and applied neurobiology*, 37(7):698–710, 2011.
- [56] Regina Schlaeger, Nico Papinutto, Valentina Panara, Carolyn Bevan, Iryna V Lobach, Monica Bucci, Eduardo Caverzasi, Jeffrey M Gelfand, Ari J Green, Keshi M Jordan, et al. Spinal cord gray matter atrophy correlates with multiple sclerosis disability. *Annals of neurology*, 76(4):568–580, 2014.
- [57] Sonia Batista, Robert Zivadinov, Marietta Hoogs, Niels Bergsland, Mari Heininen-Brown, Michael G Dwyer, Bianca Weinstock-Guttman, and Ralph HB Benedict. Basal ganglia, thalamus and neocortical atrophy predicting slowed cognitive processing in multiple sclerosis. *Journal of neurology*, 259(1):139–146, 2012.
- [58] V Popescu, R Klaver, P Voorn, Y Galis-de Graaf, DL Knol, JWR Twisk, A Versteeg, GJ Schenk, P Van der Valk, F Barkhof, et al. What drives MRI-measured cortical atrophy in multiple sclerosis? *Multiple Sclerosis Journal*, 21(10):1280–1290, 2015.
- [59] Timm Oberwahrenbrock, Sven Schippling, Marius Ringelstein, Falko Kaufhold, Hanna Zimmermann, Nazmiye Keser, Kim Lea Young, Jens Harmel, Hans-Peter Hartung, Roland Martin, et al. Retinal damage in multiple sclerosis disease subtypes measured by high-resolution optical coherence tomography. *Multiple sclerosis international*, 2012, 2012.
- [60] Shiv Saidha, Omar Al-Louzi, John N Ratchford, Pavan Bhargava, Jiwon Oh, Scott D Newsome, Jerry L Prince, Dzung Pham, Snehashis Roy, Peter Van Zijl, et al. Optical coherence tomography reflects brain atrophy in multiple sclerosis: a four-year study. *Annals of neurology*, 78(5):801–813, 2015.
- [61] Nabil K El Ayoubi, Stephanie Ghassan, Marianne Said, Joelle Allam, Hala Darwish,

- and Samia J Khoury. Retinal measures correlate with cognitive and physical disability in early multiple sclerosis. *Journal of neurology*, 263(11):2287–2295, 2016.
- [62] Elena H Martinez-Lapiscina, Sam Arnow, James A Wilson, Shiv Saidha, Jana Lizrova Preiningerova, Timm Oberwahrenbrock, Alexander U Brandt, Luis E Pablo, Simone Guerrieri, Ines Gonzalez, et al. Retinal thickness measured with optical coherence tomography and risk of disability worsening in multiple sclerosis: a cohort study. *The Lancet Neurology*, 15(6):574–584, 2016.
- [63] Marco Vercellino, Stella Marasciulo, Silvia Grifoni, Elena Vallino-Costassa, Chiara Bosa, Maria Barbara Pasanisi, Paola Crociara, Cristina Casalone, Adriano Chiò, Maria Teresa Giordana, et al. Acute and chronic synaptic pathology in multiple sclerosis gray matter. *Multiple Sclerosis Journal*, 28(3):369–382, 2022.
- [64] Monika Albert, Alonso Barrantes-Freer, Melanie Lohrberg, Jack P Antel, John W Prineas, Miklós Palkovits, Joachim R Wolff, Wolfgang Brück, and Christine Stadelmann. Synaptic pathology in the cerebellar dentate nucleus in chronic multiple sclerosis. *Brain Pathology*, 27(6):737–747, 2017.
- [65] Tanja Jürgens, Mehrnoosh Jafari, Mario Kreutzfeldt, Erik Bahn, Wolfgang Brück, Martin Kerschensteiner, and Doron Merkler. Reconstruction of single cortical projection neurons reveals primary spine loss in multiple sclerosis. *Brain*, 139(1):39–46, 2016.
- [66] Iliana Michailidou, Janske GP Willems, Evert-Jan Kooi, Corbert van Eden, Stefan M Gold, Jeroen JG Geurts, Frank Baas, Inge Huitinga, and Valeria Ramaglia. Complement C1q-C3-associated synaptic changes in multiple sclerosis hippocampus. *Annals of neurology*, 77(6):1007–1026, 2015.
- [67] Mario Kreutzfeldt, Andreas Bergthaler, Marylise Fernandez, Wolfgang Brück, Karin Steinbach, Mariann Vorm, Roland Coras, Ingmar Blümcke, Weldy V Bonilla, Anne Fleige, et al. Neuroprotective intervention by interferon- γ blockade prevents

- CD8+ T cell-mediated dendrite and synapse loss. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10):2087–2103, 2013.
- [68] Guang Yang, Christopher N Parkhurst, Scott Hayes, and Wen-Biao Gan. Peripheral elevation of TNF- α leads to early synaptic abnormalities in the mouse somatosensory cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25):10306–10311, 2013.
- [69] Alan J Thompson, Brenda L Banwell, Frederik Barkhof, William M Carroll, Timothy Coetzee, Giancarlo Comi, Jorge Correale, Franz Fazekas, Massimo Filippi, Mark S Freedman, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 17(2):162–173, 2018.
- [70] Jonathan O Harris, Joseph A Frank, Nicholas Patronas, Dale E McFarlin, and Henry F McFarland. Serial gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging scans in patients with early, relapsing-remitting multiple sclerosis: implications for clinical trials and natural history. *Annals of Neurology*, 29(5):548–555, 1991.
- [71] Maria Pia Sormani and Paolo Bruzzi. MRI lesions as a surrogate for relapses in multiple sclerosis: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet Neurology*, 12(7):669–676, 2013.
- [72] Daniel S. Reich, Claudia F. Lucchinetti, and Peter A. Calabresi. Multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 378(2):169–180, 2018.
- [73] Daniel Ontaneda, Alan J Thompson, Robert J Fox, and Jeffrey A Cohen. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *The Lancet*, 389(10076):1357–1366, 2017.
- [74] Caterina Mainero, T Benner, A Radding, A Van Der Kouwe, R Jensen, BR Rosen, and RP Kinkel. In vivo imaging of cortical pathology in multiple sclerosis using ultra-high field MRI. *Neurology*, 73(12):941–948, 2009.
- [75] Unsong Oh, Masahiro Fujita, Vasiliki N Ikonomidou, Iordanis E Evangelou, Eiji Matsuura, Erin Harberts, Joan Ohayon, Victor W Pike, Yi Zhang, Sami S Zoghbi,

- et al. Translocator protein PET imaging for glial activation in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 6(3):354–361, 2011.
- [76] Xavier Montalban, Stephen L Hauser, Ludwig Kappos, Douglas L Arnold, Amit Bar-Or, Giancarlo Comi, Jerome De Seze, Gavin Giovannoni, Hans-Peter Hartung, Bernhard Hemmer, et al. Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 376(3):209–220, 2017.
- [77] Raju Kapoor, Julian Furby, Thomas Hayton, Kenneth J Smith, Daniel R Altmann, Robert Brenner, Jeremy Chataway, Richard AC Hughes, and David H Miller. Lamotrigine for neuroprotection in secondary progressive multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *The Lancet Neurology*, 9(7):681–688, 2010.
- [78] Lahar R Mehta, Michael P McDermott, Andrew D Goodman, and Steven R Schwid. A randomized trial of memantine as treatment for spasticity in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 16(2):248–251, 2010.
- [79] Laure Peyro Saint Paul, Christian Creveuil, Olivier Heinzlef, Jerome De Seze, Patrick Vermersch, Giovanni Castelnovo, Philippe Cabre, Marc Debouverie, Bruno Brochet, Benoit Dupuy, et al. Efficacy and safety profile of memantine in patients with cognitive impairment in multiple sclerosis: A randomized, placebo-controlled study. *Journal of the neurological sciences*, 363:69–76, 2016.
- [80] Jeremy Chataway, Floriana De Angelis, Peter Connick, Richard A Parker, Domenico Plantone, Anisha Doshi, Nevin John, Jonathan Stutters, David MacManus, Ferran Prados Carrasco, et al. Efficacy of three neuroprotective drugs in secondary progressive multiple sclerosis (MS-SMART): a phase 2b, multiarm, double-blind, randomised placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 19(3):214–225, 2020.
- [81] John Zajicek, Susan Ball, David Wright, Jane Vickery, Andrew Nunn, David Miller, Mayam Gomez Cano, David MacManus, Sharukh Mallik, Jeremy Hobart, et al. Effect

- of dronabinol on progression in progressive multiple sclerosis (CUPID): a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 12(9):857–865, 2013.
- [82] Bruce AC Cree, Gary Cutter, Jerry S Wolinsky, Mark S Freedman, Giancarlo Comi, Gavin Giovannoni, Hans-Peter Hartung, Douglas Arnold, Jens Kuhle, Valerie Block, et al. Safety and efficacy of MD1003 (high-dose biotin) in patients with progressive multiple sclerosis (SPI2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology*, 19(12):988–997, 2020.
- [83] S Briken, SM Gold, S Patra, E Vettorazzi, D Harbs, Alexander Tallner, G Ketels, KH Schulz, and C Heesen. Effects of exercise on fitness and cognition in progressive MS: a randomized, controlled pilot trial. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(3):382–390, 2014.
- [84] Reinhard Hohlfeld and Hartmut Wekerle. Immunological update on multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*, 14(3):299–304, 2001.
- [85] Manuel A Friese, Xavier Montalban, Nick Willcox, John I Bell, Roland Martin, and Lars Fugger. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain*, 129(8):1940–1952, 2006.
- [86] KP Johnson, BR Brooks, JA Cohen, CC Ford, J Goldstein, RP Lisak, LW Myers, HS Panitch, JW Rose, RB Schiffer, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*, 45(7):1268–1276, 1995.
- [87] David H Miller, Omar A Khan, William A Sheremata, Lance D Blumhardt, George PA Rice, Michele A Libonati, Allison J Willmer-Hulme, Catherine M Dalton, Katherine A Miszkiel, and Paul W O’Connor. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 348(1):15–23, 2003.
- [88] Bert A’t Hart, Marjan van Meurs, Herbert PM Brok, Luca Massacesi, Jan Bauer, Louis Boon, Ronald E Bontrop, and Jon D Laman. A new primate model for multiple sclerosis in the common marmoset. *Immunology today*, 21(6):290–297, 2000.

- [89] Ralf Gold, Christopher Linington, and Hans Lassmann. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129(8):1953–1971, 2006.
- [90] Elvin A Kabat, Abner Wolf, Ada E Bezer, and Jean P Murray. Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *The Journal of experimental medicine*, 93(6):615, 1951.
- [91] T Yasuda, T Tsumita, Y Nagai, E Mitsuzawa, and S Ohtani. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice. I. Induction of EAE with mouse spinal cord homogenate and myelin basic protein. *The Japanese journal of experimental medicine*, 45(5):423–427, 1975.
- [92] Gurumoorthy Krishnamoorthy and Hartmut Wekerle. EAE: an immunologist’s magic eye. *European journal of immunology*, 39(8):2031–2035, 2009.
- [93] Itzhack Mendel, Nicole Kerlero de Rosbo, and Avraham Ben-Nun. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor $V\beta$ expression of encephalitogenic T cells. *European journal of immunology*, 25(7):1951–1959, 1995.
- [94] Markus Kipp, Stella Nyamoya, Tanja Hochstrasser, and Sandra Amor. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathology*, 27(2):123–137, 2017.
- [95] Sandra Amor, Paul A Smith, Bert’t Hart, and David Baker. Biozzi mice: of mice and human neurological diseases. *Journal of neuroimmunology*, 165(1-2):1–10, 2005.
- [96] Avraham Ben-Nun, Hartmut Wekerle, and Irun R Cohen. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*, 11(3):195–199, 1981.
- [97] Hanspeter Waldner, Matthew J Whitters, Raymond A Sobel, Mary Collins, and Vijay K Kuchroo. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system

- in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7):3412–3417, 2000.
- [98] G Biozzi, C Stiffel, D Mouton, Y Bouthillier, and C Decreusefond. Cytodynamics of the immune response in two lines of mice genetically selected for “high” and “low” antibody synthesis. *The Journal of experimental medicine*, 135(5):1071–1094, 1972.
- [99] D Baker, JK O’neill, SE Gschmeissner, CE Wilcox, C Butter, and JL Turk. Induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in biozzi mice. *Journal of neuroimmunology*, 28(3):261–270, 1990.
- [100] Sarah Al-Izki, Gareth Pryce, Janet K O’Neill, Colin Butter, Gavin Giovannoni, Sandra Amor, and David Baker. Practical guide to the induction of relapsing progressive experimental autoimmune encephalomyelitis in the Biozzi ABH mouse. *Multiple sclerosis and related disorders*, 1(1):29–38, 2012.
- [101] Gareth Pryce, Janet K O’Neill, J Ludovic Croxford, Sandra Amor, Deborah J Hankey, Emma East, Gavin Giovannoni, and David Baker. Autoimmune tolerance eliminates relapses but fails to halt progression in a model of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 165(1-2):41–52, 2005.
- [102] Sarah Al-Izki, Gareth Pryce, Samuel J Jackson, Gavin Giovannoni, and David Baker. Immunosuppression with FTY720 is insufficient to prevent secondary progressive neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Multiple Sclerosis Journal*, 17(8):939–948, 2011.
- [103] JK O’neill, D Baker, AN Davidson, SJ Allen, C Butter, H Waldmann, and JL Turk. Control of immune-mediated disease of the central nervous system with monoclonal (CD4-specific) antibodies. *Journal of neuroimmunology*, 45(1-2):1–14, 1993.
- [104] Eseberuo Sefia, Gareth Pryce, Ute-Christiane Meier, Gavin Giovannoni, and David Baker. Depletion of CD20 B cells fails to inhibit relapsing mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Multiple sclerosis and related disorders*, 14:46–50, 2017.

- [105] Sandra Amor, Nigel Groome, Christopher Linington, Margaret M Morris, Klaus Dornmair, Minnetta V Gardinier, Jean-Marie Matthieu, and David Baker. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *The Journal of Immunology*, 153(10):4349–4356, 1994.
- [106] Patrick Amiguet, Minnetta V Gardinier, Jean-Pierre Zanetta, and Jean-Marie Matthieu. Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Journal of neurochemistry*, 58(5):1676–1682, 1992.
- [107] Melania Spadaro, Stephan Winklmeier, Eduardo Beltrán, Caterina Macrini, Romana Höftberger, Elisabeth Schuh, Franziska S Thaler, Lisa Ann Gerdes, Sarah Laurent, Ramona Gerhards, et al. Pathogenicity of human antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Annals of neurology*, 84(2):315–328, 2018.
- [108] Mattias Bronge, Sabrina Ruhrmann, Claudia Carvalho-Queiroz, Ola B Nilsson, Andreas Kaiser, Erik Holmgren, Caterina Macrini, Stephan Winklmeier, Edgar Meinl, Lou Brundin, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein revisited – sensitive detection of MOG-specific T-cells in multiple sclerosis. *Journal of autoimmunity*, 102:38–49, 2019.
- [109] Phuc T. Dang, Quyen Bui, Claretta S. D’Souza, and Jacqueline M. Orian. *Modelling MS: Chronic-Relapsing EAE in the NOD/Lt Mouse Strain*. Springer International Publishing, Cham, 2015.
- [110] Diego Centonze, Luca Muzio, Silvia Rossi, Francesca Cavasinni, Valentina De Chiara, Alessandra Bergami, Alessandra Musella, Marcello D’Amelio, Virve Cavallucci, Alessandro Martorana, et al. Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience*, 29(11):3442–3452, 2009.
- [111] Ivana Nikić, Doron Merkler, Catherine Sorbara, Mary Brinkoetter, Mario Kreutz-

- feldt, Florence M Bareyre, Wolfgang Brück, Derron Bishop, Thomas Misgeld, and Martin Kerschensteiner. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine*, 17(4):495–499, 2011.
- [112] Markus Kipp, Tim Clarner, Jon Dang, Sjeff Copray, and Cordian Beyer. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica*, 118(6):723–736, 2009.
- [113] Michael H Barnett and John W Prineas. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Annals of neurology*, 55(4):458–468, 2004.
- [114] Miriam Scheld, Bernhard Josef Rüter, René Große-Veldmann, Kim Ohl, Klaus Tenbrock, Daniela Dreytmüller, Petra Fallier-Becker, Adib Zendedel, Cordian Beyer, Tim Clarner, et al. Neurodegeneration triggers peripheral immune cell recruitment into the forebrain. *Journal of Neuroscience*, 36(4):1410–1415, 2016.
- [115] Charles Watson, George Paxinos, and Gulgun Kayalioglu. *The spinal cord: a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas*. Academic press, 2009.
- [116] PK Rose and FJR Richmond. White-matter dendrites in the upper cervical spinal cord of the adult cat: A light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology*, 199(2):191–203, 1981.
- [117] Jean Schoenen. Dendritic organization of the human spinal cord: the motoneurons. *Journal of Comparative Neurology*, 211(3):226–247, 1982.
- [118] RP Barber, PE Phelps, CR Houser, GD Crawford, PM Salvaterra, and JE Vaughn. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 229(3):329–346, 1984.
- [119] Joost CJ Bot, F Barkhof, CH Polman, GJ Lycklama à Nijeholt, V De Groot, E Bergers, HJ Ader, and JA Castelijns. Spinal cord abnormalities in recently diagnosed MS patients: added value of spinal MRI examination. *Neurology*, 62(2):226–233, 2004.

- [120] MA Rocca, MA Horsfield, S Sala, M Copetti, P Valsasina, S Mesaros, V Martinelli, D Caputo, T Stosic-Opincal, J Drulovic, et al. A multicenter assessment of cervical cord atrophy among MS clinical phenotypes. *Neurology*, 76(24):2096–2102, 2011.
- [121] Charidimos Tsagkas, Stefano Magon, Laura Gaetano, Simon Pezold, Yvonne Naegelin, Michael Amann, Christoph Stippich, Philippe Cattin, Jens Wuerfel, Oliver Bieri, et al. Spinal cord volume loss: a marker of disease progression in multiple sclerosis. *Neurology*, 91(4):349–358, 2018.
- [122] Regina Schlaeger, Nico Papinutto, Alyssa H Zhu, Iryna V Lobach, Carolyn J Bevan, Monica Bucci, Antonella Castellano, Jeffrey M Gelfand, Jennifer S Graves, Ari J Green, et al. Association between thoracic spinal cord gray matter atrophy and disability in multiple sclerosis. *JAMA neurology*, 72(8):897–904, 2015.
- [123] Hugh Kearney, David H Miller, and Olga Ciccarelli. Spinal cord MRI in multiple sclerosis – diagnostic, prognostic and clinical value. *Nature Reviews Neurology*, 11(6):327–338, 2015.
- [124] Dominique Eden, Charley Gros, Atef Badji, Sara M Dupont, Benjamin De Leener, Josefina Maranzano, Ren Zhuoquiong, Yaou Liu, Tobias Granberg, Russell Ouellette, et al. Spatial distribution of multiple sclerosis lesions in the cervical spinal cord. *Brain*, 142(3):633–646, 2019.
- [125] C Wegner, Margaret M Esiri, SA Chance, J Palace, and PM Matthews. Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology*, 67(6):960–967, 2006.
- [126] Hans Lassmann and Monika Bradl. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 133:223–244, 2017.
- [127] Eugene D Ponomarev, Leah P Shriver, Katarzyna Maresz, and Bonnie N Dittel. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *Journal of neuroscience research*, 81(3):374–389, 2005.

- [128] Johannes Vogt, Friedemann Paul, Orhan Aktas, Kathrin Müller-Wielsch, Jan Dörr, Susanne Dörr, B Suman Bharathi, Robert Glumm, Christoph Schmitz, Harry Steinbusch, et al. Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology*, 66(3):310–322, 2009.
- [129] Georgia Mandolesi, Antonietta Gentile, Alessandra Musella, Diego Fresegna, Francesca De Vito, Silvia Bullitta, Helena Sepman, Girolama A Marfia, and Diego Centonze. Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 11(12):711–724, 2015.
- [130] Julien Bourel, Vincent Planche, Nadège Dubourdiou, Aymeric Oliveira, Alexandra Séré, Eva-Gunnel Ducourneau, Marion Tible, Marlène Maitre, Thierry Lesté-Lasserre, Agnes Nadjjar, et al. Complement C3 mediates early hippocampal neurodegeneration and memory impairment in experimental multiple sclerosis. *Neurobiology of disease*, 160:105533, 2021.
- [131] Stefano Tambalo, Luca Peruzzotti-Jametti, Roberta Rigolio, Silvia Fiorini, Pietro Bontempi, Giulia Mallucci, Beatrice Balzarotti, Paola Marmioli, Andrea Sbarbati, Guido Cavaletti, et al. Functional magnetic resonance imaging of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals brain cortex remodeling. *Journal of Neuroscience*, 35(27):10088–10100, 2015.
- [132] Dmitri Lodygin, Moritz Hermann, Nils Schweingruber, Cassandra Flügel-Koch, Takashi Watanabe, Corinna Schlosser, Arianna Merlini, Henrike Körner, Hsin-Fang Chang, Henrike J Fischer, et al. β -Synuclein-reactive T cells induce autoimmune CNS grey matter degeneration. *Nature*, 566(7745):503–508, 2019.
- [133] Mehrnoosh Jafari, Adrian-Minh Schumacher, Nicolas Snaidero, Emily M Ullrich Gavalanes, Tradite Neziraj, Virág Kocsis-Jutka, Daniel Engels, Tanja Jürgens, Ingrid Wagner, Juan Daniel Flórez Weidinger, et al. Phagocyte-mediated synapse removal in cortical neuroinflammation is promoted by local calcium accumulation. *Nature Neuroscience*, 24(3):355–367, 2021.

- [134] Khairul-Bariah Abdul-Majid, Johan Jirholt, Christine Stadelmann, Andreas Stefferl, Peter Kjellén, Erik Wallström, Rikard Holmdahl, Hans Lassmann, Tomas Olsson, and Robert A Harris. Screening of several H-2 congenic mouse strains identified H-2q mice as highly susceptible to MOG-induced EAE with minimal adjuvant requirement. *Journal of neuroimmunology*, 111(1-2):23–33, 2000.
- [135] Stephan J Guyenet, Stephanie A Furrer, Vincent M Damian, Travis D Baughan, Albert R La Spada, and Gwenn A Garden. A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *Journal of Visualized Experiments*, (39):1787, 2010.
- [136] NW Dunham. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmacists Association*, 46:208–209, 1957.
- [137] BJ Jones and DJ Roberts. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(4):302–304, 1968.
- [138] MV Jones, TT Nguyen, CA Deboy, JW Griffin, KA Whartenby, DA Kerr, and PA Calabresi. Behavioral and pathological outcomes in MOG 35–55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 199(1-2):83–93, 2008.
- [139] Robert van den Berg, Jon D Laman, Marjan van Meurs, Rogier Q Hintzen, and Casper C Hoogenraad. Rotarod motor performance and advanced spinal cord lesion image analysis refine assessment of neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience methods*, 262:66–76, 2016.
- [140] Cory Teuscher, Janice Y Bunn, Parley D Fillmore, Russell J Butterfield, James F Zachary, and Elizabeth P Blankenhorn. Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis. *The American journal of pathology*, 165(5):1593–1602, 2004.

- [141] Beatriz G Pérez-Nievas, Borja García-Bueno, José LM Madrigal, and Juan C Leza. Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: mechanisms implicated. *Journal of neuro-inflammation*, 7(1):1–13, 2010.
- [142] Jane E Libbey, Daniel J Doty, Jordan T Sim, Matthew F Cusick, June L Round, and Robert S Fujinami. The effects of diet on the severity of central nervous system disease: One part of lab-to-lab variability. *Nutrition*, 32(7-8):877–883, 2016.
- [143] Ross M Kedl, John W Kappler, and Philippa Marrack. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Current opinion in immunology*, 15(1):120–127, 2003.
- [144] Frederique Wieters, Carolin Weiss Lucas, Matthias Gruhn, Ansgar Büschges, Gereon R Fink, and Markus Aswendt. Introduction to spasticity and related mouse models. *Experimental Neurology*, 335:113491, 2021.
- [145] SL Minden, D Frankel, L Hadden, J Perloff, KP Srinath, and DC Hoaglin. The Sonya Slifka longitudinal multiple sclerosis study: methods and sample characteristics. *Multiple Sclerosis Journal*, 12(1):24–38, 2006.
- [146] Gerwyn Morris, Michael Berk, Piotr Galecki, Ken Walder, and Michael Maes. The neuro-immune pathophysiology of central and peripheral fatigue in systemic immune-inflammatory and neuro-immune diseases. *Molecular neurobiology*, 53(2):1195–1219, 2016.
- [147] S. C. Gandevia. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiological Reviews*, 81(4):1725–1789, 2001.
- [148] Ingunn M Stromnes, Lauren M Cerretti, Denny Liggitt, Robert A Harris, and Joan M Goverman. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH 1 and TH 17 cells. *Nature medicine*, 14(3):337–342, 2008.
- [149] Hongwei Qin, Wen-I Yeh, Patrizia De Sarno, Andrew T Holdbrooks, Yudong Liu, Michelle T Muldowney, Stephanie L Reynolds, Lora L Yanagisawa, Thomas H Fox,

- Keun Park, et al. Signal transducer and activator of transcription-3/suppressor of cytokine signaling-3 (STAT3/SOCS3) axis in myeloid cells regulates neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13):5004–5009, 2012.
- [150] Mercedes Giralt, Raquel Ramos, Albert Quintana, Beatriz Ferrer, Maria Erta, Marco Castro-Freire, Gemma Comes, Elisenda Sanz, Mercedes Unzeta, Paula Pifarré, et al. Induction of atypical EAE mediated by transgenic production of IL-6 in astrocytes in the absence of systemic IL-6. *Glia*, 61(4):587–600, 2013.
- [151] Allen K Wensky, Glaucia C Furtado, Maria Cecilia Garibaldi Marcondes, Shaohua Chen, Denise Manfra, Sergio A Lira, David Zagzag, and Juan J Lafaille. IFN- γ determines distinct clinical outcomes in autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 174(3):1416–1423, 2005.
- [152] Roberta Brambilla, Paul D Morton, Jessica Jopek Ashbaugh, Shaffiat Karmally, Kate Lykke Lambertsen, and John R Bethea. Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia*, 62(3):452–467, 2014.
- [153] Vaishali A Kulkarni and Bonnie L Firestein. The dendritic tree and brain disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50(1):10–20, 2012.
- [154] Bing Zhu, Liqing Luo, GR Wayne Moore, Donald W Paty, and Max S Cynader. Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology*, 162(5):1639–1650, 2003.
- [155] Joshua B Melander, Aran Nayebi, Bart C Jongbloets, Dale A Fortin, Maozhen Qin, Surya Ganguli, Tianyi Mao, and Haining Zhong. Distinct in vivo dynamics of excitatory synapses onto cortical pyramidal neurons and parvalbumin-positive interneurons. *Cell reports*, 37(6):109972, 2021.
- [156] Jerry L Chen, Katherine L Villa, Jae Won Cha, Peter TC So, Yoshiyuki Kubota,

- and Elly Nedivi. Clustered dynamics of inhibitory synapses and dendritic spines in the adult neocortex. *Neuron*, 74(2):361–373, 2012.
- [157] Georgia Mandolesi, Alessandra Musella, Antonietta Gentile, Giorgio Grasselli, Nabila Haji, Helena Sepman, Diego Fresegna, Silvia Bullitta, Francesca De Vito, Gabriele Musumeci, et al. Interleukin-1 β alters glutamate transmission at purkinje cell synapses in a mouse model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 33(29):12105–12121, 2013.
- [158] Peter Werner, David Pitt, and Cedric S Raine. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Annals of neurology*, 50(2):169–180, 2001.
- [159] Radhika Srinivasan, Napapon Sailasuta, Ralph Hurd, Sarah Nelson, and Daniel Pelletier. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*, 128(5):1016–1025, 2005.
- [160] Sergio E Baranzini, Radhika Srinivasan, Pouya Khankhanian, Darin T Okuda, Sarah J Nelson, Paul M Matthews, Stephen L Hauser, Jorge R Oksenberg, and Daniel Pelletier. Genetic variation influences glutamate concentrations in brains of patients with multiple sclerosis. *Brain*, 133(9):2603–2611, 2010.
- [161] Christina J Azevedo, John Kornak, Philip Chu, Mehul Sampat, Darin T Okuda, Bruce A Cree, Sarah J Nelson, Stephen L Hauser, and Daniel Pelletier. In vivo evidence of glutamate toxicity in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 76(2):269–278, 2014.
- [162] Olatz Pampliega, María Domercq, Federico N Soria, Pablo Villoslada, Alfredo Rodríguez-Antigüedad, and Carlos Matute. Increased expression of cystine/glutamate antiporter in multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 8(1):1–12, 2011.
- [163] Kirsten S Evonuk, Brandi J Baker, Ryan E Doyle, Carson E Moseley, Christine M Sestero, Bryce P Johnston, Patrizia De Sarno, Andrew Tang, Igor Gembitsky, San-

- dra J Hewett, et al. Inhibition of system Xc-transporter attenuates autoimmune inflammatory demyelination. *The Journal of Immunology*, 195(2):450–463, 2015.
- [164] David Pitt, Iris E Nagelmeier, Heather C Wilson, and Cedric S Raine. Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology*, 61(8):1113–1120, 2003.
- [165] Marco Vercellino, Aristide Merola, Chiara Piacentino, Barbara Votta, Elisabetta Cappello, Giovanni Luigi Mancardi, Roberto Mutani, Maria Teresa Giordana, and Paola Cavalla. Altered glutamate reuptake in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis cortex: correlation with microglia infiltration, demyelination, and neuronal and synaptic damage. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 66(8):732–739, 2007.
- [166] A Castegna, L Palmieri, I Spera, V Porcelli, F Palmieri, Marzena J Fabis-Pedrini, RB Kean, DA Barkhouse, MT Curtis, and DC Hooper. Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Neuroscience*, 185:97–105, 2011.
- [167] Richard Macrez, Peter K Stys, Denis Vivien, Stuart A Lipton, and Fabian Docagne. Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: biomarker and therapeutic opportunities. *The Lancet Neurology*, 15(10):1089–1102, 2016.
- [168] A Musella, G Mandolesi, F Mori, A Gentile, and Diego Centonze. Linking synaptopathy and gray matter damage in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 22(2):146–149, 2016.
- [169] S Graber, S Maiti, and Shelley Halpain. Cathepsin B-like proteolysis and MARCKS degradation in sub-lethal NMDA-induced collapse of dendritic spines. *Neuropharmacology*, 47(5):706–713, 2004.
- [170] Adrienne L Andres, Limor Regev, Lucas Phi, Ronald R Seese, Yuncai Chen, Christine M Gall, and Tallie Z Baram. NMDA receptor activation and calpain contribute

- to disruption of dendritic spines by the stress neuropeptide CRH. *Journal of Neuroscience*, 33(43):16945–16960, 2013.
- [171] Yuka Kitaoka, Yasushi Kitaoka, Toshio Kumai, Tim T Lam, Kohei Kuribayashi, Kazuyuki Isenoumi, Yasunari Munemasa, Masamitsu Motoki, Shinichi Kobayashi, and Satoki Ueno. Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain research*, 1018(1):111–118, 2004.
- [172] Hollis Cline and Kurt Haas. The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. *The Journal of physiology*, 586(6):1509–1517, 2008.
- [173] Beth Stevens, Nicola J Allen, Luis E Vazquez, Gareth R Howell, Karen S Christopherson, Navid Nouri, Kristina D Micheva, Adrienne K Mehalow, Andrew D Huberman, Benjamin Stafford, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131(6):1164–1178, 2007.
- [174] Soyon Hong, Victoria F Beja-Glasser, Bianca M Nfonoyim, Arnaud Frouin, Shaomin Li, Saranya Ramakrishnan, Katherine M Merry, Qiaoqiao Shi, Arnon Rosenthal, Ben A Barres, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352(6286):712–716, 2016.
- [175] Jennetta W Hammond, Matthew J Bellizzi, Caroline Ware, Wen Q Qiu, Priyanka Saminathan, Herman Li, Shaopeiwen Luo, Stefanie A Ma, Yuanhao Li, and Harris A Gelbard. Complement-dependent synapse loss and microgliosis in a mouse model of multiple sclerosis. *Brain, behavior, and immunity*, 87:739–750, 2020.
- [176] Sebastian Werneburg, Jonathan Jung, Rejani B Kunjamma, Seung-Kwon Ha, Nicholas J Luciano, Cory M Willis, Guangping Gao, Natalia P Biscola, Leif A Havton, Stephen J Crocker, et al. Targeted complement inhibition at synapses prevents microglial synaptic engulfment and synapse loss in demyelinating disease. *Immunity*, 52(1):167–182, 2020.

- [177] Kristina G Witcher, Chelsea E Bray, Titikorn Chunchai, Fangli Zhao, Shane M O’Neil, Alan J Gordillo, Warren A Campbell, Daniel B McKim, Xiaoyu Liu, Julia E Dziabis, et al. Traumatic brain injury causes chronic cortical inflammation and neuronal dysfunction mediated by microglia. *Journal of Neuroscience*, 41(7):1597–1616, 2021.
- [178] Diana M Ho, Spyros Artavanis-Tsakonas, and Angeliki Louvi. The Notch pathway in CNS homeostasis and neurodegeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 9(1):e358, 2020.
- [179] Maciej Jurynczyk, Anna Jurewicz, Bartosz Bielecki, Cedric S Raine, and Krzysztof Selmaj. Inhibition of Notch signaling enhances tissue repair in an animal model of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 170(1-2):3–10, 2005.
- [180] Maciej Jurynczyk, Anna Jurewicz, Cedric S Raine, and Krzysztof Selmaj. Notch 3 inhibition in myelin-reactive T cells down-regulates protein kinase C theta and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 180(4):2634–2640, 2008.
- [181] Xue-Feng Ding, Xiang Gao, Xin-Chun Ding, Ming Fan, and Jinhui Chen. Postnatal dysregulation of Notch signal disrupts dendrite development of adult-born neurons in the hippocampus and contributes to memory impairment. *Scientific Reports*, 6(1):1–11, 2016.
- [182] Terence Smith, Anthony Groom, Bin Zhu, and Lechoslaw Turski. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nature medicine*, 6(1):62–66, 2000.
- [183] Carolyn Paul and Christopher Bolton. Modulation of blood-brain barrier dysfunction and neurological deficits during acute experimental allergic encephalomyelitis by then-methyl-d-aspartate receptor antagonist memantine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1):50–57, 2002.
- [184] Grzegorz Sulkowski, Beata Dąbrowska-Bouta, Małgorzata Chalimoniuk, and Lidia Strużyńska. Effects of antagonists of glutamate receptors on pro-inflammatory cyto-

- kines in the brain cortex of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 261(1-2):67–76, 2013.
- [185] Jeffrey A Cohen, Michelle H Cameron, Myla D Goldman, Andrew D Goodman, Aaron E Miller, Anne Rollins, Lily Llorens, Rajiv Patni, Robert Elfont, and Reed Johnson. A phase 3, double-blind, placebo-controlled efficacy and safety study of ADS-5102 (Amantadine) extended-release capsules in people with multiple sclerosis and walking impairment. *Multiple Sclerosis Journal*, 28(5):817–830, 2022.
- [186] Reinhard Hohlfeld and Martin Kerschensteiner. Antiglutamatergic therapy for multiple sclerosis? *The Lancet. Neurology*, 15(10):1003–1004, 2016.
- [187] Nabila Haji, Georgia Mandolesi, Antonietta Gentile, Lucia Sacchetti, Diego Fresegna, Silvia Rossi, Alessandra Musella, Helena Sepman, Caterina Motta, Valeria Studer, et al. TNF- α -mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Experimental neurology*, 237(2):296–303, 2012.
- [188] Junliang Liu, Michael W Marino, Grace Wong, Dianne Grail, Ashley Dunn, Jayaram Bettadapura, Anthony J Slavin, Lloyd Old, and Claude CA Bernard. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nature medicine*, 4(1):78–83, 1998.
- [189] George Kassiotis and George Kollias. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *The Journal of experimental medicine*, 193(4):427–434, 2001.
- [190] BW Van Oosten, F Barkhof, L Truyen, JB Boringa, FW Bertelsmann, BME Von Blomberg, JN Woody, H-P Hartung, and CH Polman. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*, 47(6):1531–1534, 1996.
- [191] Valentina Pegoretti, Wia Baron, Jon D Laman, and Ulrich LM Eisel. Selective modu-

- lation of TNF-TNFRs signaling: insights for multiple sclerosis treatment. *Frontiers in immunology*, 9:925, 2018.
- [192] Anthony J Koleske. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(8):536–550, 2013.
- [193] Zheng Li, Carlos D Aizenman, and Hollis T Cline. Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron*, 33(5):741–750, 2002.
- [194] Masaya Hirose, Toshimasa Ishizaki, Naoki Watanabe, Masayoshi Uehata, Onno Kraenenburg, Wouter H Moolenaar, Fumio Matsumura, Midori Maekawa, Haruhiko Bitto, and Shuh Narumiya. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *The Journal of cell biology*, 141(7):1625–1636, 1998.
- [195] Mutsuki Amano, Takako Kaneko, Akio Maeda, Masanori Nakayama, Masaaki Ito, Takashi Yamauchi, Hideyuki Goto, Yuko Fukata, Noriko Oshiro, Azusa Shinohara, et al. Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *Journal of neurochemistry*, 87(3):780–790, 2003.
- [196] Xiaojia Sun, Motozumi Minohara, Hitoshi Kikuchi, Takaaki Ishizu, Masahito Tanaka, Hua Piao, Manabu Osoegawa, Yasumasa Ohyagi, Hiroaki Shimokawa, and Jun-Ichi Kira. The selective Rho-kinase inhibitor Fasudil is protective and therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 180(1-2):126–134, 2006.
- [197] Yan-Hua Li, Chong Xie, Yuan Zhang, Xing Li, Hai-Fei Zhang, Qing Wang, Zhi Chai, Bao-Guo Xiao, Rodolfo Thome, Guang-Xian Zhang, et al. FSD-C10, a Fasudil derivative, promotes neuroregeneration through indirect and direct mechanisms. *Scientific reports*, 7(1):1–17, 2017.
- [198] Kirsi Riento and Anne J Ridley. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(6):446–456, 2003.

- [199] Violeta Chitu and E Richard Stanley. Regulation of embryonic and postnatal development by the CSF-1 receptor. *Current topics in developmental biology*, 123:229–275, 2017.
- [200] Monica RP Elmore, Allison R Najafi, Maya A Koike, Nabil N Dagher, Elizabeth E Spangenberg, Rachel A Rice, Masashi Kitazawa, Bernice Matusow, Hoa Nguyen, Brian L West, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*, 82(2):380–397, 2014.
- [201] Nellwyn Hagan, John L Kane, Deepak Grover, Lisa Woodworth, Charlotte Madore, Jacqueline Saleh, Jose Sancho, Jinyu Liu, Yi Li, Jonathan Proto, et al. CSF1R signaling is a regulator of pathogenesis in progressive MS. *Cell death & disease*, 11(10):1–25, 2020.

Danksagung

Zuallererst möchte ich Professor Martin Kerschensteiner meinen großen Dank aussprechen. Nicht nur für die Möglichkeit in seinem Labor an diesem Projekt arbeiten zu dürfen, sondern auch für die hervorragende Betreuung und Unterstützung die ich in dieser Zeit erfahren habe. Dabei war es vor allem die richtige Mischung aus Raum für eigene Gedanken um ein selbstständiges Arbeiten zu ermöglichen und richtungsweisendem Input, der das Projekt vorangetrieben hat.

Auch Christoph Mahler möchte ich in ähnlichem Maße danken, der das Projekt mit koordinierte, mir alle notwendigen Methoden lernte und jeden Tag für unzählige Fragen bereit stand.

Dass ich eine so gute Zeit in dem Labor hatte, liegt aber nicht nur an der guten Betreuung, sondern auch an der herausragenden Atmosphäre, zu der letztendlich jeder beigetragen hat. Im Besonderen möchte ich Saskia List danken, mit der ich viel Zeit zusammen verbracht habe. Aber auch Paula Sánchez, Jonas Lehmitz, Minh Schuhmacher, Yi-Heng Tai und allen anderen möchte ich danken. Sie waren mir alle nicht nur eine große Unterstützung sondern auch gute Freunde und ich habe die Zeit mit ihnen immer sehr genossen, egal ob im Labor, beim Wandern oder bei gemeinsamen Spieleabenden.

Bei Christoph Mahler, Saskia List und Adinda Wens möchte ich mich außerdem für das hilfreiche Feedback zu meiner Arbeit bedanken.

In kaum auszudrückendem Maße gilt mein Dank auch Isabel Bauer, die mir nicht nur als Freundin eine seelische Unterstützung war, sondern auch als fachkundige und grammatikalisch versierte Person meine Arbeit zahllose Male Korrekturlesen durfte. Schlussendlich muss ich an dieser Stelle auch Martin Kerschensteiner und Naoto Kawakami für die Entscheidung danken, das Zwei-Photonen-Mikroskop der AG Kawakami ins *Small Lab* zu

stellen. Ohne diese Entscheidung hätte ich Bella womöglich gar nicht erst kennengelernt.

Zu guter Letzt möchte ich auch meinen Eltern für all ihre Unterstützung und das sorgenfreie Leben danken, das ich dank ihnen genieße. Ohne sie wäre weder mein Studium noch meine Doktorarbeit in dieser Weise möglich gewesen. Dafür kann ich ihnen nicht genug danken.