

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

Aus dem Lehrstuhl Neuroanatomie

Institut für Anatomie

Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp

Protective Effekte von Siponimod in präklinischen Multiple Sklerose Tiermodellen

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN (Dr. med.)

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

vorgelegt von

Tudor Winzinger

aus

Iași

Rostock, 2023

Gutachter:

Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Anatomie

Prof. Dr. med. Dr. rer. med. Andreas Hermann, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurologie

Univ. Prof. Dr. rer. nat. Nicholas Schwab, Universitätsklinikum Münster, Klinik für Neurologie

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	1
II.	Danksagung	3
III.	Eidesstattliche Versicherung	4
IV.	Lebenslauf	5
V.	Thesen	7
1. Einleitung		
1.1.	Multiple Sklerose	8
1.1.1.	Klinische Verlaufsformen	8
1.1.2.	Hypothesen zur Pathogenese	9
1.1.3.	Pathologie	10
1.2.	Die Gliazellen des Zentralnervensystems in Multipler Sklerose	11
1.2.1.	Astrozyten	11
1.2.1.1.	Die Rolle von Astrozyten im Rahmen der Aufrechterhaltung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke	12
1.2.2.	Mikroglia	12
1.2.3.	Oligodendrozyten	13
1.2.4.	Ependymzellen	13
1.3.	Das Cuprizone-Modell	13
1.4.	Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	14
1.5.	Das Cuprizone/EAE Modell	14
1.6.	Siponimod	15
1.6.1.	Die Sphingosin-1-phosphat Rezeptoren	15
1.6.2.	Fingolimod	16
1.6.3.	Von Fingolimod zu Siponimod	17
1.7.	Hypothesen und Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	19
2. Material und Methoden		
2.1.	Puffer, Blockseren und Färbelösungen	20
2.2.	Versuchstiere	21
2.2.1.	Versuchsgruppen und Experimentelles Design	21
2.2.1.1.	Experiment 1	21
2.2.1.2.	Experiment 2 Teil 1	22
2.2.1.3.	Experiment 2 Teil 2	22
2.2.2.	Klinische Beurteilung der Mäuse (Scoring)	22
2.3.	Transkardiale Perfusion	23
2.4.	Paraffineinbettung und untersuchte Hirnregion	24
2.5.	Allgemeine Prinzipien der Färbungen	25
2.5.1.	Histologische Färbungen	26
2.5.1.1.	Hämatoxylin-Eosin Färbung	26
2.5.1.2.	Luxol-Fast-Blue/ Periodic-Acid-Schiff Färbung	28
2.5.2.	Immunhistochemische Färbungen	29
2.5.2.1.	Durchführung der immunhistochemischen Färbungen	30
2.6.	Beurteilung und Methoden der Auswertung	33
2.6.1.	Perivaskuläre Infiltrate (H&E Färbung)	33
2.6.2.	Myelinisierungsgrad des Corpus Callosum (LFB/PAS Färbung)	33
2.6.3.	Auswertung Immunohistochemie	34
2.6.3.1.	Demyelinisierung, Mikrogliose und Astrogliose basierend auf Dichtemessungen	34
2.6.3.2.	Quantifizierung der zellulären Reaktionen	34
2.6.4.	Statistische Auswertung	35
3. Ergebnisse		
		36

3.1.Experiment 1	36
3.2.Experiment 2 Teil 1	38
3.3.Experiment 2 Teil 2	41
4. Diskussion	45
4.1.Tiermodelle der Multiplen Sklerose und Ihre Grenzen	45
4.1.1.Limitierungen des Cuprizone-Modells	45
4.1.2.EAE-Modell und die Limitierung	46
4.1.3.Das neue Cup-EAE-Modell – Klarstellungen	48
4.2.Siponimod Wirkungen im Rahmen der vorliegenden Forschung	48
4.2.1.Einfluss von Siponimod auf die Demyelinisierung	48
4.2.2.Untersuchung der entzündungshemmenden Effekte von Siponimod	50
4.2.3.Der Einfluss von Siponimod auf Gliazellen	51
4.2.3.1.Wirkung von Siponimod auf Astrozyten	51
4.2.3.2.Effekte von Siponimod auf die Mikroglia	53
4.2.3.3.Perspektiven und Effekte von Siponimod auf Oligodendrozyten und Remyelinisierung	55
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	58
7. Abkürzungsverzeichnis	77
8. Tabellenverzeichnis	79
9. Abbildungsverzeichnis	79

II. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht und mich unterstützt haben.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp für die Überlassung des Themas und seiner guten Betreuung mit stets ausführlichen und konstruktiven Gesprächen. Ich bin ihm sehr dankbar, dass er mir die Chance gegeben hat, die Promotion während meines Medizinstudiums als Erasmus-Student an der Universitätsmedizin Rostock zu starten. Es waren seine Unterstützung, sein Vertrauen und seine ausgezeichnete Erfahrung, die mir geholfen haben, alle Herausforderungen zu bewältigen und mich immer wieder zu motivieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Kollegen des Forschungsteams, Newshan Behrangi und Dimitrinka Antanasova, herzlich bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Frau Eliza Winzinger für die vielseitige Unterstützung bedanken.

III. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

IV. Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name: **Tudor Winzinger (geb. Mosescu)**
Adresse: St. Martinsplatz Str. 2, 7000 Chur, Schweiz
Tel.: 00410774473087
E-Mail: winzingertudor@yahoo.com
Geburtsdatum/Ort: 29/09/1995, Iasi, Rumänien
Muttersprache: Rumänisch
Weitere Sprachen: Deutsch (B2), English (B2)

AUSBILDUNGSWEG

Okt.2020 – Okt.2022	Master in Gesundheitsmanagement an der Universität für Medizin und Pharmazie "Grigore T. Popa" Iasi, Rumänien
Okt.2014 - Okt.2020	Studium Humanmedizin, Universität für Medizin und Pharmazie "Grigore T. Popa" Iasi, Rumänien,
Mrz.2019 - heute	Doktorand an der Universitätsmedizin Rostock, Deutschland im Bereich Neuroanatomie (Betreuer: Institutsdirektor Univ. Prof. Dr.med. Dr.rer.nat Markus Kipp)
Okt.2018 - Okt.2019	Erasmus Student, Universitätsmedizin Rostock, Deutschland (2 Semester)
Sept.2010 - Jul.2014	Abiturzeugnis, Mathematisches-Naturwissenschaftliches Gymnasium, "Colegiul National", Iasi, Rumänien

PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN

01.04.2023 - heute	Assistenzarzt Psychiatrie, Psychiatrische Dienste Graubünden, Chur, Schweiz
01.09.2019 - 29.02.2020	Studentische Hilfskraft: Universitätsmedizin Rostock, Abteilung Psychiatrie und Psychotherapie

PUBLIKATIONEN

Behrangi N, Atanasova D, Winzinger T , Kipp M. Siponimod ameliorates inflammation and axonal injury in a novel multiple sclerosis model .ECTRIMS International Congress for treatment and research in Multiple Sclerosis, Stockholm 2019;
Atanasova D, Behrangi N, Mosescu T , Kipp M. The interplay between innate immune activation and adaptive immunity to model multiple sclerosis disease activity . Der XXIV nationaler Kongress der bulgarischen Anatomie Gesellschaft, Stara Zagora/Starozagorski mineralni bani, Bulgarien May 31-June 02, 2019, Contract No КП-06-МНФ/7 – 14.12.2018;
Toader E, Palamaru AL, Hrisca-Eva OD, Winzinger T . Medical Biotechnologies from the Ethical Perspective of the Responsibility of the Common Good . Journal of Intercultural Management and Ethics. 2022; Issue No. 1: 37-42.
Winzinger T , Palamaru AL, Winzinger EP, Toader E. Ethical Implications Regarding the Use of Biotechnologies in Terminal Patient Care . Journal of Intercultural Management and Ethics. 2022; Issue No. 1: 49-55.

Winzinger EP, Jandikova H, Haase M, Knauerhase A, **Winzinger T**, Schott M, Willenberg HS. **DHEAS and differential blood counts as indirect signs of glucocorticoid excess in adrenal non-producing adenomas.** Horm Metab Res. 2021; 53: 1-8. doi: 10.1055/a-1539-6442 IF. 2.936

Toader E, Decusara A, Piscuc M, **Winzinger T**. **Ethical contributions in preserving the dignity of the terminal patient.** Journal of Intercultural Management and Ethics. 2021; Issue No. 2: 65-70.

Toader E, Damir D, **Winzinger T**. **COVID - 19 through the window of age.** Journal of Intercultural Management and Ethics. 2021; Issue No. 1: 55-60.

Hinganu D, Stan CI, Eva I, **Moşescu T**, Cazacu-Davidescu EI, Hinganu MV. **Kryoablation der Brusttumoren.** Rumänisches Journal für funktionelle und klinische, makro- und mikroskopischen Anatomie und Anthropologie. 2015; 14(4): 605-609.

V. Thesen

1. Im Cup-EAE-Modell reduziert Siponimod signifikant die Rekrutierung von Immunzellen (CD3+; CD4+) aus der Peripherie und hemmt die Entzündung innerhalb des Zentralnervensystems;
2. Im Cup-EAE-Modell reduziert Siponimod signifikant die fokale, entzündliche, perivaskuläre Infiltration (PVCs), die sowohl im Corpus Callosum als auch in der kortikalen und subkortikalen Region der grauen Substanz vorhanden ist;
3. Die protektiven Effekte von Siponimod sind sowohl im Cuprizone- als auch in dem Cup-EAE-Modell nachweisbar;
4. Siponimod reduzierte signifikant die Ausbreitung der Demyelinisierung im Cuprizone-Modell nach einer dreiwöchigen Intoxikation, gefolgt von weiteren zwei Wochen normaler Fütterung für die Entwicklung und das Fortschreiten der Läsion;
5. Nach einer dreiwöchigen Cuprizone-Intoxikation, gefolgt von einer zweiwöchigen normalen Fütterung und einer weiteren zweiwöchigen EAE-Immunisierung mit MOG35-55, konnte eine fast vollständige spontane Remyelinisierung beobachtet werden.

1. EINLEITUNG

1.1. Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS, Encephalomyelitis disseminata) ist eine chronische, neuroinflammatorische Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), mit einer hohen Prävalenz bei jungen Menschen. MS-Läsionen sind durch Demyelinisierung, Absterben von Oligodendrozyten, axonaler Schädigung und Gliose gekennzeichnet. MS ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS und betrifft weltweit mehr als 2 Millionen Menschen (GBD 2015. Lancet Neurol. 2017). Die Ätiologie der MS ist weitgehend ungeklärt. Es werden immunologische, genetische sowie Umweltfaktoren vermutet, die zum Ausbruch der Erkrankung führen.

1.1.1. Klinische Verlaufsformen

MS kann klinisch in drei Gruppen eingeteilt werden: schubförmig-remittierende MS (RRMS), sekundär progrediente MS (SPMS) und primär progrediente MS (PPMS) (Lublin FD, Neurology. 1996). MS unterscheidet sich von den meisten anderen chronischen neurologischen Störungen durch den einzigartigen schubförmigen Verlauf. Die Mehrheit der Patienten (85%) mit MS weist früh rezidivierende und remittierende Episoden mit neurologischer Behinderung und radiologischen Manifestationen auf (rezidivierend-remittierende MS oder schubförmig-remittierende RRMS). Die neuronalen Dysfunktionen treten plötzlich auf, in Schüben. Diese dauern normalerweise Tage bis Wochen, gefolgt von unterschiedlich langen Erholungsphasen mit einer partiellen oder vollständigen Remission, sog. Plateauphasen (Polman CH *et al.* Ann Neurol. 2011). Jahre später folgt auf diese anfänglich rezidivierende remittierende Phase bei einem Großteil der Patienten eine chronisch progrediente Phase (sekundär progrediente MS oder SPMS). Die neuronalen Dysfunktionen nehmen progressiv zu und sind in den einzelnen Schüben verstärkt. Aus bislang unbekanntem Gründen beginnt das Krankheitsbild anfänglich bei ungefähr 15% der Patienten mit einem primär progressiven Verlauf (primär progressive MS oder PPMS). Diese Verlaufsform ist durch eine kontinuierliche progressive Zunahme der klinischen Beeinträchtigung geprägt (Stys PK, Tsutsui S. F1000Res. 2019).

Die typischen klinischen Manifestationen umfassen üblicherweise einen monokularen Sehverlust aufgrund einer Optikusneuritis, eine Schwäche der Gliedmaßen oder einen sensorischen Verlust aufgrund einer transversalen Myelitis, eine Diplopie aufgrund einer Hirnstammdysfunktion oder eine Ataxie aufgrund einer Kleinhirnläsion (Brownlee WJ *et al.* Lancet 2017).

Die genaue Klassifizierung der verschiedenen MS Stadien erweist sich oft als problematisch. Die klinischen Rückfälle, sog. Schübe bei jüngeren Patienten, sowie radiologische Hinweise auf eine ZNS-Entzündung bieten eine gute Grundlage zur Diagnose früher Phasen der RRMS. Die derzeitigen Optionen für eine wirksame entzündungshemmende Therapie sind in dieser Phase beruhen insbesondere auf Immunmodulation, Immunsuppression und Immunrekonstruktion. Mit Fortschreiten der Erkrankung wird es jedoch oft problematisch, den Übergang von einem Rückfall zu einer sekundär progredienten Krankheit (SPMS) zu erkennen. Das Fehlen dokumentierter klinischer Rückfälle manifestiert nicht die Abwesenheit einer entzündlichen Aktivität bei der Magnetresonanztomographie

(MRT), und das Fehlen entzündlicher radiologischer Läsionen bedeutet nicht unbedingt das Fehlen einer Entzündung auf Gewebeebene (Stys PK, Tsutsui S. F1000Res. 2019).

1.1.2. Hypothesen zur Pathogenese

Traditionell beruht die Ätiologie der MS auf einer "von außen nach innen" gerichteten Hypothese (eng. Outside-In Hypothesis), nach der dysregulierte, selbstreaktive T-Zellen von der Peripherie in das Parenchym des ZNS migrieren und zusammen mit Makrophagen und B-Zellen verschiedene ZNS-Elemente angreifen. Das Myelin stellt ein zentrales Angriffsziel dar (Stys PK *et al.* F1000Res. 2019). Obwohl das auslösende Autoantigen noch nicht identifiziert wurde, wird davon ausgegangen, dass die selbstreaktive und gerichtete Immunantwort der MS-Patienten gegen eine oder mehrere eigene Komponente(n) der Myelinscheide krankheitsauslösend ist. Perivaskuläre entzündliche Infiltrate, oligoklonales Immunglobulin G in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), oder die Anreicherung von Gadoliniumhaltigen Kontrastmittel zur Detektion von Läsionen im Gehirn mittels Magnetresonanztomographie wurden in Zusammenhang mit dem akuten Auftreten von klinischen Symptomen und neuen Läsionen gebracht (Pirko I. Neurology. 2007). Derartige entzündliche Läsionen können weit verbreitet in der weißen Substanz beobachtet werden. Andererseits haben mehrere Studien deutlich gezeigt, dass auch verschiedene Strukturen der grauen Substanz angegriffen werden (Pirko I. Neurology. 2007; Lucchinetti CF. N Engl J Med. 2011). Aufgrund dieser entzündlichen Angriffe werden nicht nur die Myelinscheide (i.e. Demyelinisierung), sondern auch die Integrität der neuronalen Strukturen aus Axonen, Dendriten, Synapsen oder sogar ganzen Nervenzellen zerstört (Frischer JM. Brain. 2009; Kutzelnigg A. Brain. 2005; Behrangi N *et al.* Cells. 2019). Diese entzündlichen Prozesse, die zu einem klinischen Verlauf von Rezidiven-Remissionen führen, tragen vermutlich selbständig zu einer ansteigenden ZNS-Verletzung bei. Daher sind die meisten Studien auf diesem Gebiet auf die autoimmun-entzündlichen Eigenschaften der Erkrankung gerichtet. Die hat bis heute zu mehr als ein Dutzend Behandlungen geführt, die von der Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln der USA bzw. der Europäischen Arzneimittel-Agentur genehmigt wurden (NMSS Brochure 2019; Stys PK *et al.* F1000Res. 2019).

Nebem diesem Outside-In Modell gibt es eine konkurrierende Theorie, die darauf basiert, dass die ursprüngliche Störung im ZNS auftritt, wie dies auch für andere neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson vermutet wird (Hauser SL *et al.* Neuron. 2006; Trapp BD *et al.* Annu Rev Neurosci. 2008; Stys PK *et al.* Nat Rev Neurosci. 2012; Haider L *et al.* Oxid Med Cell Longev. 2015; Stys PK *et al.* F1000Res. 2019). Diese alternative "von innen nach außen" bezeichnete Hypothese (engl. Inside-Out Hypothesis) geht davon aus, dass es sich bei der MS primär um eine degenerative Erkrankung handelt, die von einem veränderten Entzündungsniveau begleitet wird: Es kommt zur Bildung von antigenpräsentierenden Zell-Komponenten, wie Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteinen, Myelin-Basischen Proteinen und Proteolipid-Proteinen (Davies S *et al.* J Neuropathol Exp Neurol. 2005; Mañá P *et al.* J Neuroimmunol. 2009). Die chronische Ausscheidung der Autoantigene ruft eine autoimmun-entzündliche Antwort hervor. Das Ausmaß dieser entzündlichen Reaktion, die sich bei jedem Patient zeitlich verändert, entscheidet damit über das Spektrum der MS Phänotypen. Maßgeblich

ist, dass die primäre Degeneration von Anfang an anwesend ist, meist Jahre vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome.

In Anbetracht der Tatsache, dass die ZNS Entzündung bei MS durch moderne Behandlungen unter Kontrolle gehalten werden kann, ist die aktuelle Herausforderung, dass die während der progressiven Erkrankung auftretenden meist irreversiblen Behinderungen vermieden werden (Correale J *et al.* Brain. 2017; Abdelhak A *et al.* Front Neurol. 2017; Stys PK, Tsutsui S. F1000Res. 2019). Diese neue "von innen nach außen" Hypothese hat immense Einflüsse auf die Therapie. Basierend auf der Annahme, dass die Neurodegeneration eine Entzündung auslöst, könnten protektive Maßnahmen entzündliche Rezidive minimieren. Letztendlich würde dadurch auch das Fortschreiten der Neurodegeneration verlangsamt und damit assoziierte Symptome reduziert (Behrangi N *et al.* Cells. 2019).

Gegenwärtig verstehen wir nicht die Mechanismen, die diese Phase der MS auslösen, und haben keine sehr wirksamen Behandlungsoptionen für diejenigen Patienten, in denen die Degeneration ohne offensichtliche Entzündung fortschreitet. (Stys PK *et al.* F1000Res. 2019).

1.1.3. Pathologie

Die erste pathologische Vorstellung einer MS Erkrankung erfolgte bereits vor 150 Jahren als eine disseminierte „Plaque-ähnliche Sklerose“. Immer noch bildet der Nachweis der Dissemination – sowohl räumlich als Veränderungen in verschiedenen Regionen des ZNS, einschließlich der weißen und grauen Substanz, des Hirnstamms, Rückenmarks und Sehnervs als auch in zeitlicher Hinsicht – den Grundstein der MS Diagnose. Unser Verständnis von Details dieser Pathologie, und insbesondere ihrer Entwicklung mit der Zeit, wurden durch moderne Techniken wie Immunhistochemie (IHC) und Magnetresonanztomographie revolutioniert (Reich DS *et al.* N Engl J Med. 2018).

Auf histopathologischer Ebene manifestiert sich die MS in fokaler Demyelinisierung in der weißen und grauen Substanz. Neben Demyelinisierung führen die fokale und diffuse Invasion und die (Re-)Aktivierung dieser Immunzellen zu einer Schädigung der Nervenzellen (Carassiti D *et al.* Neuropathol Appl Neurobiol 2018). Die neuro-anatomische Lage der Läsion kann spezifische klinische Symptome auslösen. Zum Beispiel können Läsionen der Sehnervenbahn den Verlust des Sehvermögens verursachen, zerebrale Läsionen können Koordinationsprobleme sowie Glieder-, Gang- oder Rumpfataxie hervorrufen, und Läsionen der Pyramidenbahn motorische Störungen bewirken. (Reich DS *et al.* AJNR Am J Neuroradiol 2008). Eine wichtige Fragestellung ist, inwieweit im Gehirn von MS Patienten subzelluläre neuronale Strukturen zerstört sind, einschließlich Axonen, Dendriten oder synaptischen Dornfortsätzen (Trapp BD *et al.* New Engl. J. Med. 1998; Dutta R *et al.* Ann. Neurol. 2011; Jurgens T *et al.* Brain 2016). Letztendlich können ganze Nervenzellen verloren werden (Peterson JW *et al.* Ann Neurol 2001; Kipp M *et al.* Brain Pathol. 2017; Zhan J *et al.* Cells. 2020).

1.2. Die Gliazellen des Zentralnervensystems in Multipler Sklerose

Die Gewebebeschädigung im Zuge der MS entsteht aus einem dynamischen Zusammenspiel zwischen dem Immunsystem, der Glia (Oligodendrozyten, Myelin, Mikroglia und Astrozyten) und den Nervenzellen. Im Laufe der MS Erkrankung wird die Myelinschicht zunehmend zerstört. Zusätzlich zu den peripheren Immunzellen (Lymphozyten und Makrophagen) werden Astrozyten und Mikroglia als wichtige Regulatoren der Myelin- und Nervenschädigung in MS betrachtet.

1.2.1. Astrozyten

Astrozyten bilden den größten Teil der Gliazellen und tragen auf allen Ebenen zur Aufrechterhaltung der ZNS-Homöostase bei. Astrozyten regulieren die Formierung und Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BBB), sie beeinflussen den Axon-Auswuchs, unterstützen Nervenzellen und die Synapsen (Clarke LE *et al.* Nat Rev Neurosci. 2013; Yi W *et al.* Brain Behav Immun. 2019).

Astrozyten haben eine Doppelrolle bei der MS Pathogenese (Correale J *et al.* Front Neurol. 2015): Einerseits tragen sie zur Entwicklung der Erkrankung bei, indem sie als Immunzellen im ZNS fungieren und Chemokine sezernieren, die die Zellmigration vom peripheren Blut zum ZNS vermitteln (Correale J *et al.* Front Neurol. 2015). Andererseits fördern sie die Migration, Proliferation und Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu reifen, adulten Oligodendrozyten (Moore CS *et al.* J Neurosci Res. 2011), indem sie verschiedene Wachstumsfaktoren wie PDGF und FGF freisetzen. Die aktuellen Daten weisen darauf hin, dass sie nicht nur zur Aufrechterhaltung der Homöostase beitragen, sondern auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen des ZNS, insbesondere von MS, spielen (Guerrero-García JJ. Neurologia. 2020).

In der MS Pathogenese haben die Astrozyten verschiedene Funktionen: a) als ZNS-Immunzellen im MS-Entzündungsverlauf; b) als antigenpräsentierende Zellen (APZ); c) als Regulatoren von T-Zellen; und d) in der Integrität der BBB und in Mechanismen, die die BBB Permeabilität verändern, was wiederum die Migration der Immunzellen in das ZNS erleichtert (Guerrero-García JJ. Neurologia. 2020). Bei Verletzungen des ZNS werden die Astrozyten aktiviert, was durch die starke Expression des Intermediär-Filamentproteins GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) visualisiert werden kann, sowie mehrerer Veränderungen, die als reaktive Astrogliose zusammengefasst werden (Yi W *et al.* Brain Behav Immun. 2019). Die Aktivierung beginnt in einem frühen Stadium vor der Infiltration von Leukozyten und kann initial durch entzündliche Faktoren vermittelt werden, die sich schnell in der BBB verbreiten und in das ZNS-Parenchym eintreten (Chanaday NL *et al.* Neuroscience. 2016).

Im Zusammenhang mit MS können die Astrozyten pro-Myelinisierungs- und neurotrophe Faktoren produzieren, die wiederum die Differenzierung der Oligodendrozyten induzieren (Molina- Gonzalez I *et al.* Neurosci. Lett. 2019) oder die BBB stabilisieren.

1.2.1.1. Die Rolle von Astrozyten im Rahmen der Aufrechterhaltung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke

Die ZNS-Homöostase basiert auf einer intakten BBB, einer physischen Struktur, bestehend aus Endothelzellen (ECs), Perizyten und einer Basalmembran. Die BBB ist von den Endigungen der Astrozyten umgeben, welche die Glia limitans formieren, die als Stoffwechselschranke zwischen Nervenzellen und Bindegewebe bzw. Blutgefäßen im ZNS fungiert. Diese Funktion erfolgt durch Ausbildung von Tight Junctions und Adherens Junctions zwischen den Endothelzellen und sorgen dadurch für die Regulation der endothelialen Permeabilität (Yi W *et al.* Brain Behav Immun. 2019).

Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass eine enge endotheliale-astrogliale Verbindung für die Induktion, Organisation und Erhaltung der BBB notwendig ist (Ramsauer M *et al.* FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 2002). Beispielsweise führt die Entfernung von Astrozyten in *in vitro* BBB-Modellen zu einer erhöhten parazellularen Permeabilität für kleine Tracer-Moleküle über der monomolekulare Schicht der Endothelzellen im Gehirn (Kraus J *et al.* Ann. Neurol. 2004). Der Mechanismus der BBB ist nicht vollständig verstanden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Permeabilität durch Zytokine, Chemokine, Matrix-Metalloproteasen (MMP) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erhöht werden kann (Minagar A *et al.* Multiple Sclerosis J. 2003). Mit Bezug auf ECs können reaktive Astrozyten Signalmoleküle, wie IL-1 β , TNF, Glutamat und Stickoxid (NO) abgeben, um Interaktionen zu hemmen und nachfolgend Apoptose zu induzieren (Didier N *et al.* J. Neurochem. 2003; Parfenova H *et al.* Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2006; Rochfort KD *et al.* J. Neurochemistry. 2016; Thiel VE *et al.* Antioxid. Redox Signal. 2001; Vazana U *et al.* J Neurosci 2016).

1.2.2. Mikroglia

Als Mikroglia bezeichnet man eine Gruppe von Immuneffektorzellen des ZNS. Man findet die Mikroglia sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz. Sie sind Teil des mononukleär-phagozytären Systems und gehören zu den mesenchymalen Zellen, die während der embryonalen Entwicklung in das ZNS eindringen. Bei einer Gewebeläsion werden die Mikrogliazellen in große, phagozytierende Zellen, die Makrophagen, umgeformt. Als ein Teil des zellulären Immunsystems erfüllt sie unter anderem die Funktion der Phagozytose von Fremdkörpern und Zellfragmenten, Antigenpräsentation, sowie Eliminierung von apoptotischen Neuronen und Gliazellen.

Die Mikroglia umfasst daher vor allem die residenten Makrophagen des ZNS. Diese Zellen haben wichtige physiologische Funktionen in der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase und tragen auch zur ZNS-Pathologie bei. Die Mikroglia reagiert auf Veränderungen in der Mikroumwelt. Der resultierende reaktive Phänotyp kann sehr vielfältig sein, da er sowohl nervenentzündliche als auch nervenschützende Eigenschaften hat, was die Plastizität der beteiligten Zellen reflektiert (Voet S *et al.* Trends Mol Med. 2019). Damit ist dies ein wesentlicher Zelltyp, der neurotoxische Reaktionen auslöst und damit potentiell zur progredienten Nervendegeneration beitragen kann. Die Mikroglia kann alternativ auch wichtige Rollen in der Förderung des Nervenschutzes durch Reduktion von Entzündung und Stimulation der Zellreparatur spielen.

1.2.3. Oligodendrozyten

Die reifen, myelin-produzierenden Oligodendrozyten sind die Endprodukte der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs), die im Laufe der Differenzierung ein komplexes und zeitlich angepasstes Programm bestehend aus Erkennungsphase, Induktionsphase, Umbauphase und Reifungsphase durchlaufen haben. Infolge dieses komplexen Differenzierungsprogramms und dank ihres differenzierten Metabolismus und ihrer Physiologie werden die Oligodendrozyten inzwischen als die verletzbarsten Zellen des ZNS betrachtet (Bradl M *et al.* Acta Neuropathol. 2010).

Es wurde gezeigt, dass Oligodendrozyten Neuronen mit Nährstoffen versorgen (Fünfschilling U *et al.* Nature. 2012), dass schneller Axonen-Transport abhängig von der ordnungsgemäßen Funktionierung der Oligodendrozyten ist (Edgar JM *et al.* J Cell Biol. 2004), und dass Mäuse, denen reife Myelin-Proteine mangeln, eine ausgeprägte Neurodegeneration aufweisen (Uschkureit T *et al.* J Neurosci. 2000).

1.2.4. Ependymzellen

Die Ependymzellen (Neurogliazellen) sind einschichtige, flache bis hochprismatische, spezialisierte Epithelzellen, die bewegliche Zilien tragen. Sie kleiden die Gehirnventrikel und den Zentralkanal des Rückenmarks aus (Del Bigio. Acta Neuropathol. 2010) und haben eine wichtige Rolle in der Sekretion und Regulation der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), in der Clearance von toxischen Metaboliten, sowie in der metabolischen Regulation des Gehirns. Die Ependymzellen bilden eine Barriere, die den Transport von Molekülen zwischen der ventrikulären CSF und der Interstitialflüssigkeit regelt (Del Bigio. Acta Neuropathol. 2010; Hatrock D *et al.* Neural Regen Res. 2020). Da Ependymzellen nicht proliferieren, ist ihr Verlust irreversibel.

1.3. Das Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Modell (Blakemore WF. J Neurol Sci 1973) stellt ein Modell zur Erforschung der toxischen Demyelinisierung dar. In diesem Modell werden erwachsene Mäuse mit Cuprizone (Bis-Cyclohexanon- Oxaldihydraton), einem selektiven Kupfer-Chelatbinder, der vermutlich kupferabhängige, mitochondriale Enzyme hemmt, gefüttert. Dies führt zu einer Störung des Energiestoffwechsels und zur Apoptose der Oligodendrozyten. In Folge des Oligodendrozytenverlusts werden Astrozyten und Mikroglia aktiviert. Es kommt nachfolgend zur Phagozytose der Myelinscheide und zu einer toxischen, nichtentzündlichen Demyelinisierung bei intakter BBB ohne ausgeprägte T-Zell-Beteiligung (Bakker DA *et al.* J Neurol Sci. 1987; Kipp M. *et al.* Brain Pathol. 2017).

Obwohl in diesem Modell Autoimmunzellen keinen Einfluss auf die Entstehung der Läsionen haben, ist es sehr hilfreich, um die grundlegenden zellulären und molekularen Mechanismen während der Demyelinisierung und insbesondere der Remyelinisierung unabhängig von Interaktionen mit den peripheren Immunzellen zu studieren (Viktoria Gudi *et al.* Fron Cell Neurosci 2014).

Die durch Cuprizone induzierten entmarkten Herde befinden sich in der weißen Substanz im Bereich des medialen Corpus callosum, des Pedunculus cerebellaris superior, der primär und somatomotorischen Kortex (Kipp M. *et al.* RWTH Aachen University, 2011), des Hippocampus (Norkute

A *et al.* J Neurosci Res. 2009), das Cerebellums (Groebe A *et al.* Cerebellum. 2009), und Teilen der Basalganglien (Pott F *et al.* Brain Research. 2009).

1.4. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) handelt es sich um ein immunologisches MS-Mausmodell. Diese Form der Enzephalomyelitis reflektiert eine akute, chronisch-rezidivierende, entzündliche, demyelinisierende autoimmune Erkrankung (Mix *et al.* J Neurol. 2008). EAE ist das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Erforschung neuroinflammatorischer Erkrankungen wie der MS. In diesem Modell werden Versuchstieren Proteine (bzw. Fragmente davon; Peptide) injiziert, die Bestandteile der Myelinscheide sind, insbesondere MBP (Myelin-Basisches-Protein), PLP (Proteolipid-Protein), und MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) (Kipp M. *et al.* Acta Neuropathol. 2009). Die Injektion dieser Proteine induziert eine Autoimmunantwort durch die Bildung von Myelin-spezifischen T-Zellen (Ben-Nun A *et al.* Eur J Immunol. 1981), die wiederum das Myelin angreifen. Histologisch zeigen sich bei der EAE perivaskuläre Leukozyten-Infiltrate und eine sekundäre Demyelinisierung. Die alte traditionelle „Outside-In“-Hypothese von MS ist durch das EAE-Modell sehr gut reproduzierbar, da dieses Modell eine primär auf autoimmunem Prozessen basierende Erkrankung nachbildet (Kipp M *et al.* Brain Pathol. 2017).

Eine EAE-Immunisierung führt zur Aktivierung von antigen-spezifischen T Zellen der sekundären lymphatischen Organe. Infolge der subkutanen Immunisierung werden die ZNS-Antigene von lokalen Antigen-präsentierenden Zellen phagozytiert. Diese Antigen-präsentierenden Zellen wandern durch die lymphatischen Gefäßen zu den Lymphknoten oder der Milz und lösen dort, zusammen mit Lymphozyten, die Proliferation von T-Helferzellen aus (Th1- und Th17-Zellen) (Kipp M *et al.* Brain Pathol. 2017). Die T-Zellen verlassen die peripheren lymphoiden Organe, überwinden die BBB und führen zu entzündlichen Läsionen im Bereich des Rückenmarks, des Cerebellums und des Nervus opticus (O'Neill JK *et al.* J Neuroimmunol. 1998). Im Allgemeinen wird in bei der EAE das Vorderhirn, einschließlich der Hirnrinde, das Corpus callosum und die subkortikalen Strukturen wesentlich weniger schwer angegriffen (Scheld M *et al.* J Neurosci. 2016).

Zusätzliche wichtige histopathologische Eigenschaften der MS, die in EAE ungenügend reproduzierbar sind, beinhalten die entzündliche Demyelinisierung der weißen Substanz in dem Vorderhirn, diffuse NAWM (normal aussehende weiße Substanz) Pathologie und Demyelinisierung der grauen Substanz (Chanaday NL *et al.* Neuroscience. 2016; Scheld M *et al.* J Neurosci. 2016).

1.5. Das Cuprizone/EAE Modell

Die zwei oben beschriebenen Tiermodelle basieren entweder auf der toxisch ausgelösten Demyelinisierung (Cuprizone-Modell) oder auf der aktiven Immunisierung (EAE-Modell). Dadurch ist nur eine der beiden Hypothesen untersuchbar, nämlich die traditionelle sogenannte „Outside-In“ Theorie. Im Unterschied dazu, stellt das Cup-EAE-Modell eine Kombination aus dem toxischen Cuprizone-Modell und dem immunologischen EAE Modell dar. Die Cuprizone-induzierte Neurodegeneration wirkt als „Trigger“ für eine sekundäre periphere Immunzellrekrutierung in das Telencephalon (Scheld M *et al.* J Neurosci. 2016; Rütger BJ *et al.* Glia. 2017).

Die neue sogenannte „Inside-Out“- Hypothese ist durch das Cup-EAE-Modell optimal darstellbar, da die primäre Cuprizone-induzierte Neurodegeneration sekundär zu einer Rekrutierung peripherer Immunzellen führt (Scheld M *et al.* J Neurosci. 2016; Rüter BJ *et al.* Glia. 2017). Der experimentelle Ablauf ist zeitlich wie folgt (siehe auch Material- und Methodenteil in dieser Arbeit): Zunächst werden die Versuchstiere einer 3-wöchigen Cuprizone Intoxikation ausgesetzt, gefolgt von 2 Wochen Ernährung mit normalem Futter (Iglesias A *et al.* Glia. 2001). Dadurch entwickeln sich unter anderem im Bereich des Hippocampus, des Kortex und des Corpus callosum demyelinisierte Läsionen, welche von Oligodendrozytenapoptose, Mikrogliaaktivierung, Astrogliose und axonalen Schäden begleitet werden (Kipp M *et al.* Acta Neuropathol. 2009). Ab Woche 5 führt die aktive EAE-Immunisierung mit einem Fragment des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins, dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid, zu einer Autoimmunreaktion geprägt von inflammatorischen Läsionen im Rückenmark und Cerebellum (Iglesias A *et al.* Glia. 2001; Yakimov V *et al.* Histochem Cell Biol. 2019).

1.6. Siponimod

1.6.1. Die Sphingosin-1-phosphat Rezeptoren

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, das eine Vielfalt physiologischer Prozesse regelt, einschließlich Lymphozyten-Rezirkulation, Herzfunktion, vaskuläre Homöostase, Mikroglia-Aktivierung, neuronale Interaktionen, Axonen-Wachstum, Überlebensfähigkeit der Oligodendrozyten, Myelinisierung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke. S1P-Rezeptoren sind an immunvermittelten Erkrankungen, einschließlich MS, beteiligt (Wang Z *et al.* Sci Adv. 2020; Chaudhry BZ. *et al.* Neurotherapeutics. 2017).

In der Arbeitsgruppe von Norgauer wurde nachgewiesen, dass S1P die Chemotaxie der unreifen dendritischen Zellen induziert und die Ausscheidung von Zytokinen durch T-Helferzellen des Subtyps Th2, was wiederum die von Th2 Lymphozyten vermittelte Immunität begünstigt (Idzko M. *et al.* FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 2002). Die meisten Effekte von S1P werden durch fünf G-Protein-assoziierte S1P-Rezeptor Subtypen reguliert, nämlich S1P1-5. Ursprünglich wurden diese EDG-1, 3, 5, 6, und 8 genannt (An S. FEBS Lett. 1997). Diese Rezeptoren werden in verschiedenen Zelltypen, einschließlich Lymphozyten, Kardiomyozyten und Gehirnzellen unterschiedlich stark exprimiert (Graeler M. *et al.* FASEB J. 2002; Allende M.L. J. Biol. Chem. 2004; Means C.K. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2007). Kuppermann E *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass S1P-Rezeptoren die Zellmigration während der Herzentwicklung in Wirbeltieren regeln (Kupperman E. Nature. 2000). Eine ähnliche pro-Migrations-Wirkung der S1P-Rezeptoren wurde auch für CD4⁺ T Zellen gezeigt (Graeler M. *et al.* Immunol. 2002). Wichtig für die Regulation der Immunantwort ist die Interaktion zwischen S1P und S1P1 für den Austritt einer Subgruppe von Lymphozyten aus sekundären lymphoiden Organen und ihre Neuverteilung in anderen Geweben (Gajofatto A. Drug Des Devel Ther. 2017). Matloubian wies zum ersten Mal nach, dass der Austritt von Lymphozyten aus dem Thymus und den peripheren lymphoiden Organen von S1P1 abhängt (Matloubian M. Nature. 2004). Der funktionale Antagonismus des S1P Rezeptors hemmt die Freisetzung von Lymphozyten aus den Lymphknoten in einer S1P1-abhängigen Reaktion (Mandala S. *et al.* Science. 2002). Graeler *et al.* zeigten, dass die CD4-Th und CD8 zytotoxischen Lymphozyten S1P Rezeptoren, vor allem die Subtypen hauptsächlich S1P1 und

S1P4, exprimieren, und dass S1P chemotaktische Reaktionen in T-Zellen induziert (Graeler M. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2002).

Der natürliche Ligand des S1P Rezeptors, Sphingosin-1-phosphat, entsteht durch Phosphorylierung des Membranlipids Sphingosin und wird durch die Sphingosin-Kinase Typ 1 oder 2 (Sphk1/Sphk2) katalysiert. Sphk2 ist die vorherrschende Isoform, die die S1P im ZNS katalysiert (Blondeau N. *et al. J. Neurochem.* 2007) und die vor ischämischer Gehirnschädigung in Schlaganfallmodellen schützt (Pfeilschifter W. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011), oder die Plastizität des Hippocampus durch die durch S1P- vermittelte Hemmung der Histondeacetylasen bewahrt (Hait N.C. *et al. Nat. Neurosci.* 2014; Kipp M. *Cells.* 2020).

1.6.2. Fingolimod

Die durch S1P-vermittelte Signaltransduktion steht im Zentrum intensiver Forschungsarbeiten im letzten Jahrzehnt, teilweise angeregt durch die therapeutische Entwicklung von FTY720 (Fingolimod), das kürzlich als das erste *per os* verfügbare Arzneimittel für die RRMS genehmigt wurde (Mutoh T. *et al. Br J Pharmacol.* 2012). Die Entdeckung, dass ein chemisch-modifiziertes, natürliches Sphingolipid (i.e., Fingolimod) immunsuppressive Auswirkungen nach der Phosphorylierung *in vivo* zeigt, indem es S1P1 funktionell antagonisiert und auf diese Weise B- und T-Zellen in lymphoiden Geweben sequestriert, hat zur klinischen Entwicklung und Genehmigung dieses Moleküls für die Behandlung der RRMS geführt (Gajofatto A *et al. Drug Healthc Patient Saf.* 2015). Fingolimod (Gilenya® und Novartis) wurde 2010 als erstes *per os* verfügbares Arzneimittel für RRMS in einigen Ländern genehmigt. 2018 gab Novartis bekannt, dass die Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln der USA (FDA) Gilenya® für die Behandlung von Kindern und Jugendlichen im Alter von 10 bis 18 Jahren mit RRMS genehmigte. Das ist die erste Erkrankungs-verändernde Therapie, die für diese Patienten empfohlen ist (Kipp M. *Cells.* 2020). Das den S1P-Rezeptor modulierende Fingolimod (sog. FTY720) induziert eine schnelle und drastische Deletion von T-Zellen aus dem peripheren Blut, indem es den Austritt der T-Zellen aus dem Thymus und den Lymphknoten hemmt (Yagi H. *Eur. J. Immunol.* 2000). Dadurch verhindert Fingolimod den Eintritt der Lymphozyten in die Blutbahn und folglich die Infiltration der T-Zellen im ZNS. Zudem wurde nachgewiesen, dass Fingolimod die Apoptose in Lymphozyten auslösen kann (Chiba K. *J. Immunol.* 1998; Yanagawa Y. *J. Immunol.* 1998; Yanagawa Y. *et al. Immunology.* 1998; Suzuki S. *Immunology.* 1996). Präklinische Studien zeigten, dass Fingolimod die Pathologie in mehreren Modellen der autoimmunen Erkrankungen mildert, einschließlich bei Typ 1 Diabetes, Adjuvans- induzierter Arthritis, systemischem Lupus erythematodes und, am wichtigsten, bei verschiedenen Modellen der MS (Maki T. *Transplantation.* 2005; Matsuura M. *Inflamm. Res.* 2000; Choi J.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; Fujino M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003).

Obwohl ursprünglich als S1P-Rezeptor Agonist beschrieben, wird mittlerweile davon ausgegangen, dass Fingolimod als funktioneller S1P Inhibitor fungiert, indem es die Internalisierung der S1P-Rezeptoren und den intrazellulären Abbau induziert (Gräler M.H. *et al. Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2004). Der S1P Signalweg ist nicht nur für die Funktionen der T-Zellen, sondern auch für die B-Zellen wichtig. So wird S1P1 für die adäquate Ablagerung der B-Zellen in der Milz benötigt

(Cinamon G. *et al.* Nat. Immunol. 2004; Vora K.A. *et al.* Leukoc. Biol. 2005). Das Vorkommen von „B-Zell-Lymphfollikel-like“ Strukturen in der Hirnhaut einiger MS Patienten und die klinische Wirksamkeit des B-Zellen abbauenden Antikörpers Ocrelizumab weisen darauf hin, dass B-Zellen zum Verlauf der Erkrankung in MS beitragen (Magliozzi R. *et al.* Brain J. Neurol. 2007; Magliozzi R *et al.* Ann. Neurol. 2010; Montalban X. N. Engl. J. Med. 2017). Derzeit ist nicht bekannt, inwieweit der S1P-Rezeptor-Signalweg mit der Bildung oder dem Abbau von B-Zellen Follikel-like Strukturen in MS zusammen hängt (Kipp M. Cells. 2020).

Fingolimod wird *in vivo* schnell in das aktive S-Fingolimod-Phosphat (FTY720-P) umgewandelt, das wiederum einen wirksamen Agonisten von S1P1, S1P3, S1P4 und S1P5 Rezeptoren darstellt (Oo M.L. J. Biol. Chem. 2007). Die Wirksamkeit in MS und in verwandten Tier-Modellen könnte teilweise auf zusätzlichen, direkten Auswirkungen auf das Gehirn beruhen. Beispielsweise wurde eine starke Überexpression von S1P1 und S1P3 in reaktiven Astrozyten bei aktiven und chronisch inaktiven MS Läsionen beobachtet. Eine weitere Studie wies auf eine S1P5 Überexpression in Oligodendrozyten hin (Van Doorn R Glia. 2010; Novgorodov A.S. Faseb. J. 2007; Terai K. Neuroscience. 2003).

Insgesamt hat Fingolimod ein günstiges Nutzen-Risiko Profil (Mullershausen F. Nat. Chem. Biol. 2009). Trotzdem besteht die kritische Herausforderung einer Fingolimod Therapie in den Einleitungsphasen aufgrund des Risikos von kardialen Ereignissen (Bradykardie, atrioventrikulärer Block) sowie Makulaödem durch die erhöhende vaskuläre Permeabilität in der Retina (Cugati S. *et al.* Neurol Clin Pract. 2014; Scott LJ. CNS Drugs. 2020). Fingolimod hat auch eine Affinität für weitere S1P Subtypen, einschließlich S1P3. S1P3 wird in kardialen Myozyten nach der Interaktion mit der phosphorylierten Form des Arzneimittels internalisiert, was folglich zur Verminderung der Herzfrequenz, und selten zum atrioventrikulären Block und Herzstillstand führt, insbesondere in den ersten 24 Stunden nach Behandlungsstart. Der S1P3 Rezeptor ist wichtig für die Bradykardie, wie Experimente S1P3-Knockout-Mäusen zeigten, in denen die Herzfrequenz reduziert war (Brinkmann V. *et al.* Nat Rev Drug Discov. 2010). Zudem wurde gezeigt, dass der S1P3 Agonismus mit Vaso- und Bronchokonstriktion und pulmonaler epithelialer Leckage verbunden ist (Mandala S. *et al.* Science. 2002). Deswegen wird empfohlen, dass alle Patienten, bei denen eine Fingolimod Behandlung stattfand, über 6 Stunden überwacht werden. Zudem hat Fingolimod im Menschen eine lange Halbwertszeit, so dass es ~2 Monate nach Ende der Behandlung noch ausgeschieden wird (Gajofatto A. Drug Des Devel Ther. 2017). Nach Gabe der ersten Dosis von Fingolimod kommt es meist zu einer Verminderung der Herzfrequenz und einer Verlangsamung der atrioventrikulären Überleitungszeit (Akbulak R.O. Mult. Scler. Relat. Disord. 2018). Eine Studie weist auf eine Spezies-abhängige Bradykardie und eine prominente Rolle von S1P1 in der Veränderung der Herzfrequenz hin, weil die Behandlung mit BAF312 (i.e. Siponimod), ein dualer S1P1 und S1P5 Agonist, der die S1P3 Aktivität vermeidet, welche die Aktivierung des GIRK Kanals in menschlichen atrialen Myozyten und Bradykardie in gesunden Freiwilligen verursacht hat (Gergely P. *et al.* Br J Pharmacol. 2012).

1.6.3. Von Fingolimod zu Siponimod

Im Vergleich zu Fingolimod, dem Modulator für S1P1, S1P3, S1P4, und S1P5, ist die Halbwertszeit vom Siponimod kürzer. Dies erlaubt die Erholung der Anzahl von peripheren Lymphozyten auf

Normalniveau innerhalb einer Woche nach Behandlung, und ermöglicht eine per os Dosis einmal pro Tag (Gergely P. *Br. J. Pharmacol.* 2012). Die Kenntnis über die S1P3-Rezeptor-vermittelte Bradykardie in Mäusen hat die Suche nach S1P Rezeptor Regulatoren, die nicht den S1P3 Signalweg beeinflussen, vorangetrieben (Forrest M. J. *Pharmacol. Exp. Ther.* 2004). Infolge dessen wurden S1P Rezeptor Modulatoren mit einer kürzeren Halbwertszeit entwickelt, die nicht S1P3 beeinflussen mit dem Ziel, die Wirksamkeit von Fingolimod bei MS sowohl pharmakokinetisch als auch hinsichtlich der Sicherheit zu erhöhen (Gajofatto A. *Drug Des Devel Ther.* 2017).

Dies führte zur Entwicklung von Siponimod, auch bekannt unter BAF312, einem synthetischen Derivat von Fingolimod, das aufgrund chemischer Modifikationen eine erhöhte Rigidität in der lipophilen Alkylkette aufweist, und damit einen selektiven Regulator für S1P1 und S1P5 Rezeptoren darstellt (Pan S *et al. ACS Med Chem Lett.* 2013). S1P1 und S1P5 werden in Zellen des ZNS, einschließlich Astrozyten (Van Doorn R. *et al. Glia.* 2010), Oligodendrozyten (Novgorodov A.S. *et al. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2007; Terai K. *et al. Neuroscience.* 2003), Mikroglia und Nervenzellen (Groves A. *et al. J. Neurol. Sci.* 2013) exprimiert. Während Fingolimod ein Aminodiol ist, das aus Propan-1,3-Diol mit Amino- und 2-(4-Octylphenyl)Ethyl Substituenten in der 2. Position besteht, ist die chemische Struktur des Siponimods komplexer (Pan S. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* 2013).

Siponimod ist ein selektiver S1P1- und S1P5-Rezeptor-Modulator, der die BBB leicht überwindet (Gergely P *et al. Br J Pharmacol.* 2012). Die selektive Wirkung von Siponimod auf die S1P1- und S1P5-Rezeptoren minimiert Nebenwirkungen, eine Bradykardie kann durch die Titration der Dosis reduziert werden (Goodman AD *et al. Expert Opin Investig Drugs.* 2019), beispielsweise durch Erstellung eines Dosis-Titration-Plans während der Behandlungseinleitung (Gergely P *et al. Br J Pharmacol.* 2012; Shakeri-Nejad K *et al. Clin Ther.* 2015). Zusammenfassend hat Siponimod die Risiken der mit dem Fortschreiten der krankheits-assoziierten Schäden gesenkt, mit einem ähnlichen Sicherheitsprofil wie weitere S1P Regulatoren, und wird wahrscheinlich künftig eine Medikation für SPMS darstellen (Kappos L *et al. Lancet.* 2018).

Im März 2019 wurde Siponimod in den USA für die Behandlung von Erwachsenen mit MS, einschließlich Patienten mit klinischem isolierten Syndrom (KIS), RRMS und aktiver SPMS, genehmigt. Im Januar 2020, wurde Siponimod in der Europäischen Union für die Behandlung von Erwachsenen mit SPMS mit einer aktiven Erkrankung genehmigt, bei denen die aktive Erkrankung durch Rezidiven oder Tomographien basierend auf der entzündlichen Aktivität, nachgewiesen wurde (Kipp M. *Cells.* 2020).

Siponimod moduliert insbesondere S1P1 in den Lymphozyten und verhindert den Eintritt der Lymphozyten in dem Gehirn. Sowohl S1P1 als auch S1P5 sind in den Gehirnzellen, wie Nervenzellen, Mikroglia (S1P1), Astrozyten (S1P1, S1P3) und Oligodendrozyten (S1P1, S1P5), weit exprimiert (Groves A *et al. J Neurol Sci.* 2013; Behrangi N *et al. Cells.* 2019). Für S1P1 Agonisten, wurde die Verminderung der Anzahl von peripheren Lymphozyten als ein pharmakodynamischer Biomarker für die Wirksamkeit in Autoimmunerkrankungen verwendet (Pan S *et al. ACS Med Chem Lett.* 2013). Präklinische Studien zeigten, dass Siponimod mit den S1P1-vermittelten entzündungshemmenden Auswirkungen auf die ZNS- Lymphozyten und Gliazellen, und S1P5-vermittelten Reparaturauswirkungen auf Oligodendrozyten verbunden ist, und auf diese Weise werden die S1P3,4-

vermittelten pro-entzündlichen Auswirkungen auf Astrozyten ausgelöst (Bigaud M. *et al.* Neurology. 2020). Andere Effekte von Siponimod sind die funktionelle Regulation der Gliazellen und die Verminderung der Demyelinisierung, sowie die Reduktion der zirkulierenden Monozyten unabhängig von der S1P3 Aktivität (Lewis ND *et al.* J Immunol. 2013). Jedoch wird auch S1P5 in Oligodendrozyten und ihren Vorläufer-Zellen exprimiert. Deswegen könnte es einerseits die Myelinreparatur (i.e., Remyelinisierung) verändern, andererseits könnte es das Überleben der Oligodendrozyten in einem entzündlichen Umfeld fördern (Kipp M. *et al.* Mult. Scler. J. 2012).

Siponimod stellt einen signifikanten therapeutischen Fortschritt dar, der das Fortschreiten des Krankheitsverlaufs im Vergleich zu anderen Therapien in einer EXPAND-like Population mit SPMS verbessern kann. (Samjoo IA. *et al.* Curr Med Res Opin. 2020).

1.7. Hypothesen und Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen meiner Forschungsarbeit sollten die folgenden Arbeitshypothesen untersucht werden:

1. Hat Siponimod eine entzündungshemmende und neuroprotektive Wirkung bei sekundär progressiver MS?
2. Verhindert Siponimod die Ausbreitung der Demyelinisierung?

Ziel dieser Arbeit war, die Funktion von Siponimod im Rahmen der MS-Pathologie besser zu verstehen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Puffer, Blockseren und Färbelösungen

Tris-EDTA Puffer:

6,05 g Tris
1,85 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat
Ad 5l destilliertes Wasser
pH auf 9.0 einstellen

Citratpuffer:

10,5 g Citronensäure (ROTH X863.2)
Ad 5l Aqua Dest.
pH auf 6.0 einstellen

PBS (1x Fertiglösung):

500 ml PBS (10x Stocklösung)
4500 ml destilliertes Wasser
pH auf 7.4 einstellen

PBS (10x Stocklösung):

477.75 g PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Ad 5l destilliertes Wasser

5% Normal Goat Serum für 50 ml

Verdünnung 1:20
2,5 ml Normal Serum
47,5 ml PBS (1x)

Peroxidase Block mit 0.3% H_2O_2 in PBS

Verdünnung 1:100
1 ml H_2O_2 (30% vol/vol)
99 ml PBS

Sekundärer Antikörper für 1000 μl Lösung

Verdünnung 1:200
995 μl 5% Normal Serum
5 μl Sekundärer Antikörper

ABC-System (Vectastain Elite Kit – PK 6100) für 1400 μl Lösung

Verdünnung 1:50 für A + B
1344 μl PBS
28 μl Flüssigkeit A des Elite ABC-Kit (VECTASTAIN Elite Kit – PK-6100)
28 μl Flüssigkeit B des Elite ABC-Kit (VECTASTAIN Elite Kit – PK-6100)

DAB (working solution)

Verdünnung 1:50
28 μl DAB Stock
1372 μl DAB Substrat

2.2. Versuchstiere

Für diese Untersuchung wurden 10 Wochen alte weibliche C57BL6/J-Mäuse (n=63) (Janvier/Frankreich) verwendet. Es wurden alle geltenden Tierschutzbestimmungen und Richtlinien bei Tierversuchen eingehalten. Gemäß §8 des Tierschutzgesetzes wurde die Durchführung der Tierversuche genehmigt und den ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) Richtlinien entsprechend gemeldet (Kilkenny *et al.* PLoS Biol. 2010). Die Studien wurden von den entsprechenden Landesbehörden genehmigt (Regierung Oberbayern, #55.2-154-2532-73-15 und Regierung Mecklenburg-Vorpommern, #7221.3-1-001/19).

Die Mäuse wurden nach standardisierten Laborbedingungen gemäß der Organisation „Federation of European Laboratory Animal Science Association's (FELASA)“ zu dritt oder zu viert in gut belüfteten Käfigen gehalten. Ein Käfigwechsel erfolgte einmal pro Woche und Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Haltung erfolgte bei konstanter Raumtemperatur von 24 °C ± 1°C und einem hell-dunkel Zyklus von 12:12 Stunden. Die Versuche wurden durch Mitarbeiter des Instituts für Anatomie- Universität Rostock durchgeführt.

2.2.1. Versuchsgruppen und Experimentelles Design

Das Experiment wurde in 3 Abschnitte eingeteilt: Experiment 1 (E1), Experiment 2 Teil 1 (E2.1) und Experiment 2 Teil 2 (E2.2). In jedem Teil gab es eine Gruppe mit Kontrollmäusen.

2.2.1.1. Experiment 1

Die Mäuse (n=18) wurden zunächst über 2 Wochen ausschließlich mit 0,25% Cuprizone-Futter gefüttert. Jeden Tag wurde das Cuprizone-Futter frisch angesetzt. Für die Vorbereitung des Futters wurden 0,5 g Cuprizone mit 200 g pulverisierten Standard-Futter gemischt (Slowik A *et al.* Br J Pharmacol. 2015 Hochstrasser T *et al.* J Mol Neurosci. 2017). Cuprizone wurde mithilfe einer Präzisionswaage gewogen. Eine Küchenmaschine (Kult X, WMF Group, Geislingen an der Steige, Germany) wurde für die mechanische Mischung verwendet. Das Futter wurde am Anfang bei niedriger Geschwindigkeit gemischt und danach für 1 Minute manuell gerührt (Yakimov V *et al.* Histochem Cell Biol. 2019).

Während der Cuprizone-Intoxikation wurden die Mäuse täglich entweder mit Vehikel (n=9) oder Siponimod (n=9) (3, 125 mg / kg) über eine orale Sonde behandelt.

Die Immunisierung aller Mäuse (n=18) erfolgte durch die subkutane Injektion einer Emulsion von MOG35-55-Peptid, das in komplettem Freund-Adjuvant suspendiert was (Emulgator, Paraffinöl und inaktivierte Tuberkulosebakterien) (**Abb.1**). Am Tag der Immunisierung und 24 Stunden danach erfolgte die intraperitoneale Applikation von Pertussis-Toxin PBS (Yakimov V *et al.* Histochem Cell Biol. 2019). Für die MOG35-55 Immunisierung wurde ein kommerzieller Kit verwendet (Hooke Laboratories, USA). Für das Experiment 1 gab es eine Gruppe mit Kontrollmäusen (n=3).

2.2.1.2. Experiment 2 Teil 1

Die Mäuse (n=18) wurden in diesem Telexperiment 3 Wochen lang mit Cuprizone (0,25%) behandelt, wie oben beschrieben. Während der Cuprizone-Intoxikation wurden die Mäuse täglich entweder mit Vehikel (n=9) oder Siponimod (n=9) (3, 125 mg / kg) über eine orale Sonde behandelt.

Danach bekamen alle Mäuse (n=18) über einen Zeitraum von 2 Wochen normales Haltungsfutter in gleicher Menge (autonome Läsionprogression) (**Abb.1**). Für Experiment 2 Teil 1 gab es eine Gruppe mit Kontrollmäusen (n=3).

2.2.1.3. Experiment 2 Teil 2

Analog der E.2.1-Gruppe wurden die Mäuse (n=18) 3 Wochen lang mit Cuprizone 0,25% intoxikiert und täglich entweder mit Vehikel (n=10) oder Siponimod (n=8) (3, 125 mg / kg) über eine orale Sonde behandelt. Die nächsten 2 Wochen wurden alle Mäuse (n=18) mit normalem Haltungsfutter gefüttert. Im Unterschied zur E2.1-Gruppe wurden alle Mäuse (n=18) nach eintägiger Pause mit MOG35-55-Peptid immunisiert, wie oben beschrieben (**Abb.1**). Für die E2.2-Gruppe gab es gleichfalls eine Gruppe mit Kontrollmäusen (n=3).

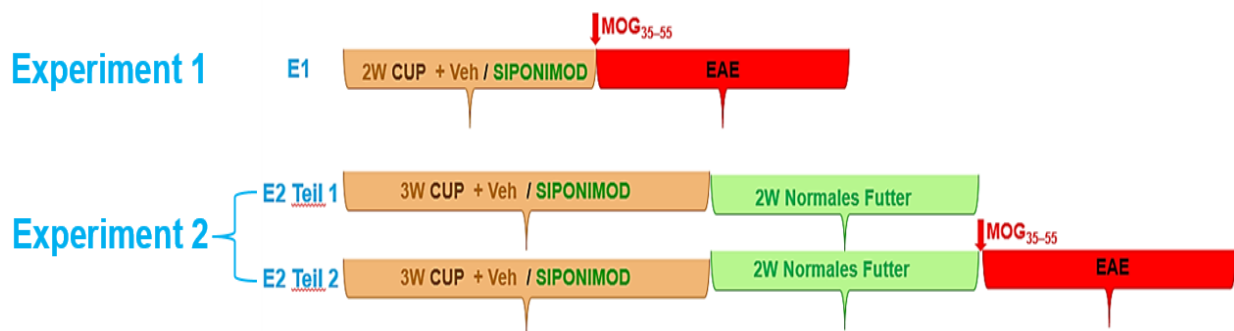


Abb. 1: Der Versuchsaufbau

2.2.2. Klinische Beurteilung der Mäuse (Scoring)

Die Mäuse der E1- und E2.2-Gruppe wurden nach der MOG35-55-Immunsierung täglich klinisch mithilfe einer standardisierten EAE-Skala (Scoring) beurteilt (Ortega SB et al. J Immunol. 2013; York NR et al. J Autoimmun. 2010).

Es wurden Scoring-Werte auf einer Skala von 1 bis 4 vergeben (**Tab. 1**). Die klinische Symptomatik umfasst eine progressive Lähmung des Schwanzes, der hinteren Extremitäten, gefolgt von einer

Lähmung der vorderen Extremitäten bis hin zum Exitus letalis (Tötung der Mäuse). Aus ethischen Gründen wurden in diesen Experimenten (E1 und E2.2) Mäuse mit einem Score von 4 aus dem Versuch genommen.

Tab. 1: Klinische Beurteilung (Scoring) der MOG35-55-immunisierten Mäuse

Score	Klinische Zeichen
1,0	Lähmung des kompletten Schwanzes
1,5	Beginnende Lähmung der hinteren Extremitäten
2,0	Schwäche der hinteren Extremitäten und Ataxie
2,5	Komplette Lähmung einer der Hinterbeine oder fast vollständige Lähmung beider hinterer Extremitäten
3,0	Vollständige Lähmung beider hinteren Extremitäten (Paraplegie)
3,5	Vollständige Paraplegie; das Tier kann nicht aufstehen
4,0	Partielle Lähmung der vorderen Extremitäten
4,5	Minimale Bewegung; Apathie
5,0	Tötung der Maus

2.3. Transkardiale Perfusion

Am Versuchsende wurden die Mäuse narkotisiert. Dafür wurde ein Ketamin (100 mg/kg i.p.) - Xylazin (10 mg/kg i.p.) - Gemisch intraperitoneal verabreicht. Die Tötung der zuvor betäubten Mäuse erfolgte über eine transkardiale Perfusion. Die Fixierlösung wurde am Tag der Perfusion hergestellt. Die transkardiale Perfusion wurde durch Infusion von eiskaltem PBS, gefolgt von einer Perfusionslösung mit 3.7% Paraformaldehyd (PFA) (pH=7.4), durchgeführt (**Tab. 2**). Das Herz der Maus wurde dafür freigelegt, ein kleines Loch in den rechten Ventrikel oder das Atrium geschnitten, eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt und das Tier mit der Perfusionslösung transkardial perfundiert. Auf diese Weise war eine schnelle und effektive Fixierung des gesamten Tieres sichergestellt.

Tab. 2: Herstellung der Perfusionslösung (für 1 Liter Fixierungslösung)

Menge	Chemikalie
100 ml	Formaldehyd 37%
900 ml	Destilliertes Wasser
4.6 g	Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)
8.0 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

Die Tötung erfolgte bei der E1-Gruppe nach ca. 4 Wochen (2 Wochen Cuprizone Intoxikation mit gleichzeitiger Siponimod/ Vehikel Behandlung und ca. 12 Tage nach der MOG35-55 Immunisierung, im Krankheitsmaximum). Bei der E2.1- Gruppe wurde der Versuch nach 5 Wochen (3 Wochen

Cuprizone Intoxikation mit gleichzeitiger Siponimod/ Vehikel Behandlung und 2 Wochen normalem Futter) beendet. Im Falle der E2.2-Gruppe erfolgte die Tötung der Mäuse nach ca. 7 Wochen (3 Wochen Cuprizone Intoxikation mit gleichzeitiger Siponimod/ Vehikel Behandlung, 2 Wochen normalem Futter und ca. 12 Tage nach der MOG35-55 Immunisierung, im Krankheitsmaximum).

2.4. Paraffineinbettung und untersuchte Hirnregion

Nach der Fixierung der Versuchstiere wurde die Schädelkalotte sagittal gespalten und das Gehirn entnommen. Die Präparate wurden in der gleichen Perfusionslösung (Tab. 2) über Nacht bei 4°C postfixiert und am folgenden Tag für ca. 12 Stunden in Leitungswasser gewässert, danach für 12 h in 50% Ethanol inkubiert, anschließend manuell dehydriert und dann in Paraffinblöcke eingebettet (**Tab. 3**). Nach der Einbettung wurden die Präparate in heißem, flüssigem Paraffin eingeblockt. Die Gehirne wurden so ausgerichtet, dass sich eine koronare Schnittebene ergab.

Tab. 3: Paraffineinbettung

Chemikalie	Zeit
Fixierungslösung (4°C)	24h
Fließendes Leitungswasser	12h
50% Ethanol (4°C)	12h
70% Ethanol	40 min
70% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
100% Ethanol	40 min
100% Ethanol	60 min
100% Ethanol	60 min
Xylol	40 min
Xylol	40 min
Xylol	40 min
Paraffin	60 min
Paraffin	60 min
Paraffin	2 Tage

Nach der Fixierung, der Einbettung und der vollständigen Aushärtung der Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica) 5 µm dicke Schnittserien angefertigt. Die Gehirne wurden bis zur Region 265 (**Abb. 2**) angeschnitten.



Abb. 2: Untersuchte Hirnregion: Region 265
<http://atlas.brain-map.org>

2.5. Allgemeine Prinzipien der Färbungen

Für die Untersuchung der beiden Hypothesen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl immunhistochemische als auch histologische Färbungen der Paraffin-eingebetteten Schnitte für alle drei Gruppen (E1, E2.1 und E2.2) durchgeführt (**Tab. 4**).

Die Demyelinisierung bzw. Remyelinisierung wurden mithilfe der LFB-PAS-Färbung (Luxol Fast Blue/Periodic-Acid-Schiff-Färbung) und der anti-PLP-Färbung (Myelin proteolipid protein) visualisiert. Die akuten axonalen Schäden wurden aufgrund der anti-APP-Färbung (Amiloid precursor protein) beurteilt. Die experimentell im Bereich der applizierten Substanzen ausgelöste Aktivierung der Gliazellen wurde folgendermaßen untersucht: Die anti-GFAP-Färbung (Glial fibrillary acidic protein) wurde für die Visualisierung der Astrozyten verwendet und die anti-IBA1-Färbung (Ionized calcium binding-adaptor molecule 1) für die Mikroglia. Eine mögliche Rekrutierung peripherer Immunzellen wurde durch CD3- und CD4-spezifische, immunhistochemische Färbungen detektiert, die Lokalisierung und Quantifizierung der perivaskulären Infiltrate mithilfe der H&E-Färbung visualisiert (**Tab. 4**).

Tab. 4: Histologische und immunohistochemische Färbungen

Histologische Färbungen	Visualisierung
Hematoxylin und Eosin (H&E)	Lokalisierung und Quantifizierung der perivaskulären Infiltrate.
Luxol Fast Blue (LFB)	Myelinisierung
Immunohistochemische Färbungen	Visualisierung
Myelin proteolipid protein (PLP)	Demyelinisierung
Anti-amiloid precursor protein antibody (APP)	Akute axonale Schädigung
Anti-glial fibrillary acidic protein antibody (GFAP)	Astrozyten
Anti-ionized calcium binding-adaptor molecule 1 antibody (IBA1)	Mikroglia
CD3	Untersuchung einer möglichen Rekrutierung peripherer Immunzellen über das Plexus choroideus stroma direkt im periventriculären Gehirnparenchym
CD4	T-Helferzellen im ZNS

2.5.1. Histologische Färbungen

2.5.1.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (H&E) ist eine der verbreiteten histologischen Routine-Färbungen, die einen Überblick über die Struktur des Gewebes gibt. Sie ermöglicht die Unterscheidung der untersuchten Strukturen in normales oder pathologisches (bzw. entzündlich- oder degenerativ-verändertes) Gewebe. Hämatoxylinlösungen färben die Zellkerne (blau, dunkelviolet bis schwarz), Eosinlösungen das Zytoplasma (rötlich-violett).

Das H&E Färbeprotokoll ist in **Tab. 5** zusammengefasst. Zuerst werden die Schnitte entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die selektive Kernfärbung wird mit Mayers Hämalaun, einen bei niedrigem pH-Wert positiv geladenen Metall-Hämalaun-Komplex zwischen Hämatoxylin und Aluminiumionen, durchgeführt. Der Metall-Hämalaun-Komplex verbindet sich im sauren Milieu mit den basophilen Strukturen im Zellkern, der dadurch rot-braun gefärbt wird. Der pH-Wert wird durch das Bläuen mit Leitungswasser angehoben und die typische blau-violette Farbe wird erworben. Für die Zytoplasmafärbung wird danach Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig verwendet. Eosin ist ein negativ geladener, saurer Farbstoff, der hauptsächlich an azidophile Strukturen der Proteine bindet, und diese

rötlich färbt. Nach der H&E Färbung werden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Anschließend werden die Schnitte eingedeckt.

Tab. 5: Das H&E Färbeprotokoll

Arbeitsschritt	Chemikalie	Zeit
Entparaffinieren	Xylol I	10 min
	Xylol II	10 min
Rehydrieren durch absteigende Alkoholreihe	100% Ethanol	1 min
	100% Ethanol	1 min
	96% Ethanol	1 min
	90% Ethanol	1 min
	80% Ethanol	1 min
	70% Ethanol	1 min
	Destilliertes Wasser	3 min
Färben in Mayers Hämalaun Lösung	Hämalaunlösung sauer nach Mayer	7 min
Spülen	0,1% HCl Lösung	kurz (2 sec)
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	20 min
Mikroskopische Kontrolle		
Spülen	Destilliertes Wasser	kurz (2 sec)
Färben in Eosin G-Lösung	Eosin G (0,5% wässrige Lösung)	2 sec (wenn die mikroskopisch kontrollierte Farbe intensiv ist) oder 45 sec (wenn die Farbe blass ist)
Dehydrieren durch aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung zum Eindecken	70% Ethanol	7 min
	80% Ethanol	kurz
	90% Ethanol	kurz
	100% Ethanol	1 min
	100% Ethanol	1 min
	Xylol I	10 min
	Xylol II	10 min
Eindecken mit DePex		
Die Schnitte werden über Nacht unter dem Abzug getrocknet		

2.5.1.2. Luxol-Fast-Blue/ Periodic-Acid-Schiff Färbung

Der Farbstoff LFB (Luxol-Fast-Blue) zeigt eine spezifische Affinität zu Neurokeratin, sodass diese Methode zur blauen Anfärbung der Myelinscheiden verwendet wird. Luxol Fast Blue ist ein in Alkohol löslicher Kupferphthalocyaninfarbstoff, der an Basen bindet, die in den Lipoproteinen der Myelinscheide enthalten sind. Je nach Grad der Demyelinisierung im ZNS kann dies mithilfe der LFB-Färbung sehr analysiert werden.

Die PAS-Reaktion (engl. Periodic-Acid-Schiff) ist ein histochemischer Nachweis von Kohlenhydraten (Polysaccharide, Glykoproteine). Aufgrund der Perjodsäure werden nicht substituierte 1,2-Glykole zu Aldehyden oxidiert (Dubray G *et al.* Anal Biochem. 1982). Diese Aldehyde reagieren dann mit dem Schiffschen Reagenz (Fuchsin-schweflige Säure) wobei der Farbstoff Fuchsin freigesetzt wird und Kohlenhydrat-reiches Gewebe rosa anfärbt.

Die Kombination zwischen LFB-Färbung und PAS-Rektion stellt eine der nützlichsten und zuverlässigsten Methode zum Nachweis pathologischer Prozesse im ZNS, einschließlich der Demyelinisierung, dar. Idealerweise sollte sich die weiße Substanz blau und die graue Substanz rosa anfärben. Das Färbeprotokoll ist in **Tab. 6** zusammengefasst. Eine lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte nach der Differenzierung Jeder Schnitt.

Tab. 6: Das LFB/ PAS Färbeprotokoll

Arbeitsschritt	Chemikalie	Zeit
Tag 1		
Entparaffinieren und Rehydrieren durch absteigende Alkoholreihe	Xylol I	10 min
	Xylol II	10 min
	Xylol III	5 min
	Xylol 50% / Ethanol 50%	5 min
	Ethanol 100%	3 min
	Ethanol 100%	3 min
	Ethanol 96%	3 min
	Ethanol 96%	3 min
Inkubation in der LFB-Lösung bei 63°C	LFB- Lösung	12 h
Tag 2		
Spülen	96% Ethanol	kurz
	Destilliertes Wasser	kurz
Differenzierung I	0,05% (w/v) Lithiumcarbonat (0,05 g Lithiumcarbonat + 100 ml destilliertes Wasser) (Verdünnung 1:5)	10 sec
Auswaschen der Farbe	70% Ethanol	10 min
	destilliertes Wasser	kurz

Mikroskopische Kontrolle (wenn die blaue Farbe zu intensiv ist, Wiederholung des Differenzierungs I- und Auswaschens- Schrittes)		
Differenzierung II	0,05% Lithiumcarbonat (Verdünnung 1:10)	10 sec
Auswaschen der Farbe	70% Ethanol	10 min
	destilliertes Wasser	kurz
Mikroskopische Kontrolle (falls die blaue Farbe zu intensiv ist, Wiederholung des Differenzierungs II- und Auswasch-Schrittes bis zum optimalen Kontrast zwischen Myelin und anderen Strukturen)		
PAS-Gegenfärbung	0,5% Perjodsäure Lösung (1,5 g Perjodsäure + 300 ml destilliertes Wasser)	2 min
Spülen	destilliertes Wasser	kurz
Schiff'sche Probe	Schiff'sches Reagenz	45 sec für jeden Schnitt
Bläuen (das Gewebe färbt sich rosa außer Myelin)	Fließendes Leitungswasser	5 min
Schiff'sches Reagenz Qualitäts Kontrolle (wenn die Schnitte nicht rosa gefärbt sind, nochmals 1 min mit Schiff'schem Reagenz inkubieren und wieder mit fließendem Leitungswasser bläuen)		
Spülen	destilliertes Wasser	kurz
Zellkern-Gegenfärbung	Hämatoxylin-Lösung	15 sec
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	5 min
Dehydrieren durch aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung zum Eindecken	80% Ethanol	3 min
	96% Ethanol	3 min
	100% Ethanol	5 min
	100% Ethanol	5 min
	Xylol 50% / Ethanol 50%	5 min
	Xylol I	10 min
	Xylol II	10 min
Eindecken mit DePex		
Die Schnitte werden über Nacht unter dem Abzug getrocknet		

2.5.2. Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie (IHC) stellt eine besonders sensitive Methode dar, um spezifische Antigene im untersuchten Gewebe mithilfe spezifischer Antikörper nachzuweisen. Bei der indirekten Methode einer IHC Färbung handelt es sich um den indirekten Nachweis von Antigenen mithilfe der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (ABC-Methode): Zunächst bindet der Primärantikörper (monoklonal oder

polyklonal) an das gesuchte Antigen im Gewebe und wird anschließend seinerseits von einem biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Der Sekundärantikörper ist gegen die Spezies gerichtet, in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde. Zur Detektion bindet Avidin an den biotinylierten Sekundärantikörper, es entsteht ein Avidin-Biotin-Komplex. Die an Avidin gebundene HRP (engl. „Horseradish“-Peroxidase/ Meerrettichperoxidase) katalysiert nach Zugabe des chromogenen DAB-Komplexes in Anwesenheit von H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) die Umsetzung eines phenolischen Substrates in dessen unlösliche Form. Diese Reaktion resultiert in einer deutliche Braunfärbung.

2.5.2.1. Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Die mit IHC detektierten Antigene sind in **Tab. 4 und 7** zusammenfasst, die Sekundärantikörper in **Tab. 8**. Das gleiche Färbeprotokoll (**Tab. 9**) wurde für alle immunhistochemischen Färbungen verwendet. Am ersten Tag wurden die Paraffin-Schnitte vor jeder Färbung mit Xylol entparaffiniert und mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Es folgte die Antigen-Demaskierung nach der HIER Methode (Heat Induced Epitope Retrieval): Die Schnitte wurden in einer Tris/EDTA-Lösung in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht und ca. 12 Min. gekocht (2 Min. volle Leistung, 10 Min Low-Power), um durch die Formalin-Fixierung entstandene Protein-Verbindungen (sog. „crosslinks“/ maskierte Antigene) zu lösen und die Bindungsstellen für den Antikörper freizulegen. Die Schnitte wurden anschließend unter fließendem kaltem Leitungswasser auf Raumtemperatur abgekühlt und 3-mal für 5 Minuten unter leichtem Schütteln in Phosphatpufferlösung (PBS) gewaschen.

Um die Austrocknung der Schnitte während der Inkubationszeit zu vermeiden, wurde für die nächsten Schritte eine feuchte Kammer verwendet. Die Blockierung mit 5% normalem Ziegenerum für 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgte, um unspezifischen Bindungen und eine Hintergrundfärbung zu reduzieren. Anschließend wurden die Schnitte leicht abgeklopft und der in 5% normalem Ziegenerum verdünnte Primärantikörper auf alle Schnitte außer den Negativkontrollen appliziert. Die entsprechenden Verdünnungen und die verwendeten Primärantikörper finden sich in **Tab. 7**. Die Inkubation über Nacht erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

Tab. 7: Verwendete Primärantikörper

	Primär-antikörper	Verdün-nung	Typ	Nachweis von	Firma	Bestell-nummer	Demaskie-rung
1.	Maus-anti-PLP-IgG	1:5000	monoklonal, Maus	Myelinprotein	Serotec	MCA 839G	keine
2.	Maus-anti-APP-IgG	1:5000	monoklonal, Maus	Axonale Schädigung	Millipore	MAB 348	Tris/EDTA
3.	Maus-anti-GFAP-IgG	1:500	polyklonal, Maus	Astrozyten	Sigma Aldirch	Clone GA5	Tris/EDTA

4.	Kaninchen- anti-IBA1- IgG	1:5000	polyklonal, Kaninchen	Mikroglia	Wako	019- 19741	Tris/EDTA
5.	Kaninchen- anti-CD3- IgG	1:1000	monoklonal, Kaninchen	Rekrutierung peripherer Immunzellen im ZNS	Abcam	AB 16669	Tris/EDTA
6.	Kaninchen- anti-CD4- IgG	1:1000	monoklonal, Kaninchen	T-Helferzellen im ZNS	Abcam	AB 183685	Tris/EDTA

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst 3-mal für 5 Minuten unter leichtem Schütteln in PBS gewaschen und danach für 30 Min in PBS/0,3% H₂O₂ unter leichtem Schütteln lichtgeschützt inkubiert, um die endogenen Peroxidasen zu inaktivieren und eine unspezifische Umsetzung des Substrates zu verhindern. Die Behandlung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS (3x 5 Min.) beendet, der biotinylierte Sekundärantikörper (verdünnt in 5% normalem Ziegenserum) zu allen Schnitten einschließlich der Negativkontrolle zugegeben und für 1 Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die entsprechenden Verdünnungen und die verwendeten biotinylierten Sekundärantikörper sind in (**Tab. 8**) angegeben. Anschließend wurden die Schnitte wiederum 3x für 5 min mit PBS gewaschen.

Tab. 8: Verwendete Sekundärantikörper

	Sekundärantikörper	Verdünnung	aus	Firma	Bestellnummer
	Anti-Maus IgG (biotinyliert)	1:200	Ziege	Vector	BA9200
	Anti-Kaninchen IgG (biotinyliert)	1:200	Ziege	Vector	BA1000

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde der zuvor vorbereitete Avidin-Biotin-Komplex zugegeben. Dieser darf nicht länger als 30 Min vor der Applikation hergestellt werden und muss lichtgeschützt gelagert werden. Die Schnitte wurden damit für 1 Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit PBS (3x 5 Min) unter leichtem Schütteln gewaschen und nachfolgend für 10 Minuten der DAB-Komplex unter dem Abzug bei Raumtemperatur zugegeben. Eine stattgefundenene Reaktion zeigt sich an der lokalen bräunlichen Färbung der Schnitte. Schließlich werden die Schnitte kurz mit Leitungswasser und für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte dehydriert, mit DePex eingedeckt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

Tab. 9: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbungen.

Arbeitsschritt	Chemikalien	Zeit
Tag 1		
Entparaffinieren und Rehydrieren durch absteigenden Alkoholreihe	Xylol I	10 min
	Xylol II	10 min
	Xylol III	10 min
	Xylol 50% / Ethanol 50%	5 min
	100% Ethanol	3 min
	100% Ethanol	3 min
	96% Ethanol	3 min
	96% Ethanol	3 min
	70% Ethanol	3 min
	50% Ethanol	3 min
	destilliertes Wasser	3 min
Demaskierung	Tris-EDTA-Puffer/ Citratpuffer/ Keine	12 min
Abkühlen	Fließendes Leitungswasser (kalt)	15 min
Waschen	PBS	3x5 min
Blockierung (feuchte Kammer, RT)	5% normales Ziegenserum (verdünnt in PBS)	1 h
Die Schnitte leicht abklopfen		
Zugabe des Primärantikörpers zu allen Schnitten außer der Negativkontrolle; Inkubation über Nacht in der feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank	100 µl pro Schnitt, gemäß Tab. 7	12 h
Tag 2		
Waschen	PBS	3x5 min
Blockierung der endogenen Peroxidase	0,03% H ₂ O ₂ (1 ml 30% H ₂ O ₂ + 99 ml PBS)	30 min
Waschen	PBS	3x5 min
Zugabe des Sekundärantikörpers zu allen Schnitten einschließlich für die Negativkontrolle; Inkubation in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur	95 µl pro Schnitt, gemäß Tab. 8	1 h
Waschen	PBS	3x5 min
Zugabe des Avidin-Biotin-Komplexes; Inkubation in der feuchten Kammer, bei Raumtemperatur	ABC-Kit (A + B 1:50 in PBS) 95 µl pro Schnitt	1 h

Waschen	PBS	3x5 min
Visualisierung der Reaktion (Inkubation unter dem Abzug bei Raumtemperatur)	DAB (Verdünnung 1:50)	10 min
Waschen	Leitungswasser	kurz
Waschen	Destilliertes Wasser	5 min
Dehydrieren durch aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung zum Eindecken	50% Ethanol	3 min
	70% Ethanol	3 min
	96% Ethanol	3 min
	96% Ethanol	3 min
	100% Ethanol	3 min
	100% Ethanol	3 min
	Xylol 50% / Ethanol 50%	5 min
	Xylol I	10 min
	Xylol II	10 min
Xylol III	10 min	
Eindecken mit DePex		
Die Schnitte werden über Nacht unter dem Abzug getrocknet		

2.6. Beurteilung und Methoden der Auswertung

2.6.1. Perivaskuläre Infiltrate (H&E Färbung)

Die perivaskulären Infiltrate (PVC, engl. Perivascular Cuff) sind histologisch von einer mehrschichtigen Akkumulation von Leukozyten (klein, rund, basophiler Zellkern) um das Gefäßlumen einer postkapillären Venole geprägt. Für die Visualisierung der PVC wurden H&E gefärbte Präparate verwendet. Die Quantifizierung der PVC erfolgte manuell durch Auszählung der Foci in der gesamten Hirnregion 265 (Cortex und Medulla) mithilfe von zwei unabhängigen, verblindeten Mitarbeitern (Behrangi N., Winzinger T.).

2.6.2. Myelinisierungsgrad des Corpus Callosum (LFB/PAS Färbung)

Um den Myelinisierungsgrad des Corpus Callosum beurteilen zu können wurden LFB/PAS histologisch gefärbte Präparate, in denen sich die Myelinscheiden blau und die demyelinierte Areale rosa darstellen, verwendet. Eine Quantifizierung der Myelindichte der Präparate erfolgte anhand eines Scoringystems mit Scoringwerten zwischen 1 und 4 (**Tab. 10**). Dabei entspricht der Wert 4 einer vollständigen Myelinisierung (wie bei den Kontrolltieren) und der Wert 1 einer vollständigen Demyelinisierung des Corpus Callosums. Die verblindete Einschätzung erfolgte durch zwei unabhängige Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Institutes für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock (Behrangi N., Winzinger T.).

Tab. 10: Das Scoringssystem für die Beurteilung der Demyelinisierung in den LFB/PAS gefärbten Präparaten

Score	Demyelinisierung
4	Keine Demyelinisierung: Myelinscheide ist lückenlos und dicht
3	Teilweise demyelinisiert: Myelinscheide ist aufgelockert
2	Teilweise demyelinisiert: Myelin erscheint sehr lückenhaft
1	Vollständige Demyelinisierung: kein angefärbtes Myelin erkennbar

2.6.3. Auswertung Immunohistochemie

Zur Auswertung wurden die gefärbten und verarbeiteten Schnitte mit einem Nikon ECLIPSE E200-Mikroskop (Nikon Instruments, Düsseldorf, Deutschland) digitalisiert, das mit einer Kamera (Basler acA1920-40uc) und einer speziellen Software (ManualWSI 2019, Microvisioneer, Deutschland) ausgestattet war. Die mikroskopischen Bilder wurden alle unter den gleichen Bedingungen aufgenommen, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit sicherzustellen.

2.6.3.1. Demyelinisierung, Mikrogliose und Astrogliose basierend auf Dichtemessungen

Die angefertigten mikroskopischen Bilder wurden densitometrisch mit der ImageJ-Software (Version 1.6.0. für Windows, National Institute of Health, Bethesda, MD) ausgewertet. Die Dichte der Myelinscheiden wurde in anti-PLP gefärbten Schnitten quantifiziert, die Dichte von Mikroglia-Zellen in anti-IBA1 gefärbten Schnitten, die Dichte von Astrozyten in anti-GFAP gefärbten Schnitten.

Zuerst wurden einzelne Bilder in ImageJ importiert, und die zu untersuchende Region (ROI, Region of Interest), bzw. mediales Corpus Callosum, manuell umrandet und abgespeichert. Danach erfolgte die Umwandlung der ROI in ein Graustufen-Format mithilfe der „8bit“ Funktion. Im nächsten Schritt wurde das Bild von grau zu binär mittels eines „Thresholds“ umgewandelt um die relative Dichte der ROI zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde die „Threshold-Default“ Funktion für die anti-IBA1 und anti-PLP Färbungen und das „Threshold-RenyiEntropy“ für die anti-GFAP Färbungen verwendet. Das Ergebnis wurde in Prozent der Fläche angegeben.

2.6.3.2. Quantifizierung der zellulären Reaktionen

Durch die Anzahl der APP-Sphäroide kann das Ausmaß der akuten axonalen Schädigung quantifiziert werden. Zusätzlich wird die Immunreaktion durch die Rekrutierung von CD3- und CD4-Lymphozyten in der ROI geprägt. Die mikroskopischen Bilder der anti-APP, anti-CD3 und anti-CD4 Färbungen wurden mit dem Open-Source-Programm ViewPoint Online (Version 1.0.0.9587, PreciPoint, Freising, Deutschland) analysiert. Zur Quantifizierung der Zell-/Partikeldichten wurde die ROI im medialen Corpus callosum manuell abgegrenzt und gemessen. Anschließend erfolgte die manuelle Zählung der Zielstrukturen, nämlich APP-Sphäroiden, CD3-, CD4-Lymphozyten, innerhalb der gewählten Fläche. Die Ergebnisse wurden in Anzahl der Zellen pro mm² Fläche angegeben. Die Quantifizierung erfolgte

durch manuelle Auszählung mithilfe von zwei unabhängigen verblindeten Mitarbeitern (Behrangi N., Winzinger T.).

2.6.4. Statistische Auswertung

Zur Analyse der Ergebnisse wurden die Daten der einzelnen Versuchsgruppen in das Programm GraphPad Prism (Version 5.0.1, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) übertragen und statistisch ausgewertet.

Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test, Kolmogorov-Smirnov Test, D'Agostino und Pearson omnibus normality Test auf Normalverteilung überprüft. Unterschiede zweier Versuchsgruppen (Vehikel vs. Siponimod) wurden bei Normalverteilung mittels t-Test auf Signifikanz getestet, Unterschiede mehrerer Versuchsgruppen zu einer Kontrollgruppe (Kontrolle vs. Vehikel vs. Siponimod) mittels One-Way ANOVA-Test (Turkey: Compare all pairs of columns). Waren die Werte nicht normalverteilt, so wurde der parameterfreie Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant angesehen. Die folgenden Symbole wurden verwendet, um das Signifikanzniveau anzugeben: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ns bedeutet „nicht signifikant“. Alle Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) \pm Standardfehler („Standard Error of the Mean“ (SEM)) angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Experiment 1

Nach einer 2-wöchigen Intoxikation mit Cuprizone und der gleichzeitigen Behandlung entweder mit Vehikel oder Siponimod wurden die Effekte nach Immuninduktion mit MOG35-55 evaluiert (Experiment 1, **Abb. 1**).

Eine entzündungshemmende Wirkung von Siponimod konnte nachgewiesen werden. Mäuse, die mit Siponimod behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu Mäusen, die nur das Vehikel erhalten hatten, eine verminderte Rekrutierung peripherer Immunzellen, basierend auf mit anti-CD3 und anti-CD4 gefärbten Schnitten (**Abb. 3A**). Darüber hinaus wiesen die mit Siponimod behandelten Mäuse im Vergleich zu den Vehikel-Mäusen eine geringere Anzahl von PVCs in H&E-gefärbten Schnitten auf (**Abb. 3B**). Die PVCs waren topographisch weit gestreut und im Corpus callosum, Kortex sowie subkortikal zu finden.

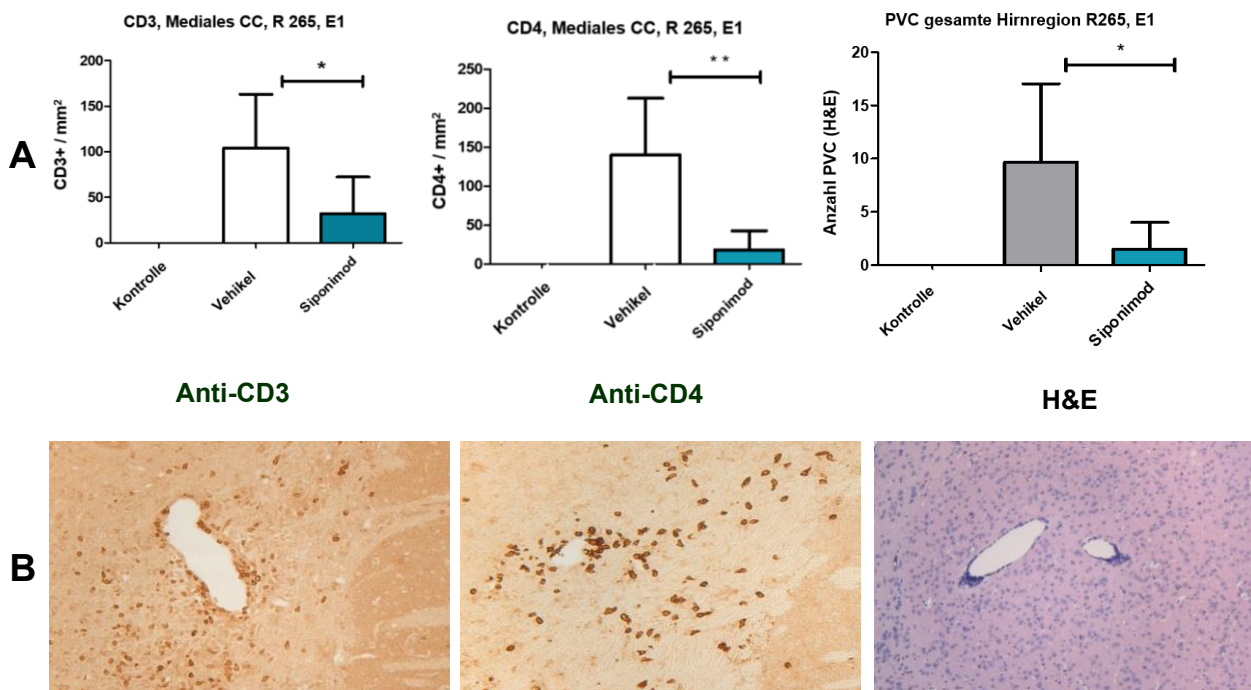


Abb. 3: Immunantwort und die perivaskulären Infiltrate nach Immuninduktion mit MOG35-55 (265) (Experiment 1)

(A) Ergebnisse nach der Immuninduktion: Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigen Siponimod-Mäuse eine signifikant geringere Anzahl an CD3-, CD4-positiven Zellen und eine geringere Anzahl an PVC. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz getestet.

(B) Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der anti-CD3 Färbung (links), anti-CD4 Färbung (Mitte) und H&E Färbung (rechts) von Vehikel-Mäusen. Eine starke Rekrutierung peripherer Immunzellen kann beobachtet werden.

Darüberhinaus zeigten die mit Siponimod-behandelte Mäuse eine geringere Dichte an GFAP-positiven Zellen in anti-GFAP Schnitten (**Abb. 4**), sowie eine geringere Dichte an IBA1-positiven Zellen. Allerdings konnte nach 2-wöchiger Cuprizone Intoxikation keine vollständige Demyelinisierung bei Vehikel-Mäusen nachgewiesen werden (**Abb. 5**). Erst 4-5 Wochen nach einer Cuprizone-Vergiftung war die akute Demyelinisierung vollständig und begleitet von einer massiven Mikrogliose, Astrozytose und Axon-Schäden (**Abb. 13**).

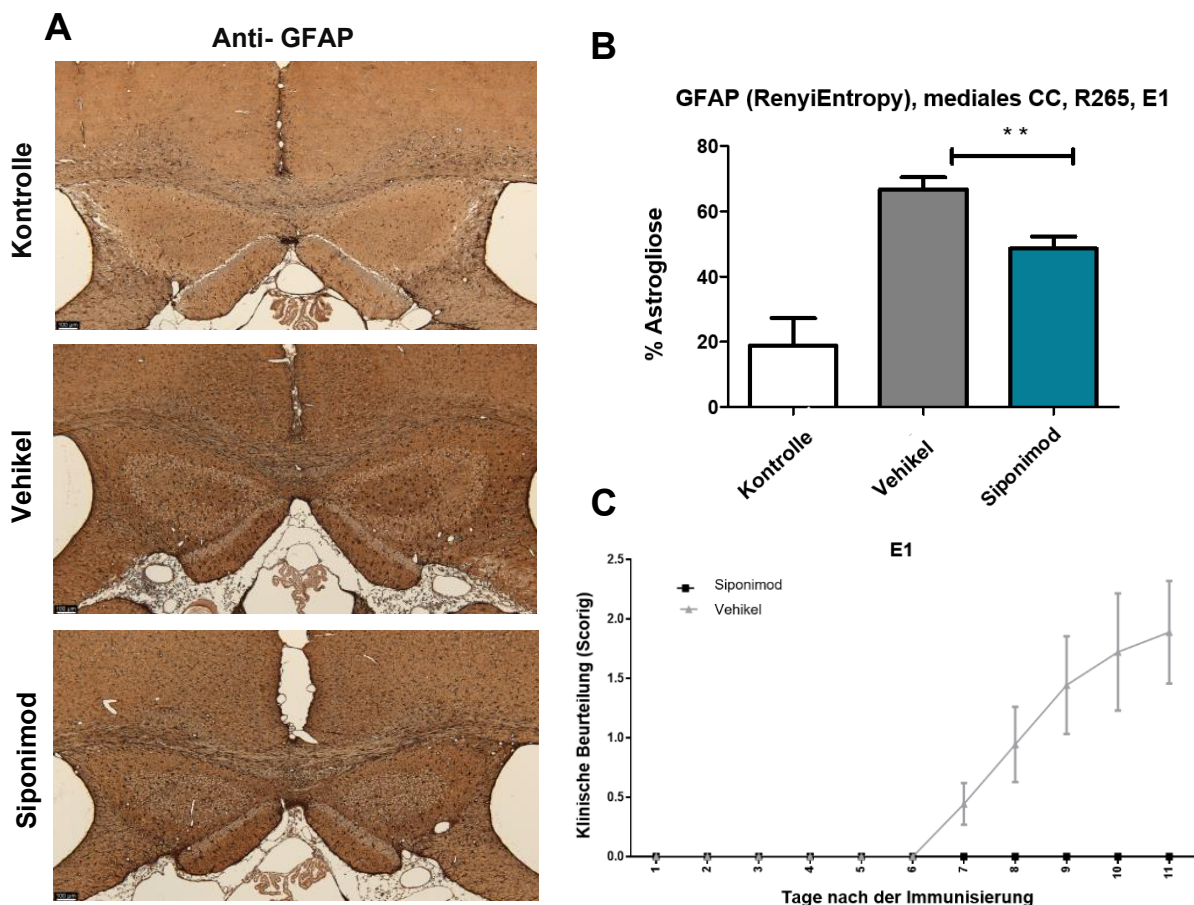


Abb. 4: Astroglialose nach Immuninduktion mit MOG35-55 R265. Klinische Beurteilung der Mäuse (Experiment 1)

(A): Repräsentative Bilder der anti-GFAP Färbung. Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an GFAP-positiven Astrozyten.

(B): Graphische Darstellung der Astroglialose. Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an GFAP-positiven Zellen. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz getestet.

(C): Klinische Beurteilung der Mäuse nach der MOG35-55 Immunisierung, gemäß des Scoringystems (**Tab. 1**). Die Symptome treten bei den Vehikel-Mäusen (graue Balken) erst nach 6-7 Tage auf und nehmen bis dem Tag 11 zu.

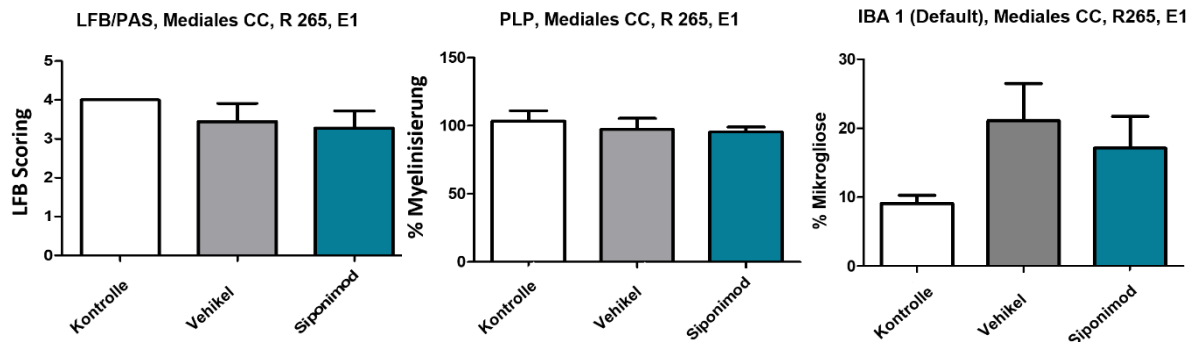


Abb. 5: Demyelinisierung und Mikrogliose ist in Vehikel-Mäusen erhöht (Experiment 1)

LFB/PAS, PLP: Nur nach zweiwöchiger Cuprizone-Intoxikation konnte bei den Vehikel-Mäusen keine vollständige Demyelinisierung erreicht werden.

IBA 1: Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine tendenziell geringere Dichte an IBA1-positiven Zellen. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz getestet.

3.2. Experiment 2 Teil 1

Im neurodegenerativen, nicht autoimmunvermittelten Cuprizone Modell der MS (Experiment 2 Teil 1, **Abb. 1**) konnte ein protektiver Effekt der Siponimod Behandlung im Vergleich zu Vehikel-Mäusen festgestellt werden.

Allerdings war erst nach 3-wöchiger Cuprizone Intoxikation, gefolgt von 2-wöchiger Ernährung mit normalem Futter – dies ist wichtig für die Progression der Läsionen - die Demyelinisierung bei Vehikel-Mäusen vollständig ausgeprägt und gut untersuchbar. Der maximale Effekt von Cuprizone trat sogar erst in der fünften Woche auf (**Abb. 13**). Es konnte eine verminderte Demyelinisierung bei den Siponimod-Mäusen nachgewiesen werden. Mit Siponimod behandelte Mäuse zeigten im Vergleich zu den Vehikel-Mäusen eine höhere Dichte an blau angefärbtem Myelin in LFB/PAS Schnitten (**Abb. 6**). Die Siponimod-Mäuse zeigten zudem eine höhere Dichte an Myelin in anti-PLP gefärbten Schnitten (**Abb. 6**).

Zusätzlich wurden sowohl eine geringere Mikrogliose und Astrogliose als auch ein geringerer akuter Axonschaden bei Siponimod Behandlung festgestellt. Die mit Siponimod behandelten Mäuse zeigten zusätzlich eine geringere Dichte an IBA1-positiven Zellen (**Abb. 7**), eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden (**Abb. 7**) und eine geringere Dichte an GFAP-positiven Zellen (**Abb. 7**).

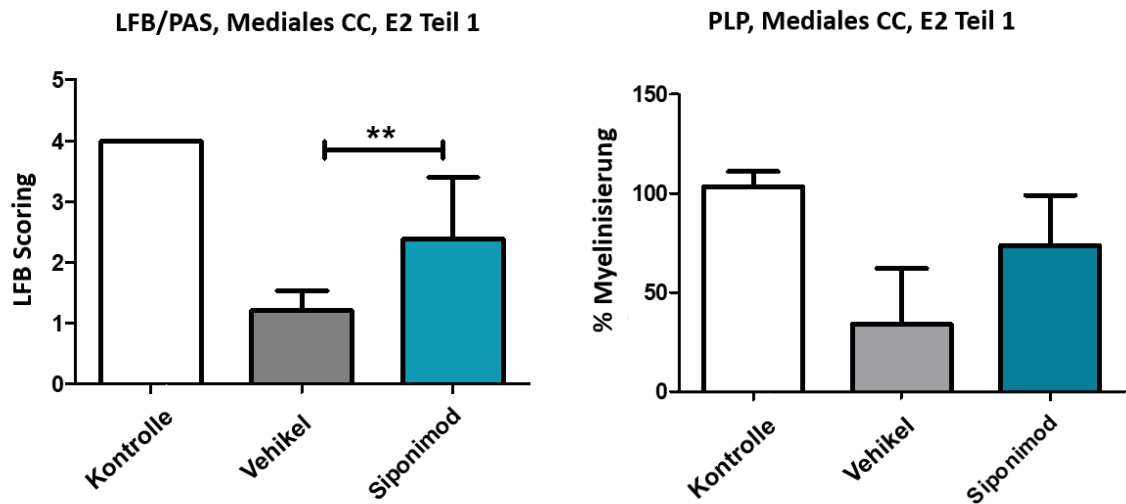
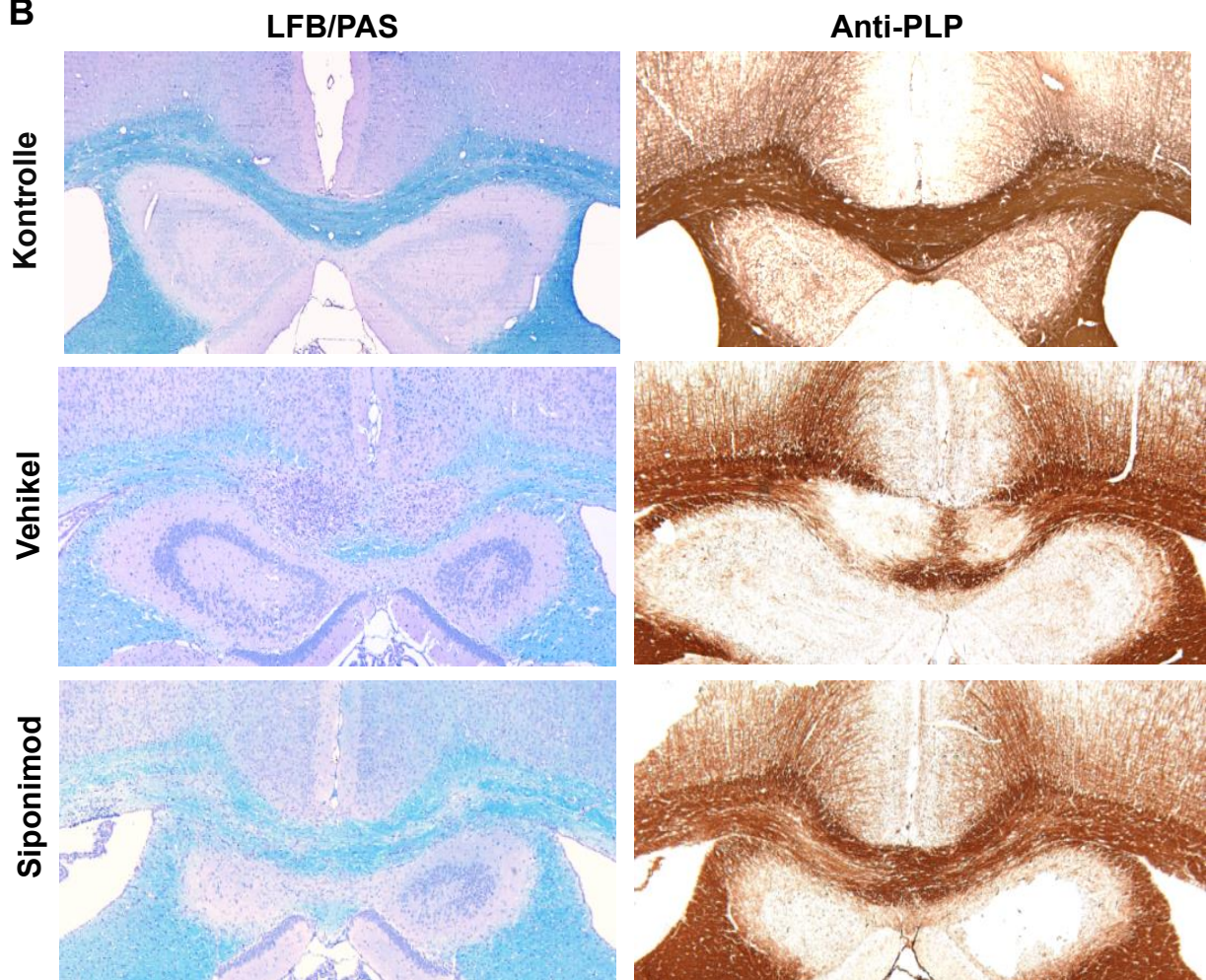
A**B**

Abb. 6: Demyelinisierung bei Vehikel-Mäusen vs. Siponimod-Mäusen. Mediales Corpus callosum, R265 (Experiment 2 Teil 1)

(A) LFB/PAS Färbung: Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigen Siponimod-Mäuse einen prozentual höheren Anteil an Myelin. **PLP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigen Siponimod-Mäuse eine höhere Dichte an PLP-positivem Myelin. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz geprüft.

(B) Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der LFB/PAS Färbung (links) und Anti-PLP Färbung (rechts);. **LFB/PAS:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse ein dichteres Netz an blau angefärbtem Myelin. **Anti-PLP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse ein dichteres Netz an braun angefärbtem Myelin.

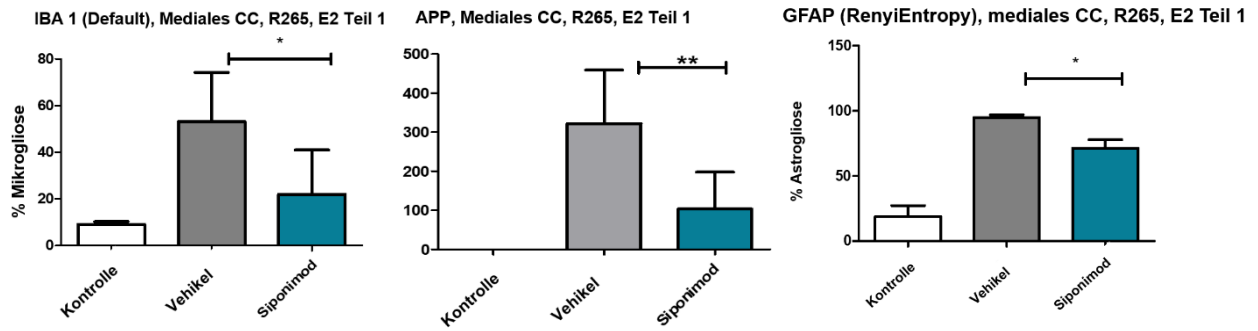
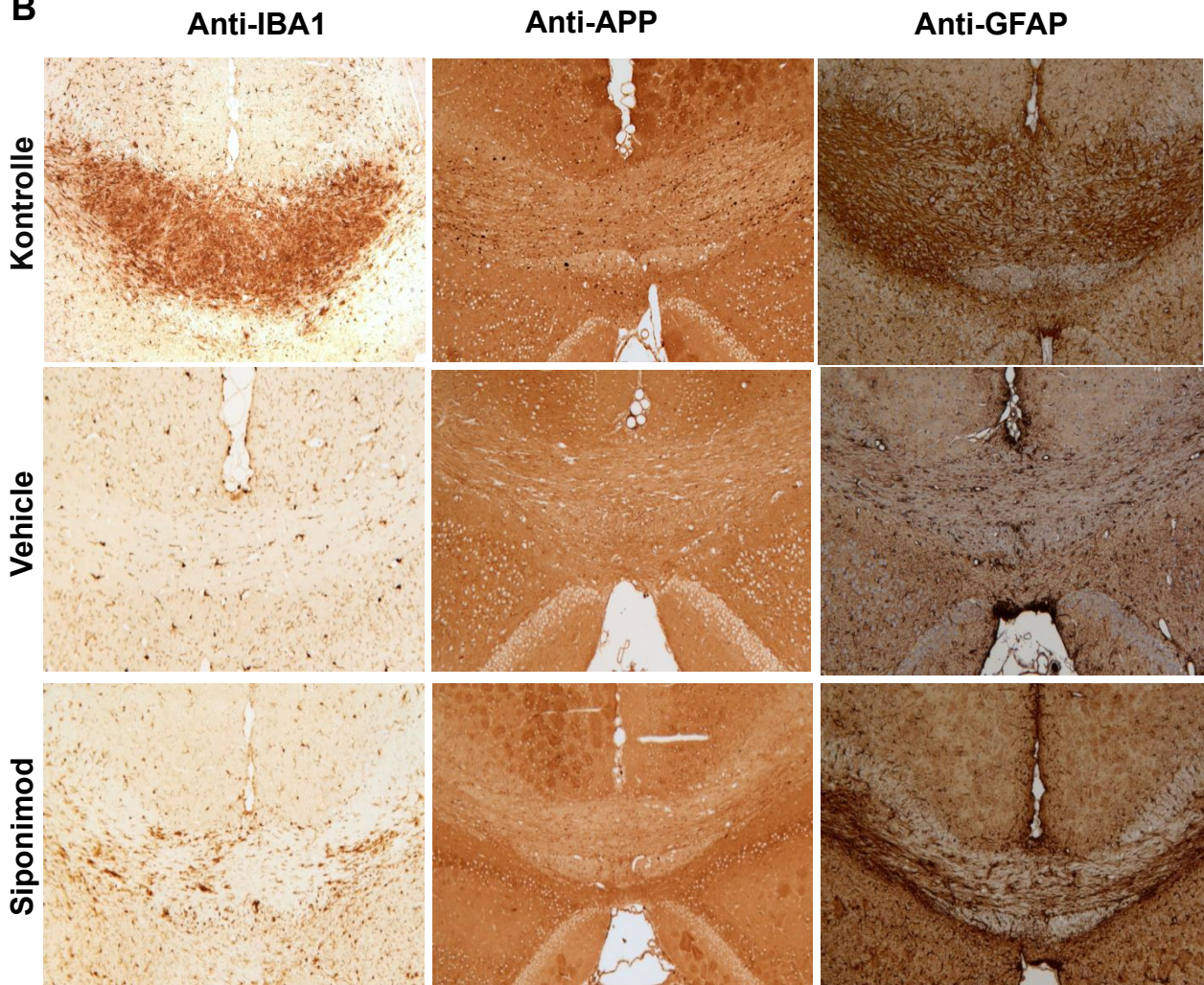
A**B**

Abb. 7: Mikrogliose, Akute Axonalschaden und Astrogliose, mediales Corpus callosum, R265 (Experiment 2 Teil 1)

(A) Ergebnisse: **IBA1:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an IBA1-positiven Zellen. **APP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden. **GFAP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an GFAP-positiven Zellen. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz getestet.

(B) Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der anti-IBA1 Färbung (links), anti-APP Färbung (Mitte) und Anti-GFAP Färbung (rechts). **Anti-IBA1:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an IBA1-positiven Mikrogliazellen. **Anti-APP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden. Die Pfeile indizieren einige APP-Sphäroide.. **Anti-GFAP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an GFAP-positiven Astrozyten.

Die Immunantwort war in Experiment 2 Teil 1 ohne MOG35-55 Behandlung nicht so stark ausgeprägt. Dementsprechend war die Anzahl an CD3⁺ und CD4⁺ Zellen niedriger im Vergleich zur Anzahl an CD3⁺ und CD4⁺ Zellen nach der MOG35-55 Behandlung (siehe Experiment 2 Teil 2 und **Abb. 9**). Trotzdem wiesen im Vergleich zu den Vehikel-Mäusen die Siponimod-Mäuse eine geringere Anzahl an CD3-, CD4-positiven Zellen und damit einen entzündungshemmenden Effekt.

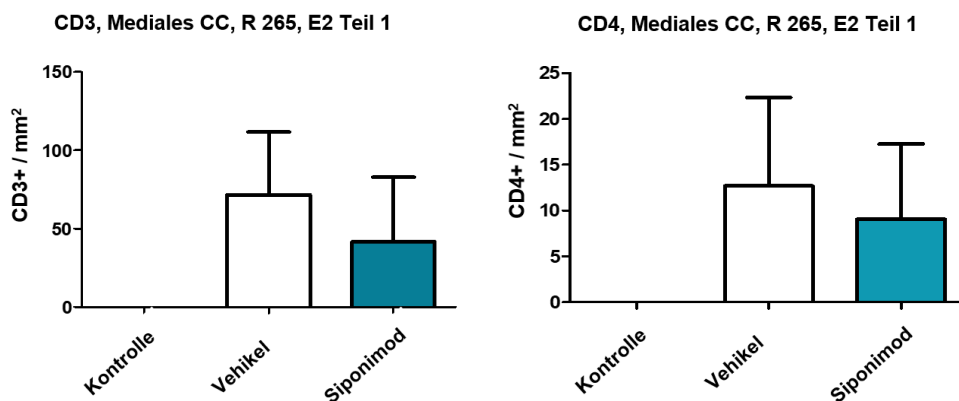


Abb. 8: CD3- und CD4-positiv Zellen ohne MOG35-55 Immunisierung, Region 265 (Experiment 2 Teil 1)

Die Siponimod-Mäuse zeigten im Vergleich zu Vehikel-Mäusen eine geringere Anzahl an CD3-, CD4-positiven Zellen. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz getestet.

3.3. Experiment 2 Teil 2

Nach 3-wöchiger Cuprizone Intoxikation und gleichzeitiger Behandlung mit Vehikel oder Siponimod, gefolgt von 2-wöchigem normalem Futter, konnte nach der 2-wöchigen Immunisierung mit MOG35-55 (**Abb. 1**) (Experiment 2 Teil 2) sowohl einen protektiven als auch einen entzündungshemmenden Effekt von Siponimod im Vergleich zu dem Vehikel nachgewiesen werden.

Eine entzündungshemmende Wirkung von Siponimod wurde festgestellt. Eine verminderte Rekrutierung peripherer Immunzellen und eine geringere Anzahl an T-Helfer Zellen wurden bei den Siponimod-Mäusen, im Vergleich zu den Vehikel-Mäusen mithilfe der Anti-CD3 bzw. der Anti-CD4 Färbungen nachgewiesen (**Abb. 9**). Die Siponimod-Mäuse zeigten zudem eine geringere Anzahl an

PVCs in H&E gefärbten Schnitten im Vergleich zu Vehikel-Mäusen (**Abb. 9**). Die PVCs waren topographisch weit verbreitet und im Corpus callosum, Kortex und subkortikal zu finden.

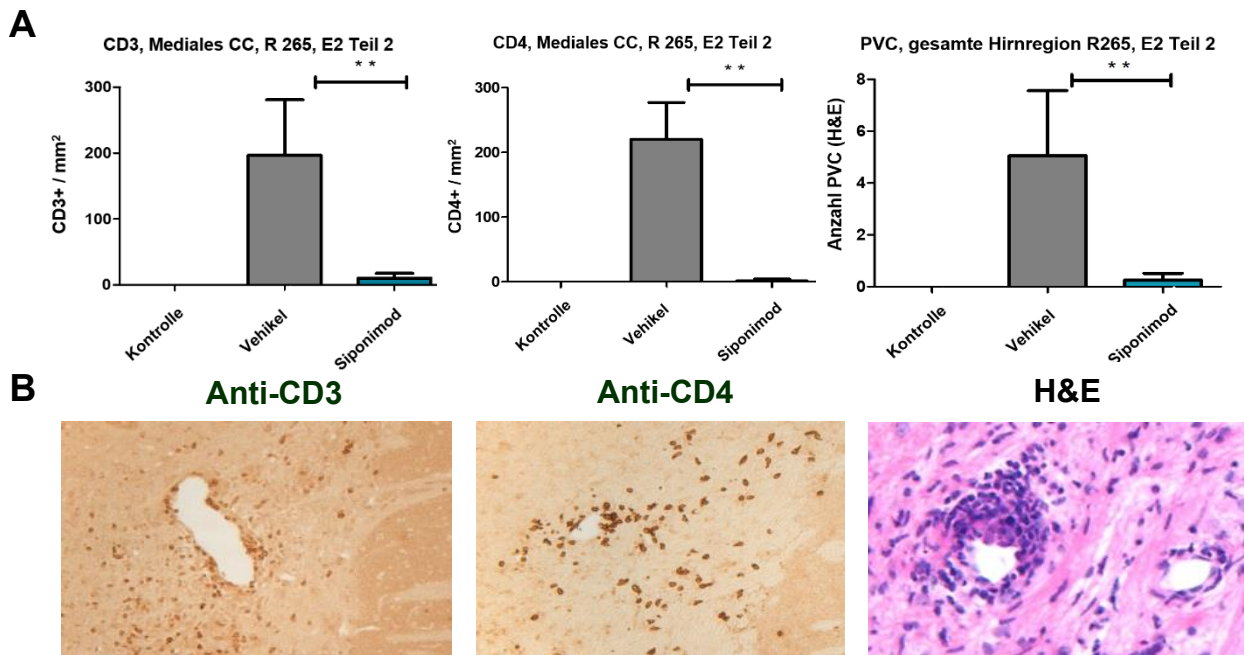


Abb. 9: Immunantwort und perivaskuläre Infiltrate nach der MOG35-55 Immunisierung, R265 (Experiment 2 Teil 2)

(A): Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Anzahl an CD3-, CD4-positiven Zellen und eine geringere Anzahl an PVC. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz getestet.

(B) Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte in anti-CD3 Färbung (links), Anti-CD4 Färbung (mitten) und H&E Färbung (rechts) von Vehikel-Mäusen. Die starke Rekrutierung peripherer Immunzellen (**Anti-CD3**), die höhere Anzahl an CD4+ Zellen (**Anti-CD4**) und an PVCs (**H&E**) kann beobachtet werden.

In Experiment 2 Teil 2 konnten sowohl verminderte akuten Axonschäden als auch eine geringere Astrogliose und Mikrogliose bei der Siponimod-Behandlung festgestellt werden. Die Siponimod behandelten Mäuse zeigten zusätzlich eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden (**Abb. 10**), eine Formatierung geringere Dichte an GFAP-positiven Zellen (**Abb. 10**) und eine geringere Dichte an IBA1-positiven Zellen (**Abb. 10**) im Vergleich zu den Vehikle-Mäusen.

Um die klinische Syptomatik nach der MOG35-55 beurteilen zu können, wurden die Tiere mithilfe eines Scoringsystems (**Tab. 1**) bewertet. Im Experiment 2 Teil 2, die Symptome treten bei den Vehikle-Mäusen erst ab den 11ten Tag auf und nehmen bis zu den 18ten Tag zu. Die Siponimod-Mäuse weisen keine Syptomatik auf (**Abb. 11**).

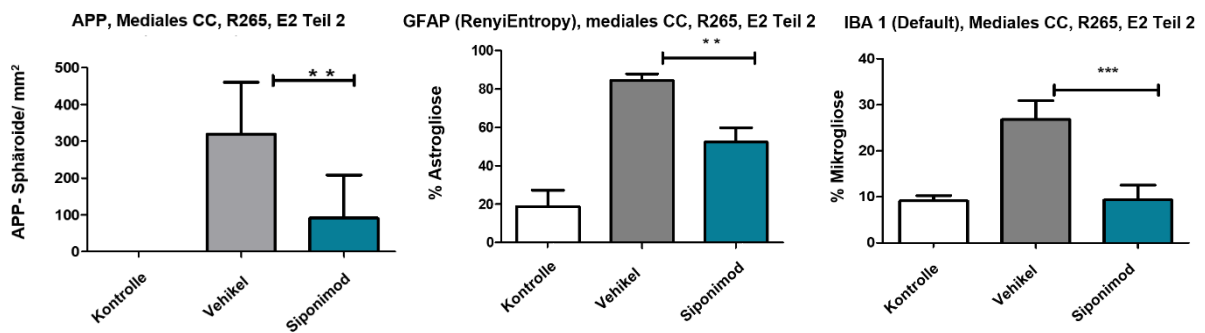
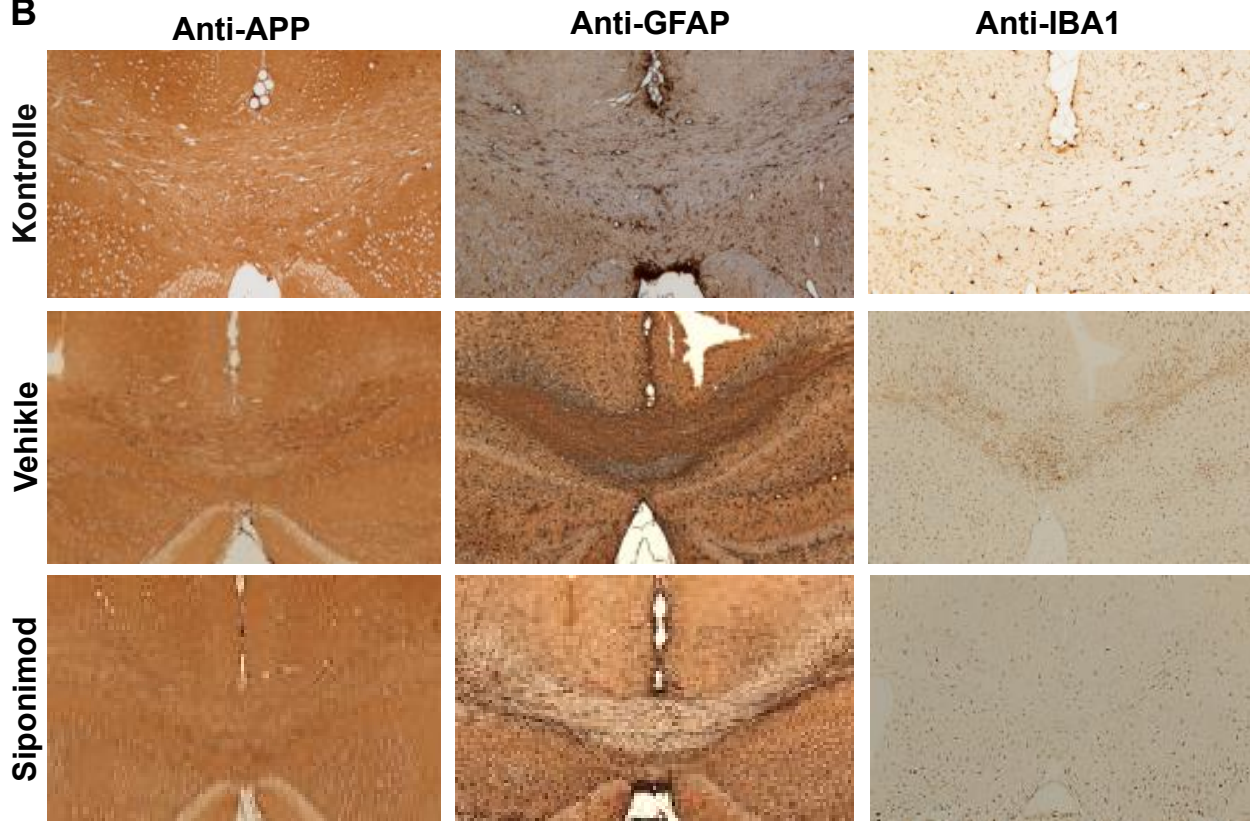
A**B**

Abb. 10: Akute Axonschäden, Astrogliose und Mikrogliose. Mediales Corpus callosum, R265 (Experiment 2 Teil 2)

(A) APP: Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden. **GFAP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an GFAP-positiven Zellen. **IBA1:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an IBA1-positiven Zellen. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz getestet.

(B) Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte nach anti-APP Färbung (links), anti-GFAP Färbung (mitten) und anti-IBA1 Färbung (rechts). **Anti-APP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden. Die Pfeile heben einige APP-Sphäroide hervor. **Anti-GFAP:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an GFAP-positiven Astrozyten. **Anti-IBA1:** Im Vergleich zu Vehikel-Mäusen zeigten Siponimod-Mäuse eine geringere Dichte an IBA1-positiven Mikrogliazellen.

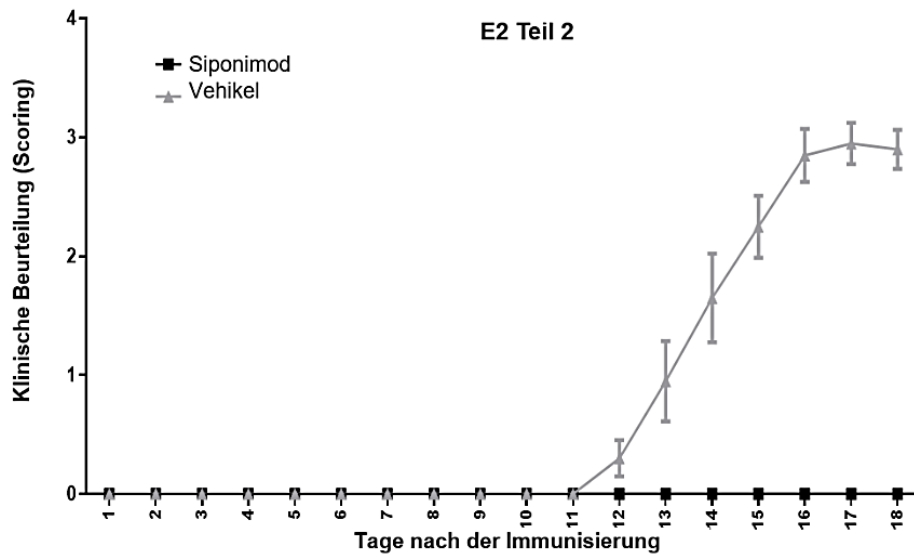


Abb. 11: Klinische Beurteilung der Mäuse nach MOG35-55 Intoxikation (Experiment 2 Teil 2)
 Bei den Vehikel-Mäusen (representiert mit grau) treten die Symptome erst 11-12 Tage nach der Intoxikation auf und nehmen bis zum Tag 17 zu.
 Die klinische Beurteilung der Mäuse nach der MOG35-55 Intoxikation wurde gemäß des Scoringystems (**Tab. 1**) durchgeführt.

Die Myelinisierung wurde mithilfe der LFB/PAS Färbung und der Anti-PLP Färbung untersucht. In Experiment 2 Teil 2 - durchgeführt zwischen der fünften Woche und der siebten Woche – ist bereits die spontane Remyelinisierung aufgetreten (**Abb. 13**). Die Demyelinisierung ist bei Vehikel-Mäusen zu diesem Zeitpunkt (am Ende der siebten Woche) nicht ausgeprägt (**Abb.12**).

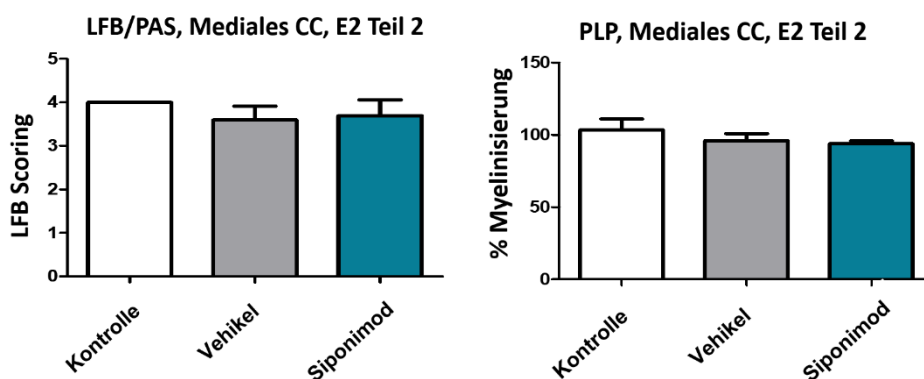


Abb. 12: Ergebnisse Demyelinisierung, R265 (Experiment 2 Teil 2)
LFB/PAS, PLP: Eine Demyelinisierung bei der Vehikel-Mäusen ist nicht vorhanden, wegen der spontanen aufgetretenen Remyelinisierung zwischen der fünften und der siebten Woche. Es gibt keine signifikanten Unterschieden zwischen den Vehikel- und Siponimod-Mäusen.
 Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way Anova Tests (und nichtparametrisch) auf statistische Signifikanz getestet.

4. DISKUSSION

4.1. Tiermodelle der Multiplen Sklerose und Ihre Grenzen

MS ist eine komplexe Autoimmunerkrankung mit einer weitgehend unbekanntem Pathogenese. Es gibt mehrere experimentelle Tiermodelle, die verschiedene Aspekte der MS-Pathologie nachbilden. In dieser Arbeit stelle ich drei MS-Tiermodelle vor, nämlich die experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), das Cuprizone-Tiermodell (Cup), sowie ein neues Cup-EAE-Modell. Anhand dieser drei Modelle wird die Wirksamkeit von Siponimod getestet.

4.1.1. Limitierungen des Cuprizone-Modells

Das Cuprizone-Modell ist geeignet, um den Mechanismus der Oligodendrozyten-Apoptose und der Demyelinisierung in einer nicht-immunen Situation zu untersuchen. Dieses Tiermodell beinhaltet ein reversibles Demyelinisierungs- und Remyelinisierungssystem und ahmt teilweise MS-Läsionen vom Typ III und IV nach (Lucchinetti C. *et al.* Ann Neurol. 2000). Die frühen ultrastrukturell sichtbaren Defekte der inneren Myelinscheiden, welche in MS-Läsionen beschrieben wurden (Rodriguez M. *et al.* Ultrastruct Pathol. 1994), konnten auch im Cuprizone-Modell nachgewiesen werden (Ludwin S. *et al.* Ann Neurol. 1981). Es gibt einige Ähnlichkeiten zwischen der Cuprizone-induzierten Pathologie und den histopathologischen Veränderungen, die in post-mortem MS-Läsionen beschrieben wurden. Beispielsweise ist die Dichte der Mitochondrien in den demyelinisierten Axonen sowohl in aktiven MS-Läsionen (Witte ME *et al.* J Pathol. 2009), als auch in Cuprizone-induzierten Läsionen der weißen Substanz (Ohno N *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; Kipp M. *et al.* Brain Pathol. 2017) erhöht. Zudem wurde eine Oligodendrogliopathie, die sich hauptsächlich in den distalen Bereichen der Oligodendrozyten äußert, in MS (Rodriguez M. *et al.* Ultrastruct Pathol. 1994) und im Cuprizone-Modell (Ludwin SK *et al.* Ann Neurol. 1981) beschrieben. Letztlich wurde die Anwesenheit der apoptotischen, Caspase-3 exprimierenden Oligodendrozyten während der Entwicklung der Läsionen in MS (Prineas JW *et al.* Ann Neurol. 2012) und in der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung berichtet (Buschmann JP *et al.* J Mol Neurosci. 2012; Kipp M. *et al.* Brain Pathol. 2017).

Der C57Bl/6 Maus Stamm ist heute einer der bevorzugten Stämme für Forschung. Für diesen Mausstamm gibt es die vollständige Genom-Sequenz (Torkildsen O. *et al.* Acta Neurol Scand Suppl. 2008). Eine reproduzierbare und synchrone Demyelinisierung des ZNS, bei gleichzeitig minimaler Hepatotoxizität für die Versuchstiere wird durch die Beimischung von 0,2-0,25% Cuprizone in das Normalfutter von Mäusen des Stammes C57BL/6 verursacht. Eine 5-6-wöchige Cuprizone-Intoxikation führt zu einer vollständigen Demyelinisierung des medialen Corpus callosums (Hirsmath MM *et al.* J Neuroimmunol. 1998).

Die ersten Zeichen der Oligodendrozyten-Apoptose können bereits zwei Tage nach Beginn der Cuprizone-Diät beobachtet werden (Buschmann JP *et al.* J Mol Neurosci. 2012). Nach 4-5 Wochen der Cuprizone-Vergiftung ist die akute Demyelinisierung vollständig, begleitet von einer umfassender Mikrogliose, Astrozytose und Axon-Schäden (**Abb. 13**). Wie in Experiment 1 zu beobachten ist, führt

eine nur 2-wöchige Cuprizone-Intoxikation nicht zu einer vollständigen Demyelinisierung, was (**Abb. 5**) histologisch (LFP/PAS) und immunhistochemisch (PLP) nachgewiesen wurde.

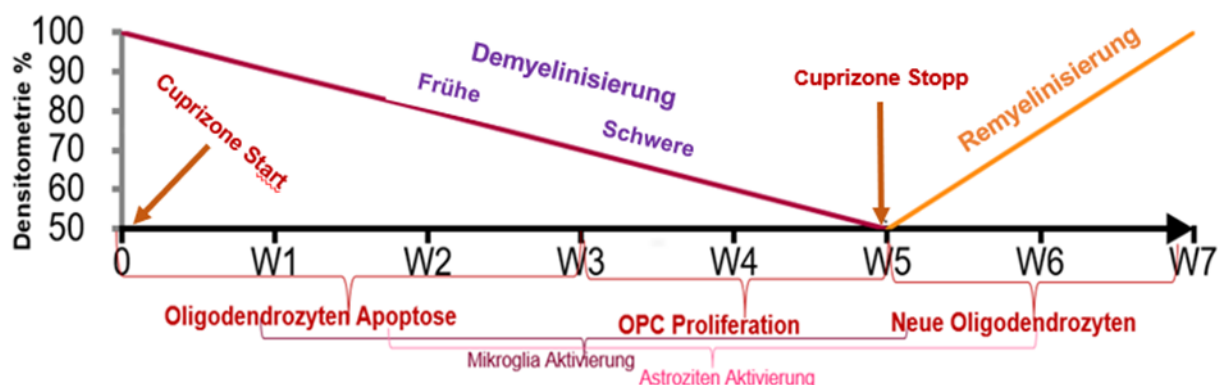


Abb. 13: Histopathologische Veränderungen in der Cuprizone-induzierten Pathologie (Angepasst nach: Viktoria Gudi *et al.* Fron Cell Neurosci 2014)

Nach Beendigung der Cuprizone-Vergiftung und Rückkehr zu normaler Diät, tritt bei den Versuchsmäusen eine robuste endogene Remyelinisierung auf (Slowik A *et al.* Br J Pharmacol. 2015; Kipp M. *et al.* Brain Pathol. 2017). Wie erwartet zeigte sich in Experiment 2 Teil 1 eine vollständige Demyelinisierung nach 3 Wochen, gefolgt von einer teilweisen Remyelinisierung nach Absetzung von Cuprizone und Fütterung der Mäuse mit normalem Futter für 2 Wochen. Eine vollständige Remyelinisierung trat in Experiment 2 Teil 2 in Woche 5 bis Woche 7 auf.

Die Verabreichung von Cuprizone für 12 Wochen oder länger führte zu einer chronischen Demyelinisierung. In diesem Kontext lässt sich die Remyelinisierung nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr beobachten (Kipp M *et al.* Acta Neuropathol. 2009).

Die genaue Wirkungsweise der Cuprizone-Intoxikation ist nicht vollständig erforscht. Aufgrund der Myelinsynthese benötigen reife Oligodendrozyten eine große Menge an Sauerstoff und ATP. Durch die Verabreichung von Cuprizone (Kupferchelator) wird andererseits die Funktion der mitochondrialen Enzyme beeinträchtigt. Um eine optimale Funktion der Oligodendrozyten zu gewährleisten, muss eine ausreichende Anzahl von Mitochondrien und deren Funktion gewährleistet werden. Außerdem enthalten Oligodendrozyten nur wenige antioxidative Enzyme, so dass freie Radikale wie ROS/reaktive Stickstoffspezies (RNS) nicht effizient entgiftet werden können und ihre intrazelluläre Akkumulation zu einer Störung der Homöostase des endoplasmatischen Retikulums (ER) führt. Oxidativer und ER-Stress stimulieren gemeinsam die Apoptose von Oligodendrozyten und den Abbau der Myelinscheide (Faizi M. *et al.* Toxicol Mech Methods. 2016; Praet J. *et al.* Neurosci Biobehav Rev. 2014).

4.1.2. EAE-Modell und die Limitierung

Obwohl MS eine spezifische menschliche Erkrankung ist, können viele pathologische Eigenschaften in EAE-Tiermodellen induziert und auf diese Weise studiert werden. Von besonderem Interesse ist EAE,

eine heterogene Gruppe von Modellen, von denen für eine bestimmte wissenschaftliche Frage ein Modell passend ist oder nicht (Kipp M *et al.* Brain Pathol. 2017).

Die Kombination des Peptids, das für die EAE-Toxifikation verwendet wird, der Mausstamm für die Untersuchung, und die Art der EAE-Immunsierung bestimmen den Krankheitsverlauf als schubförmig-remittierende oder chronische klinische Erkrankung (Baker D *et al.* Mult Scler Relat Disord. 2014; van der Star BJ *et al.* CNS Neurol Disord Drug Targets. 2012). Beispielsweise führt die Immunsierung von C57BL/6 Mäuse mit dem Protein MOG35-55 zu einem monozyklischen chronischen Krankheitsverlauf, während die aktive EAE-Immunsierung von SJL-Mäusen mit dem Protein PLP139-151 einen schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf hervorruft (Kipp M *et al.* Brain Pathol. 2017). Insbesondere wird das MOG35–55 Peptidmodell oft verwendet, da viele transgene und mutierte Mäuse im C57BL6 Hintergrund gezüchtet wurden (Kipp M *et al.* Brain Pathol. 2017).

Diese EAE Modelle sind keine progressiven Modelle. Beispielsweise entwickeln bei MOG35–55 induzierter EAE die Tiere nach 10-14 Tagen eine schnelle Paralyse des Schwanzes und der Hintergliedmaßen, obwohl es nach einer kurzen Plateauphase und einer leichten Erholung keine klinische Progression gibt (**Abb. 14**). Der Schweregrad der Erkrankung wurde in der vorliegenden Untersuchung nach einem festgelegten EAE-Bewertungsleitfaden (Scoring) von 1 bis 4 täglich bewertet (Ortega SB *et al.* J Immunol. 2013; York NR *et al.* J Autoimmun. 2010).

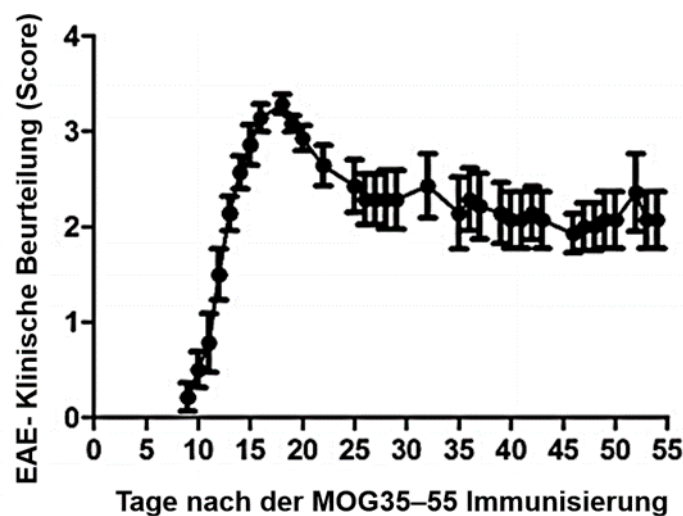


Abb. 14: EAE- Klinische Beurteilung der C57BL/6-Mäusen, die mit MOG35–55-Peptid immunisiert wurden (Angepasst nach: Kipp M *et al.* Brain Pathol. 2017)

Obwohl das EAE-Modell häufig verwendet wird, um die Immunmechanismen in der MS-Pathologie zu verstehen, ist dieses Modell keine präzise Kopie der MS und es bestehen viele Unterschiede. Während im EAE-Modell das Antigen, das die Autoimmunreaktion auslöst (vermittelt durch CD4⁺ Zellen), bekannt ist, ist das Antigen bei MS noch nicht bekannt, und die Immunantwort wird eher durch die Beteiligung von CD8⁺ Zellen vermittelt (Bischof F *et al.* J Immunol. 2004; Salou M *et al.* Immunol. 2015). Aufgrund der Einschränkungen und Unterschiede, die das EAE-Modell im Vergleich zu MS mit sich bringt, können

einige erfolgreiche Behandlungsmethoden im EAE-Modell nicht auf die MS-Pathologie übertragen werden.

4.1.3. Das neue Cup-EAE-Modell – Klarstellungen

In Anbetracht der Feststellung, dass in einem klassischen Modell der MS demyelinisierende Läsionen im gesamten ZNS mit Oligodendrozyten-Apoptose, Gliose und axonalem Schaden als direkte Folge der Autoimmunreaktion angesehen werden (sog. engl. Outside-In-Theorie), zielt diese Arbeit darauf ab, die Wirksamkeit von Siponimod und des neuen Cup-EAE-Modells zu testen, das auf der Idee basiert, dass der Verlust von Oligodendrozyten das früheste Merkmal bei der Entwicklung von MS-Läsionen ist. Da man davon ausgeht, dass bei einigen MS-Läsionen die Oligodendrozyten-Apoptose das primäre Ereignis ist, gefolgt von der Rekrutierung von Immunzellen aus der Peripherie, stellt dieses Modell die getreueste Kopie der sog. engl. Inside-Out-Theorie dar. Es war notwendig, die neuroprotektive Wirkung von Siponimod in diesem neuen Cup-EAE-Modell zu überprüfen, und so konnte in Experiment 1 und Experiment 2 (Teil 2) gezeigt werden, dass sowohl die Entzündung als auch das Fortschreiten der durch Neurodegeneration verursachten Behinderung drastisch verbessert werden. Die Untersuchungen an den mit Cup-EAE behandelten Tieren konnten zeigen, dass nach einer MOG35-55-Intoxikation die Rekrutierung peripherer Immunzellen in das Vorderhirn minimal war. Die vorausgehende Cuprizone-induzierte Demyelinisierung erwies sich als wirksamer Auslöser für die anschließende Rekrutierung von Monozyten, Granulozyten und besonders CD3⁺ Lymphozyten in das Parenchym des Vorderhirns der MOG35–55-immunisierten Mäuse (Scheld M *et al.* J Neurosci. 2016; Rütther BJ *et al.* Glia. 2017). Solche kombinierten Läsionen sind ebenfalls von Oligodendrozytenapoptose und Mikroglia-Aktivierung begleitet, vergleichsweise der SPMS-Multiple-Sklerose-Läsionen. Daraus lässt sich schließen, dass eine Abhängigkeit zwischen neurodegenerativen Prozessen und der Stärke der Immunreaktion besteht (Scheld M *et al.* J Neurosci. 2016; Yakimov V *et al.* Histochem Cell Biol. 2019).

4.2. Siponimod Wirkungen im Rahmen der vorliegenden Forschung

4.2.1. Einfluss von Siponimod auf die Demyelinisierung

Siponimod ist ein für S1P1 und S1P5 selektiver S1P-Modulator der nächsten Generation, der beim Menschen eine gute Sicherheit und Verträglichkeit aufweist. Siponimod hat die Anzahl von aktiven Gehirnläsionen und die jährliche Rückfallrate, abhängig von der Dosis, um ca. zwei Drittel vermindert (Selmaj K *et al.* Lancet Neurol. 2013; Gentile A *et al.* J Neuroinflammation. 2016). Aufgrund dieser erfolgversprechenden Ergebnisse wurde eine Phase III-Studie mit Placebo-Kontrollpersonen ausgeführt, in der die Wirksamkeit und Sicherheit von Siponimod in Patienten mit SPMS überprüft wurden (EXPAND-Studie) (Kappos L. *et al.* Lancet. 2018). Im Kontext der veröffentlichten EXPAND Studie wurde nachgewiesen, dass der S1P Rezeptor Modulator, Siponimod, nicht nur die entzündliche Eigenschaft, aber auch die degenerative Eigenschaft der SPMS, amelioriert (Behrangi N. *et al.* Cells. 2019). Diese Studie hat gezeigt, dass Siponimod klinisch wirksam in SPMS Patienten ist, aufgrund des primären Ergebnisses einer drei-monatigen, bestätigten Verminderung des Fortschreitens der

Behinderung (definiert von einer 0,5 oder 1 Grad- Erhöhung in der Expanded Disability Status Scale (EDSS), im Vergleich zu der Basislinie). Als wichtigstes sekundäres Ziel wurde eine 26% Verminderung des bestätigten Fortschreitens die Behinderung nach sechs Monaten erreicht und eine erhebliche Verminderung der jährlichen Rückfallrate und der MRT-Aktivität beobachtet (Kipp M. Cells. 2020). Es wurde nachgewiesen, dass Siponimod erheblich wirksamer im Vergleich zu Interferon-Beta Therapien ist, zumindest für Patienten von bis zu sechs Monaten nach bestätigtem Fortschreiten der Behinderung (engl. Confirmed disability progression/ CDP).

Demyelinisierung und Remyelinisierung wurden in beiden Experimenten durch histologische (LFB/PAS) und immunhistochemische (PLP) Methoden untersucht.

In Experiment 1 konnte aufgrund der nur zwei Wochen dauernden Cuprizone-Intoxikation keine wesentliche Demyelinisierung im Vergleich zum Vehikel beobachtet werden, so dass kein Siponimod Effekt vorhanden war. Der Myelingeht in Vehikel-Mäusen war ungefähr auf dem gleichen Niveau wie in der Kontrollgruppe. Eine länger andauernde Cuprizone-Intoxikation hätte es ermöglicht, die Wirkung von Siponimod zu quantifizieren. Es wurde bereits vorher eine vollständige Demyelinisierung des medialen Corpus callosum beschrieben (Hiremath MM *et al.* J Neuroimmunol. 1998). Aus diesem Grund wurde für Experiment 2 (Teil 1 und Teil 2) der Zeitraum der Intoxikation auf 3 Wochen verlängert, gefolgt von weiteren 2 Wochen normaler Fütterung, um das Fortschreiten und die Entwicklung der Läsionen unter Siponimod beobachten zu können.

Wie zu erwarten konnte in Experiment 2 Teil 1, im neurodegenerativen, nicht autoimmunvermittelten Cuprizone Modell der MS (Experiment 2 Teil 1) (**Abb. 5**), eine verstärkte Demyelinisierung in Vehikel-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Wirkung von Siponimod auf die Demyelinisierung war nach LFB/PAS Färbung, die eine höhere Dichte an blau angefärbtem Myelin zeigte, deutlich statistisch signifikant verändert. Bei der anti-PLP-Färbung war die Wirkung von Siponimod auf die Demyelinisierung im Vergleich zum Vehikel ebenfalls erhöht - eine höhere Dichte an Myelin - jedoch statistisch nicht signifikant. Dies könnte auf die geringe Anzahl von Mäusen zurückzuführen sein, die mit Siponimod (n=9) oder Vehikel (n=9) behandelt wurden, zusammen mit der hohen Standardabweichung (**Abb. 6**).

Da die Demyelinisierung nach 5 Wochen (Experiment 2 Teil 1) deutlich ausgeprägt war, wurde die Inside-Out-Theorie auch im CUP-EAE-Modell überprüft, um eine noch getreuerer Reproduktion der MS-Läsionen zu erzielen. Aus Experiment 2 Teil 2 geht hervor, dass nach 3 Wochen Cup-Intoxikation, gefolgt von 2 Wochen normaler Fütterung und weiteren 2 Wochen Exposition mit MOG35-55 erwartungsgemäß (Gudi V *et al.* Fron Cell Neurosci 2014), dass nach dem Zeitraum von 7 Wochen eine fast vollständige spontane Remyelinisierung erzielt worden war, wobei die Demyelinisierung in Vehikel fast nicht vorhanden war. Somit gibt es keine Signifikanz zwischen Siponimod und Vehikel, da die Myelinisierung sowohl nach LFB/PAS als auch nach Anti-PLP-Färbung ungefähr gleich war wie in der Kontrollgruppe (**Abb. 12**).

4.2.2. Untersuchung der entzündungshemmenden Effekte von Siponimod

In SPMS Patienten ist nach RNA-Analysen in Blutproben der mit Siponimod-behandelten Patienten die Expression von Genen vermindert, die in der Aktivierung von T- und B-Zellen und Rezeptor-abhängigen Signalwegen involviert sind (Wu Q. *et al.* JCI Insight. 2020). Dies ist in Einklang mit der Reduktion von CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen. Durchflusszytometrische Analysen haben gezeigt, dass in den verbleibenden Lymphozyten-Subtypen das Auftreten von CD4⁺ und CD8⁺ naiven T-Zellen geringer ist, während die entzündungshemmenden Th2 und die regulatorischen T-Zellen (Tregs) erhöht sind (Wu Q. *et al.* JCI Insight. 2020). Die wirksame Dosis, um eine 50% Verminderung der Anzahl von peripheren Lymphozyten zu erreichen, lag bei der 6 Stunde-Zeitpunkt-Postdosis bei 0,14 mg/kg (Pan S *et al.* ACS Med Chem Lett. 2013).

In gesunden Erwachsenen war Siponimod mit einer Dosis-abhängigen (Dosisintervall 0.3–10 mg) Verminderung der peripheren CD4⁺ T-Zellen, naiven T-Zellen, T-Gedächtniszellen und B-Zellen nach 4-6 Stunden mit der reversiblen Sequestrierung von Lymphozyten in lymphoiden Geweben verbunden. Die maximale Reduktion wurde während einer 28-Tage Behandlung erreicht, die Niveaus normalisierten sich innerhalb einer Woche nach dem Behandlungsende (Gergely P. *et al.* Br J Pharmacol. 2012; Novartis Europharm Ltd. Siponimod. 2020). Niedrige Lymphozytenkonzentrationen wurden durch tägliche Dosen aufrechterhalten. In der Mehrzahl der Patienten (90%) wurden die Normalwerte an Lymphozyten innerhalb von 10 Tage nach Therapieende erreicht. Nach Ende der Siponimod-Behandlung kann die residuale Verminderung der peripheren Lymphozyten-Anzahl für maximal 3-4 Wochen nach Gabe der letzten Dosis andauern (Novartis Europharm Ltd. Siponimod. 2020).

In unserer Studie zeigte sich die Rekrutierung von Immunzellen erwartungsgemäß überwiegend im Cup-EAE-Modell (Experiment 1 und Experiment 2 Teil 2). In Experiment 2 Teil 1 war die Anzahl der CD3⁺ (60/mm²) und CD4⁺ (12/mm²) Zellen in Vehikel aufgrund der fehlenden Wirkung von MOG35-55 extrem niedrig, obwohl ein Rückgang nach Siponimod im Vergleich zu Vehikel beobachtet wurde (**Abb. 8**). Die fokale entzündliche Infiltration im neuen Cup-EAE-Modell mit perivaskulärer Zellakkumulation (PVC) konnte durch die histologische H&E-Färbung bestätigt werden. Anatomisch ergab sich eine Erweiterung des Virchow-Robin-Raums mit Rekrutierung von Immunzellen, die sich durch die astrozytäre Glia limitans perivascularis ausbreiten und in das gesamte Neuropil eindringen (**Abb. 9**). Die H&E Färbung ermöglichte die Visualisierung der Anzahl und Verteilung dieser sogenannten Loci der perivaskulären Infiltrate, die in Experiment 2 Teil 1 nicht ausgewertet wurden, da bereits früher beschrieben (Rüther BJ *et al.* Glia. 2017). Im Cup-EAE-Modell ist die Ausbreitung der Loci der perivaskulären Infiltrate zufällig über die gesamte Region 265 (Corpus callosum sowie kortikale und subkortikale Bereiche der grauen Substanz). Sowohl in Experiment 1 als auch in Experiment 2 Teil 2 konnte die neuroprotektive Wirkung von Siponimod durch eine signifikante statistische Reduktion der perivaskulären Infiltration aus der Peripherie in die ZNS nachgewiesen werden (**Abb. 3; Abb. 9**).

Die Infiltration von CD3⁺ und CD4⁺ Immunzellen nach einer MOG35-55-Immunisierung basiert auf dem Mechanismus der Integrität der BBB, der nicht vollständig geklärt ist. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Immunantwort bei EAE zu entzündlichen Läsionen mit einer Verteilung im Rückenmark, Kleinhirn

und Sehnerv einhergeht (Scheld M *et al.* J Neurosci. 2016). Eine vorherige Behandlung mit Cuprizone führt zusätzlich zu einer Infiltration im Vorderhirn (Rüther BJ *et al.* Glia. 2017). Im neuen Cup-EAE-Modell ist demnach eine Immunzellinfiltration dominant, die durch Aktivierung (APCs) und Antigenpräsentation durch naive T-Zellen vermittelt wird, wobei der MHC-Klasse-2 an aktivierte CD4⁺ Zellen präsentiert wird, was wiederum zu einer BBB-Überquerung und Autoimmunität im ZNS führt (Wu GF *et al.* J Autoimmun. 2011). Wie zu erwarten sind im Vehikel CD3⁺ (100/mm²) und CD4⁺ (150/mm²) Immunzellen sowohl in Experiment 1 als auch in Experiment 2 Teil 2 ersichtlich, im Experiment 2 Teil 2 jedoch stärker (CD3⁺: 200/mm² und CD4⁺: 200/mm²). Bemerkenswerterweise gibt es in den jeweiligen Kontrollgruppen keine Immunzellen im ZNS (**Abb. 3, Abb. 9**).

In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten Effekte von Siponimod durch in Lymphozyten exprmiertes S1P1 moduliert werden, konnte die entzündungshemmende Wirkung in unserem Experiment ebenfalls quantifiziert werden. Es ist bereits bekannt, dass die S1P1-abhängige chemotaktische Reaktionsfähigkeit in sich differenzierenden T-Zellen vor dem Austritt aus dem Thymus stark erhöht ist, S1P1 jedoch während der Aktivierung peripherer Lymphozyten reduziert ist und dies mit dem Verbleib in lymphatischen Organen verbunden ist (Matloubian M. *et al.* Nature. 2004). Erwartungsgemäß zeigt die Behandlung mit Siponimod im neuen Cup-EAE-Modell (Experiment 1) eine signifikant entzündungshemmende Wirkung, da die Zahl der in der Peripherie verbliebenen CD3⁺ und CD4⁺ Lymphozyten (Abb. 7) deutlich reduziert ist. In Experiment 2 Teil 2 ist die Wirkung von Siponimod statistisch sogar noch ausgeprägter, da die Anzahl an CD4⁺ Zellen fast null beträgt. Somit ist S1P1 in den reifenden Thymozyten für die Auswanderung aus dem Thymus und in den Lymphozyten für ihren Austritt aus der Milz, den Lymphknoten und den Peyer-Plaques erforderlich.

4.2.3. Der Einfluss von Siponimod auf Gliazellen

Kürzlich wurde eine potentiell neuroprotektive Wirkung von BAF312 in einem EAE Tiermodell nachgewiesen. Es verbesserten sich klinische Werte, die Astro-Mikrogliose war erheblich vermindert, die GABA-abhängige Übertragung im Striatum erhöht neuroprotektive Effekte im ZNS und die Entzündung der grauen Substanz reduziert (Gentile A *et al.* J Neuroinflammation. 2016). In EAE Mäusen zeigte Siponimod eine günstigere ZNS/Blut Medikament-Übertragungsrate im Vergleich zu Fingolimod mit einem Verhältnis von 6-7 versus 20-30 (Bigaud M. *et al.* Neurology. 2020). Die orale aber nicht die intrazerebrale Behandlung mit BAF312 ameliorierte den Erkrankungsverlauf in einem fokalen EAE Mäusemodell mit Läsionen der grauen und weißen Substanz, während die intrazerebrale Behandlung nicht zur Verminderung der schädlichen Immunzellinfiltration im das Gehirnparenchym im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollpersonen führte (Hundehege P. *et al.* Neural. Regen. Res. 2019).

4.2.3.1. Wirkung von Siponimod auf Astrozyten

Traditionell haben Astrozyten eine sekundäre Rolle gespielt. Erst wenn die Demyelinisierung durch die Bildung einer Glialnarbe abgeschlossen ist, werden Astrozyten aktiv (Brosnan CF *et al.* Glia. 2013). Hingegen weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass Astrozyten früh und hochaktiv an der Entwicklung der MS-Läsionen beteiligt sind (Farina C *et al.* Trends Immunol. 2007; Ponath G *et al.*

Brain. 2017; Sofroniew MV Nat Rev Neurosci. 2015; Ponath G. Front Immunol. 2018). Astrozyten haben mehrere Funktionen in der Entwicklung der MS-Läsionen, nicht nur in der Rekrutierung von Lymphozyten (Farina C et al. Trends Immunol. 2007; Ransohoff RM et al. J Clin Invest. 2012) und in der Gewebeschädigung (Karadottir R et al. Nature. 2005; Micu I et al. Nature. 2006), sondern auch durch die Begrenzung der Entzündung und die Förderung der Reparatur von Läsionen (Sofroniew MV Nat Rev Neurosci. 2015).

Zusätzlich werden die Astrozyten selbst während des Entzündungsverlaufs erheblich geschädigt (Brosnan CF et al. Glia. 2013; Ponath G. Front Immunol. 2018; Yi W et al. Brain Behav Immun. 2019). Astrozyten spielen eine wichtige Rolle in der MS Pathogenese, weil sie sowohl aktiv in der ZNS-Entzündung involviert sind als auch die Entzündung durch verschiedene Mechanismen begrenzen. Dazu gehören a) die Expression von Toll-like Rezeptoren, die ermöglichen, dass die Astrozyten als Immunzellen fungieren, indem sie doppel-strängige RNA erkennen, die von beschädigten oder mit Viren infizierten Zellen abgegeben werden und zu einer pro-entzündlichen Antwort des Immunsystems führen; b) die Expression von MHC Klasse I und II Proteinen sowie von ko-stimulatorischen Molekülen zur Antigenpräsentation der Astrozyten; c) die Synthese von IL-12, IL-23 und IL-27, die die Differenzierung der T-Helfer Subtypen Th1 und Th17 in Entzündungsherden im ZNS regeln; und d) die Regulation der BBB-Permeabilität. Zudem zeigen Studien, dass Östrogen eine neuroprotektive Wirkung auf Astrozyten-abhängige Mechanismen besitzt (Guerrero-García JJ. Neurologia. 2020).

Daher wurde in dieser Arbeit die reaktive Astroglie sowohl im Cuprizone-Modell als auch im neuen Cup-EAE-Modell untersucht. Wie nach toxischer Demyelinisierung zu erwarten, aber im nicht im autoimmunvermittelten Cuprizone Modell der MS, zeigte sich in Experiment 2 Teil 1 im medialen Corpus callosum eine hohe Dichte an GFAP-positiven Astrozyten im Vehikel (ca. 100% Astroglie) im Vergleich zur Kontrollgruppe (ca. 20% Astroglie) (Abb. 8). Durch Siponimod wurde die Astroglie statistisch signifikant reduziert. Im Cup-EAE-Modell wird die Infiltration mit Immunzellen aus der Peripherie auch durch die Aktivierung von Astrozyten vermittelt, die deren Eindringen in das ZNS durch Überwindung der BHS erleichtern. Die Hemmung der Reifung von Immunzellen in sekundären lymphatischen Organen führt zu einer signifikanten Hemmung der Astroglie nach Gabe von Siponimod im Vergleich zum Vehikel sowohl in Experiment 1 (**Abb. 4**) als auch in Experiment 2 Teil 2 (**Abb. 10**). Die Vorbehandlung der Astrozyten mit Siponimod schützte jedoch die spinalen Neuronen vor Neurodegeneration, was darauf hindeutet, dass Siponimod in Neuronen entzündungsbedingte Schäden reduziert, indem es die Aktivität der Astrozyten reduziert (Colombo E et al. Front Immunol. 2020).

Als essentielle, immunregulierende Zellen im ZNS vermitteln die Astrozyten sowohl schädliche als auch protektive Prozesse bei neuroinflammatorischen Erkrankungen. Daher ist die therapeutische Manipulation von Astrozyten eine erfolgversprechende Behandlungsoption bei MS (Yi W et al. Brain Behav Immun. 2019).

Astrozyten spielen auch eine zentrale Rolle als Regulatoren des Übertritts peripherer Immunzellen aus dem Blut ins Gehirn. Anatomisch betrachtet können periphere Immunzellen über drei Hauptwege eintreten: a) durch postkapillare Venolen (i.e. die Blut-Hirn-Schranke); b) vom Plexus choroideus-Stroma in das Ventrikel und von dort in das ZNS Parenchym (i.e. die Blut-Liquor-Barriere); c) entlang

des perivaskulären Spaltraums um die Blutgefäße des ZNS (i.e. der Virchow-Robin-Raum) (Kipp M. Cells 2020).

Die Glia limitans, die hauptsächlich aus den Endigungen der Astrozyten besteht, stellt eine weitere physische Barriere dar, die das Eintreten von Leukozyten in das Hirnparenchym begrenzt. Trotzdem sind die Astrozyten in neuen MS Läsionen vermindert (Prineas JW et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2019) und abgetrennt von den Blutgefäßen (Eilam R et al. Glia. 2018). Dies zeigt, dass die Struktur der Glia limitans beschädigt ist. Leukozyten aus den perivaskulären Räumen können zur Schädigung beitragen, indem sie Matrix-Metalloproteasen exprimieren, die Dystroglycan proteolysieren (Agrawal S et al. J Exp Med. 2006; Masaki K. Neuropathology. 2015; Masaki K et al. PLoS One. 2013), den Anker zwischen den Endigungen der Astrozyten und der Basalmembran. Die BBB als erste Abwehrlinie gegen den Eintritt der Leukozyten ins ZNS, ist bei MS beschädigt und führt zur massiven Infiltration von Immunzellen. In diesem Prozess ermöglichen die Astrozyten die Entwicklung von Erkrankungen, indem sie zu der BBB Beschädigung beitragen (Yi W et al. Brain Behav Immun. 2019). Die Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls 1 VCAM-1 von Astrozyten ist auch essentiell für den Eintritt von T-Zellen in das ZNS-Parenchym (Gimenez MA et al. J Neuroimmunol. 2004).

Die Modulation der Astrozyten-Funktion durch Wirkstoffe wie Siponimod könnte eine erfolgversprechende therapeutische Strategie sein. Bemerkenswerterweise exprimieren Astrozyten spezifische Rezeptoren, um mit verschiedenen Subtypen von Lymphozyten wie Th1- und Th17-Zellen zu kommunizieren, wie kürzlich nachgewiesen wurde (Williams JL et al. Glia. 2020). Tatsächlich wird angenommen, dass die Astrozyten als subtilster Regulator der immunkompetenten T-Zellen fungieren und wesentlich für die physiologische Immunreaktivität im ZNS sind. Künftige Forschungsarbeiten müssen zeigen, inwiefern Gliazellen an der Weiterleitung von Signalen zwischen dem Immunsystem und dem Nervensystem involviert sind (Kipp M. Cells 2020).

Im Zusammenhang mit Astroglieose wurde eine axonale Schädigung im Cuprizone Modell (Experiment 2 Teil 1) und im Cup-EAE Modell (Experiment 2 Teil 2) untersucht. Das Auftreten von APP⁺ eiförmigen Sphäroiden im medialen Corpus callosum (ca. 300/mm²) im Vehikel unterstreicht, dass eine entzündliche Infiltration mit Immunzellen aus der Peripherie zu einer axonalen Schädigung führt. Anderen Studien weisen darauf hin, dass der Mechanismus der neuroaxonalen Schädigung bei MS vermutlich größtenteils entzündungsbedingt ist, die neuroaxonale Degeneration jedoch auch unabhängig von der Entzündung auftreten kann (Bar-Or A et al. CNS Drugs. 2011). Da Neuronen zuweilen S1P1 und/oder S1P5 exprimieren, könnte Siponimod direkte Auswirkungen auf ihr Überleben haben. So zeigte sich in beiden Experimenten bei mit Siponimod behandelten Mäusen eine signifikante Verminderung der akuten axonalen Schädigung (**Abb. 7, Abb. 10**), was wesentlich zur Neuroprotektion beiträgt.

4.2.3.2 Effekte von Siponimod auf die Mikroglia

Es wird angenommen, dass während der schubförmig remittierenden MS (RRMS) die Mikroglia wesentlich für die Myelin-Phagozytose, T-Zell Antigenpräsentation und die Abgabe von pro-entzündlichen Zytokinen verantwortlich ist. Wenn die MS in die progrediente Phase eintritt, ist die

Mikroglia wichtig für die langsame Ausbreitung der chronischen Läsionen, die wiederum eine der pathologischen Eigenschaften der progredienten MS darstellen (Kipp M. *Cells* 2020).

Obwohl die aktivierte Mikroglia bei progredienter MS beobachtet wird, ist dennoch nicht bekannt, ob sie zur laufenden Degeneration beiträgt oder eine normale Reaktion auf die Verletzung widerspiegelt und eine schützende Rolle hat (Stys PK *et al.* *F1000Res.* 2019). Die aktivierte Mikroglia zeigt zytoplasmatische Hypertrophie und die Überexpression von MHC Klasse II Molekülen sowie von pro-entzündlichen Zytokinen (Wong WT *Front Cell Neurosci* 2013). Die Mikroglia-Aktivierung ist nicht nur in aktiven Läsionen zu beobachten, sondern begleitet auch die diffuse axonale Schädigung in normal erscheinender weißer und grauer Substanz, die bei progredienter MS verursacht werden (Kutzelnigg A *et al.* *Handb Clin Neurol.* 2014). Zusätzlich sind reichlich Mikroglialknötchen, bestehend aus Ansammlungen von aktivierter Mikroglia in Flächen neben Plaques, vorhanden, insbesondere bei Patienten mit progredienter MS (De Groot CJ *et al.* *Prog Brain Res.* 2001). In Zusammenhang mit MS wurde nachgewiesen, dass die Phagozytose der Myelin-Abbauprodukte durch die Mikroglia eine Voraussetzung für die endogene Remyelinisierung ist (Karamita M *et al.* *JCI Insight.* 2017; Kotter MR *et al.* *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2006). Andererseits können aber die Zellen auch eine oxidative Stress-Signatur induzieren, was zu Axon-Schäden führt (Mendiola AS *et al.* *Nat. Immunol.* 2020). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Astrozyten und Mikroglia bemerkenswerterweise eng zusammenarbeiten (Lombardi M *et al.* *Acta Neuropathol.* 2019). Astrozyten- und Mikroglia-Zellen sind wichtige Regulatoren der Pathologie von MS Erkrankungen. Es ist daher erfolgversprechend, ihre Funktion zum Ziel therapeutischer Intervention zu machen (Kipp M. *Cells* 2020).

Im Cuprizone-Modell (Experiment 2, Teil 1) zeigt die Mikrogliose in der Vehikelgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, dass die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten progressive pathologische Reaktionen bei MS verursacht, selbst wenn keine infiltrierenden Entzündungszellen in der Peripherie vorhanden sind. Die Anzahl der IBA1-positiven Zellen, ein Marker für Mikroglia und Makrophagen, war im medialen Corpus callosum unter Siponimod im Vergleich zu Vehikel um mehr als 50% reduziert, was auf eine signifikant geringere Mikrogliose hinweist. Wie im neuen Cup-EAE-Modell zu erwarten, ist die Mikroglia an der neuronalen Schädigung und der Rekrutierung von T-Zellen im Gehirn beteiligt. Insbesondere in Experiment 2 Teil 2 reduzierte Siponimod die Mikrogliose drastisch auf einen Wert, der nahezu dem der Kontrollgruppe entspricht (**Abb. 10**). Die Verminderung der Mikrogliose ist auch in Experiment 1 Teil 1 ersichtlich, aber statistisch nicht signifikant. Andere Studien haben gezeigt, dass Siponimod in Mikrogliazellkulturen aus Mäusen den durch Lipopolysaccharid oder TNF α /IL-17 induzierten IL-6-Spiegel reduzierte. Dieser Effekt war jedoch in Kleinhirnschnittkulturen ausgeprägter, was darauf hindeutet, dass die Verringerung von IL-6 in der Mikroglia durch Siponimod indirekt war und vielmehr durch andere Immunzellen vermittelt wurde (O'Sullivan C *et al.* *J Neuroinflammation.* 2016). Darüber hinaus kann die Aufnahme von Eisen, das wahrscheinlich während des Demyelinisierungsprozesses durch pro-inflammatorische Makrophagen und Mikroglia freigesetzt wird, deren pro-inflammatorischen Status verstärken und in Zusammenhang mit chronisch aktiven MS-Läsionen zu Gewebeschäden, Krankheitsschwere und -verlauf beitragen (Gillen KM *et al.* *Front Immunol.* 2018).

4.2.3.3. Perspektiven und Effekte von Siponimod auf Oligodendrozyten und Remyelinisierung

In MS verursacht der komplexe pathologische Prozess Dysfunktionen und Apoptose der Oligodendrozyten, was wiederum zu Demyelinisierung und Neurodegeneration führt (Dulamea AO. *Adv Exp Med Biol.* 2017). Aufgrund des Vorkommens der multifokalen Demyelinisierung in der weißen und grauen Substanz im ZNS von MS Patienten, stellt sich die Frage nach der hochspezifischen Zerstörung des Myelins und der Oligodendrozyten (Kipp M. *Cells.* 2020). Obwohl die Hypothese besteht, dass eine primäre Verletzung der Oligodendrozyten oder des Myelins eine sekundäre Immunantwort im ZNS induziert, ist dies nicht bewiesen. Die meisten neueren Arbeiten zeigen den Einfluss einer primären Immunantwort gegen Myelin-Antigene mit einer Vielfalt von potentiellen Angriffszielen (Lubetzki C *et al.* *Handb Clin Neurol.* 2014). Lebensfähige Oligodendrozyten und eine intakte Myelinscheide sind unverzichtbar für die neuronale Integrität.

Die ungenügende Remyelinisierung in MS ist teilweise verbunden mit der Unfähigkeit der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sich in reife Oligodendrozyten zu differenzieren (Moore CS *et al.* *J Immunol.* 2015; Mei F *et al.* *Nat Med.* 2014). Es wird angenommen, dass in einer feindlichen ZNS-Mikroumgebung durch pro-entzündliche Zytokine und Chemokine die OPC-Differenzierung inhibiert wird (Moore CS *et al.* *J Immunol.* 2015; Chew LJ *et al.* *Glia.* 2005), ebenso durch Leucin-reiches Wiederholungs- und Immunglobulin-ähnliches Domänen enthaltendes Protein 1 (LINGO-1) (Mi S *et al.* *Nat Neurosci.* 2005) und Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs) (Back SA *et al.* *Nat Med.* 2005). Remyelinisierung ist ein hochkomplexer biologischer Prozess und kann histologisch in vier konsekutiven Schritten beschrieben werden: a) die Proliferation der OPC; b) die Migration der OPC zu den demyelinisierten Axonen; c) die Differenzierung der OPC; und d) die Interaktion der unreifen Oligodendrozyten mit den nackten Axonen (i.e. die Wicklung der Axonen) (Kipp M *et al.* *Mult Scler.* 2012). Die Existenz der sogenannten "Schattenplaques" in den *post-mortem* Gehirnen von MS Patienten, die remyelinisierte Läsionen beschreiben, weist klar darauf hin, dass die vollständige Reparatur der MS Plaques im Prinzip möglich ist, obwohl üblicherweise nur eine eingeschränkte Reparatur am Rand der Läsionen zu beobachten ist (Prineas JW *et al.* *Ann Neurol.* 1979; Prineas JW *et al.* *Ann Neurol.* 1993). Strategien für die Begünstigung der Remyelinisierung beinhalten die Modulation der extrinsischen Faktoren, die mit der ZNS-Entzündung verbunden sind, aber auch Auslöser der intrinsischen Faktoren, die mit der Oligodendrozyten-Reifung und Myelinisierung in Verbindung stehen (Mei F *et al.* *Elife.* 2016; Kim RY *et al.* *Brain.* 2018). Weiterhin muss diese Strategie im erwachsenen ZNS mit einem Hintergrund von Axonen-Beschädigung funktionieren, wenn es in Patienten mit MS wirken soll (Voskuhl RR *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019).

Im letzten Jahrzehnt wurden bemerkenswerte Fortschritte im Verständnis der Biologie der Oligodendrozyten und in der Suche für Remyelinisierung-Therapien errungen. Es gibt verschiedene Techniken, die hilfreich waren, um Moleküle, die fähig sind, die Differenzierung und Myelinisierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen begünstigen, zu identifizieren. (Bove RM *et al.* *Neurotherapeutics.* 2017).

S1P5, das in OPCs exprimiert wird, ist in allen Differenzierungsstadien vorhanden, einschließlich der reifen, myelinisierenden Oligodendroglia. Die Stimulation/Modulation von S1P5 fördert das Überleben reifer Oligodendrozyten (Jaillard C *et al.* *J Neurosci.* 2005).

Beispielsweise zeigte Siponimod in der *Xenopus* Klausquappe eine promyelinisierende Wirkung auf Oligodendrozyten. Eine 3-tägige Exposition mit Siponimod führte zu einer Verstärkung der myelinisierten Internodien im Vergleich zu Kontrollen. Eine Remyelinisierung wurde auch beobachtet, wenn ein selektiver S1P5-Agonist verwendet wurde, nicht aber ein selektiver S1P1-Agonist. Der die Remyelinisierung fördernde Effekt von Siponimod war nicht in S1P5-Knockout-Embryonen (S1P5^{-/-}) erkennbar, was die zentrale Rolle von S1P5 auf Oligodendrozyten in diesem Prozess unterstreicht. (Mannioui A *et al.* *Mult Scler.* 2018).

In einer anderen Studie, einem Lysophosphatidylcholin (LPC)-vermittelten Demyelinisierungsmodell, induzierte Siponimod, aber nicht ein selektiver S1P1-Agonist, einen signifikanten und deutlichen Anstieg der Myelinlevel in demyelinisierten ZNS-Aggregaten von fötalen Ratten im Vergleich zu Kontrollen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die S1P1-Modulation allein nicht ausreicht, um Veränderungen bei der Remyelinisierung hervorzurufen, und legen nahe, dass die Wirkung von Siponimod auf die Remyelinisierung teilweise durch S1P5-Agonismus vermittelt werden könnte (Jackson SJ *et al.* *J Neuroinflammation.* 2011).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine häufig auftretende, chronische und immunvermittelte Erkrankung, die typischerweise im jungen Erwachsenenalter beginnt. Bei Patienten mit Multipler Sklerose überwinden Lymphozyten aus den peripheren lymphatischen Organen die Blut-Hirn-Schranke (BBB) und dringen in das zentrale Nervensystem (ZNS) ein, um Oligodendrozyten und andere Hirnzelltypen anzugreifen. Dies führt zu lokaler Entzündung, Demyelinisierung, Astroglie und schließlich zum Verlust der Axone. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, die zu dieser Krankheit führen, sind noch nicht vollständig erforscht. Um ein besseres Verständnis dafür zu erlangen, werden in der Forschung zur Multiplen Sklerose verschiedene experimentelle Tiermodelle eingesetzt, die viele Aspekte der Krankheit nachbilden. In dieser Studie habe ich die Auswirkungen von Siponimod sowohl in einem Cuprizone-induzierten toxischen Demyelinisierungsmodell als auch in einem neuen Cup-EAE-Modell untersucht, das eine Kombination aus dem toxischen Cuprizone-Modell und dem immunologischen EAE-Modell darstellt. Dieses Modell basiert auf der neu vorgeschlagenen Hypothese (sog. Inside-Out-Hypothese), dass bei der Multiplen Sklerose primär eine Neurodegeneration stattfindet, die dann sekundär zu einer Rekrutierung peripherer Immunzellen führt. Bemerkenswerterweise ahmt dieses Modell die wichtigsten histopathologischen Merkmale der Typ-3-Läsion bei Multipler Sklerose getreu nach.

Siponimod, auch bekannt als BAF312, ist ein selektiver Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulator (S1P1 und S1P5) der nächsten Generation. Es wurde kürzlich gezeigt, dass Siponimod die Symptome bei Patienten mit sekundär progredienter Multipler Sklerose (SPMS) verbessert. Siponimod kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und entfaltet seine Wirkung, indem es an S1P1- und S1P5-Rezeptoren auf verschiedenen Hirnzellen, einschließlich Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen und Mikroglia, bindet. Dadurch kann es neuronale Entzündungen und Neurodegeneration modulieren. Um die Hypothesen dieser Studie zu überprüfen, habe ich insgesamt drei Experimentreihen durchgeführt: E1, E2.1 und E2.2. In diesen Experimenten habe ich mit histologischen und immunhistochemischen Methoden die Auswirkungen von Siponimod auf Myelin, die Rekrutierung von Immunzellen aus der Peripherie ins ZNS (CD3; CD4), die Entzündungsreaktion (Anzahl der PVCs) sowie die Reaktion der Gliazellen (Astroglie und Mikroglie) und axonale Schäden untersucht.

Unter Verwendung des Cup-EAE-Modells (Experiment 1 und Experiment 2 Teil 2) konnte ich zeigen, dass Siponimod die Migration peripherer Lymphozyten, die in sekundären lymphatischen Organen zurückgehalten werden, in das ZNS hemmt und somit die Entzündung reduziert. Darüber hinaus wurde auch eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen, da Astroglie, Mikroglie und axonale Schädigung reduziert waren. Eine drastische Reduktion des Ausmaßes der Demyelinisierung konnte im Cuprizone-Modell (nach 3-wöchiger Intoxikation) unter Behandlung mit Siponimod nachgewiesen werden. Nur nach 2 Wochen Intoxikation mit Cuprizone (Experiment 1) wurde keine Demyelinisierung beobachtet. Aus diesem Grund konnte die Wirkung von Siponimod, bei fehlender Demyelinisierung, nicht untersucht werden. Da außerdem eine vollständige spontane Remyelinisierung nach 7 Wochen (Experiment 2 Teil 2) auftrat, ließ sich die Wirkung von Siponimod auch in diesem Fall nicht gut beurteilen.

6. LITERATURVEZEICHNIS

Abdelhak A, Weber MS, Tumani H: Primary Progressive Multiple Sclerosis: Putting Together the Puzzle. *Front Neurol.* 2017; 8: 234. doi: 10.3389/fneur.2017.00234

Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2006; 203: 1007-19. doi: 10.1084/jem.20051342.

Akbulak R.O. Acute and long-term effects of fingolimod on heart rhythm and heart rate variability in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2018; 19: 44–49. doi: 10.1016/j.msard.2017.10.020.

Allende M.L. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 15396–15401. doi: 10.1074/jbc.M314291200.

An S. Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids. *FEBS Lett.* 1997; 417: 279–282. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01301-X.

Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF Jr, Rao MS, Sherman LS. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med.* 2005; 11: 966-72. doi: 10.1038/nm1279.

Baker D, Amor S. Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. *Mult Scler Relat Disord.* 2014; 3: 555-64. doi: 10.1016/j.msard.2014.05.002.

Bakker DA, Ludwin SK. Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J Neurol Sci.* 1987; 78: 125-137.

Bar-Or A, Rieckmann P, Traboulsee A, Yong VW. Targeting progressive neuroaxonal injury: lessons from multiple sclerosis. *CNS Drugs.* 2011; 25:783-99. doi: 10.2165/11587820-000000000-00000.

Behrang N, Fischbach F, Kipp M. Mechanism of Siponimod: Anti-Inflammatory and Neuroprotective Mode of Action. *Cells.* 2019; 8: 24. doi: 10.3390/cells8010024.

Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1981; 11: 195-9. doi: 10.1002/eji.1830110307.

Bigaud M, Tisserand S, Albrecht P, et al. Siponimod: from understanding mode of action to differentiation versus fingolimod. *Neurology.* 2020; 94.

Bischof F, Hofmann M, Schumacher TN, Vyth-Dreese FA, Weissert R, Schild H, Kruisbeek AM, Melms A. Analysis of autoreactive CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis after primary and secondary challenge using MHC class II tetramers. *J Immunol.* 2004; 172(5):2878-84. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2878.

Blakemore WF. Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. *J Neurol Sci* 1973; 20: 63–72.

Blondeau N., Lai Y., Tyndall S., Popolo M., Topalkara K., Pru J.K., Zhang L., Kim H., Liao J.K., Ding K., et al. Distribution of sphingosine kinase activity and mRNA in rodent brain. *J. Neurochem.* 2007; 103: 509–517. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04755.x.

Bø L, Vedeler CA, Nyland H, et al. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler.* 2003; 9: 323–31. doi: 10.1191/1352458503ms9170a.

Bove RM, Green AJ. Remyelinating Pharmacotherapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2017; 14: 894-904. doi: 10.1007/s13311-017-0577-0.

Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119: 37-53. doi:10.1007/s00401-009-0601-5.

Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, Aradhye S, Burtin P. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9: 883-97. doi: 10.1038/nrd3248.

Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia.* 2013; 61: 453–65. doi: 10.1002/glia.22443

Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet* 2017; 389: 1336–46.

Buschmann JP, Berger K, Awad H, Clarner T, Beyer C, Kipp M. Inflammatory response and chemokine expression in the whitematter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *J Mol Neurosci.* 2012; 48: 66–76. doi: 10.1007/s12031-012-9773-x.

Carassiti D, Altmann DR, Petrova N, Pakkenberg B, Scaravilli F, Schmierer K. Neuronal loss, demyelination and volume change in the multiple sclerosis neocortex. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2018; 44: 377–390. doi: 10.1111/nan.12405.

Chanaday NL, Roth GA. Microglia and astrocyte activation in the frontal cortex of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience.* 2016; 314: 160-169.

Chaudhry BZ, Cohen JA, Conway DS. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators for the treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2017; 14: 859–873. doi: 10.1007/s13311-017-0565-4.

Chew LJ, King WC, Kennedy A, Gallo V. Interferon-gamma inhibits cell cycle exit in differentiating oligodendrocyte progenitor cells. *Glia.* 2005; 52: 127-43. doi: 10.1002/glia.20232.

Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J. Immunol.* 1998; 160: 5037–5044.

Choi J.W. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108: 751–756. doi: 10.1073/pnas.1014154108.

Cinamon G., Matloubian M., Lesneski M.J., Xu Y., Low C., Lu T., Proia R.L., Cyster J.G. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 713–720. doi: 10.1038/ni1083.

Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14: 311-321. doi:10.1038/nrn3484.

Colombo E, Bassani C, De Angelis A, Ruffini F, Ottoboni L, Comi G, Martino G, Farina C. Siponimod (BAF312) Activates Nrf2 While Hampering NFκB in Human Astrocytes, and Protects From Astrocyte-Induced Neurodegeneration. *Front Immunol.* 2020; 11:635. doi: 10.3389/fimmu.2020.00635.

Correale J, Farez MF. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Front Neurol.* 2015; 6: 180. doi: 10.3389/fneur.2015.00180.

Correale J, Gaitán MI, Ysraelit MC, et al.: Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain.* 2017; 140: 527–546. doi: 10.1093/brain/aww258

Cugati S, Chen CS, Lake S, Lee AW. Fingolimod and macular edema: Pathophysiology, diagnosis, and management. *Neurol Clin Pract.* 2014; 4: 402-409. doi: 10.1212/CPJ.000000000000027.

Davies S, Nicholson T, Laura M, et al.: Spread of T lymphocyte immune responses to myelin epitopes with duration of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64: 371–7. doi: 10.1093/jnen/64.5.371

De Groot CJ, Woodrooffe MN: The role of chemokines and chemokine receptors in CNS inflammation. *Prog Brain Res.* 2001; 132: 533–44. doi: 10.1016/s0079-6123(01)32101-5.

Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119: 55–73.

Didier N, Romero IA, Creminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J. Neurochem.* 2003; 86: 246-254.

Dubray G, Bezard G. A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1982; 119: 325-9. doi: 10.1016/0003-2697(82)90593-0.

Dulamea AO. Role of Oligodendrocyte Dysfunction in Demyelination, Remyelination and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 958: 91-127. doi: 10.1007/978-3-319-47861-6_7.

Dutta R, Chang A, Doud MK, Kidd GJ, Ribaldo MV, Young EA, Fox RJ, Staugaitis SM, Trapp BD. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 2011; 69: 445–454. doi: 10.1002/ana.22337.

Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA, Griffiths IR. Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol.* 2004; 166: 121-31. doi: 10.1083/jcb.200312012.

Eilam R, Segal M, Malach R, Sela M, Arnon R, Aharoni R. Astrocyte disruption of neurovascular communication is linked to cortical damage in an animal model of multiple sclerosis. *Glia.* 2018; 66: 1098-1117. doi: 10.1002/glia.23304.

Faizi M, Salimi A, Seydi E, Naserzadeh P, Kouhnavard M, Rahimi A, Pourahmad J. Toxicity of cuprizone a Cu(2+) chelating agent on isolated mouse brain mitochondria: a justification for demyelination and subsequent behavioral dysfunction. *Toxicol Mech Methods.* 2016; 26(4):276-83. doi: 10.3109/15376516.2016.1172284.

Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007; 28: 138–45. doi: 10.1016/j.it.2007.01.005.

Forrest M. Immune cell regulation and cardiovascular effects of sphingosine 1-phosphate receptor agonists in rodents are mediated via distinct receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 309: 758–768. doi: 10.1124/jpet.103.062828.

Frischer JM. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009; 132: 1175–1189. doi: 10.1093/brain/awp070.

Fujino M. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 305: 70–77. doi: 10.1124/jpet.102.045658.

Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature.* 2012; 485: 517-21. doi: 10.1038/nature11007.

Gajofatto A. Spotlight on siponimod and its potential in the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: the evidence to date. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11: 3153-3157. doi: 10.2147/DDDT.S122249.

Gajofatto A, Turatti M, Monaco S, Benedetti MD. Clinical efficacy, safety, and tolerability of fingolimod for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Drug Healthc Patient Saf.* 2015; 7: 157-67. doi: 10.2147/DHPS.S69640.

GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol* 2017.

Gentile A, Musella A, Bullitta S, Freseghna D, De Vito F, Fantozzi R, Piras E, Gargano F, Borsellino G, Battistini L, Schubart A, Mandolesi G, Centonze D. Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2016; 13: 207. doi: 10.1186/s12974-016-0686-4.

Gergely P. The selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator BAF312 redirects lymphocyte distribution and has species-specific effects on heart rate. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 167: 1035–1047. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02061.x

Gergely P, Nuesslein-Hildesheim B, Guerini D, Brinkmann V, Traebert M, Bruns C, Pan S, Gray NS, Hinterding K, Cooke NG, Groenewegen A, Vitaliti A, Sing T, Luttringer O, Yang J, Gardin A, Wang N, Crumb WJ Jr, Saltzman M, Rosenberg M, Wallström E. The selective sphingosine 1-phosphate receptor

modulator BAF312 redirects lymphocyte distribution and has species-specific effects on heart rate. *Br J Pharmacol.* 2012; 167: 1035-47. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02061.x.

Gillen KM, Mubarak M, Nguyen TD, Pitt D. Significance and In Vivo Detection of Iron-Laden Microglia in White Matter Multiple Sclerosis Lesions. *Front Immunol.* 2018; 9:255.

Gimenez MA, Sim JE, Russell JH. TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *J. Neuroimmunol.* 2004; 151: 116–125. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.02.012.

Goodman AD, Anadani N, Gerwitz L. Siponimod in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019; 28: 1051-1057. doi: 10.1080/13543784.2019.1676725.

Graeler M., Goetzl E.J. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J.* 2002; 16: 1874–1878. doi: 10.1096/fj.02-0548com.

Gräler M.H., Goetzl E.J. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2004; 18: 551–553. doi: 10.1096/fj.03-0910fje.

Graeler M., Shankar G., Goetzl E.J. Cutting edge: Suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate. *J. Immunol.* 2002; 169: 4084–4087. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4084.

Groebe A, Clarner T, Baumgartner W, Dang J, Beyer C, Kipp M. Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrogliosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum.* 2009; 8: 163-74. doi: 10.1007/s12311-009-0099-3. PMID: 19259754.

Groves A, Kihara Y, Chun J. Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. *J Neurol Sci.* 2013; 328: 9–18. doi: 10.1016/j.jns.2013.02.011.

Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 73. doi: 10.3389/fncel.2014.00073.

Guerrero-García JJ. The role of astrocytes in multiple sclerosis pathogenesis. *Neurologia.* 2020; 35: 400-408. doi: 10.1016/j.nrl.2017.07.021.

Haider L: Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; doi: 10.1155/2015/725370

Hait N.C., Wise L.E., Allegood J.C., O'Brien M., Avni D., Reeves T.M., Knapp P.E., Lu J., Luo C., Miles M.F., et al. Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat. Neurosci.* 2014; 17: 971–980. doi: 10.1038/nn.3728.

Hatrock D, Caporicci-Dinucci N, Stratton JA. Ependymal cells and multiple sclerosis: proposing a relationship. *Neural Regen Res.* 2020; 15: 263-264. doi: 10.4103/1673-5374.265551.

Hauser SL, Oksenberg JR: The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron.* 2006; 52: 61–76. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.011

Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP, Suzuki K, Matsushima GK. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol.* 1998; 92: 38-49. doi: 10.1016/s0165-5728(98)00168-4. PMID: 9916878.

Hochstrasser T, Exner GL, Nyamoya S, Schmitz C, Kipp M. Cuprizone-Containing Pellets Are Less Potent to Induce Consistent Demyelination in the Corpus Callosum of C57BL/6 Mice. *J Mol Neurosci.* 2017; 61: 617–624. doi: 10.1007/s12031-017-0903-3.

Hundehege P., Cerina M., Eichler S., Thomas C., Herrmann A.M., Gobel K., Muntefering T., Fernandez-Orth J., Bock S., Narayanan V., et al. The next-generation sphingosine-1 receptor modulator BAF312 (siponimod) improves cortical network functionality in focal autoimmune encephalomyelitis. *Neural Regen. Res.* 2019; 14: 1950–1960. doi: 10.4103/1673-5374.259622.

Idzko M., Panther E., Corinti S., Morelli A., Ferrari D., Herouy Y., Dichmann S., Mockenhaupt M., Gebicke-Haerter P., Di Virgilio F., et al. Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2002; 16: 625–627. doi: 10.1096/fj.01-0625fje.

Iglesias A, Bauer J, Litznerburger T, Schubart A, Linington C. T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia.* 2001; 36: 220-34. doi: 10.1002/glia.1111.

Jackson SJ, Giovannoni G, Baker D. Fingolimod modulates microglial activation to augment markers of remyelination. *J Neuroinflammation.* 2011; 8:76. doi: 10.1186/1742-2094-8-76.

Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, Calver AR, Duddy G, Walsh FS, Pangalos MN, Arimura N, Kaibuchi K, Zalc B, Lubetzki C. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* 2005; 25: 1459-69. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4645-04.2005

Jurgens T, Jafari M, Kreutzfeldt M, Bahn E, Bruck W, Kerschensteiner M, Merkler D. Reconstruction of single cortical projection neurons reveals primary spine loss in multiple sclerosis. *Brain*. 2016; 139: 39–46. doi: 10.1093/brain/awv353.

Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, Fox RJ, Giovannoni G, Gold R, Vermersch P, Arnold DL, Arnould S, Scherz T, Wolf C, Wallström E, Dahlke F; EXPAND Clinical Investigators. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*. 2018; 391: 1263-1273. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30475-6.

Karadottir R, Cavalier P, Bergersen LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*. 2005; 438: 1162– 6. doi: 10.1038/nature04302.

Karamita M, Barnum C, Möbius W, Tansey MG, Szymkowski DE, Lassmann H, Probert L. Therapeutic inhibition of soluble brain TNF promotes remyelination by increasing myelin phagocytosis by microglia. *JCI Insight*. 2017; 2. doi: 10.1172/jci.insight.87455.

Kharel Y., Lee S., Snyder A.H., Sheasley-O’neill S.L., Morris M.A., Setiady Y., Zhu R., Zigler M.A., Burcin T.L., Ley K., et al. Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J. Biol. Chem*. 2005; 280: 36865–36872. doi: 10.1074/jbc.M506293200.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010; 8: e1000412. doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412.

Kim RY, Mangu D, Hoffman AS, Kavosh R, Jung E, Itoh N, Voskuhl R. Oestrogen receptor β ligand acts on CD11c+ cells to mediate protection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. 2018; 141: 132-147. doi: 10.1093/brain/awx315.

Kipp M., Amor S. FTY720 on the way from the base camp to the summit of the mountain: Relevance for remyelination. *Mult. Scler. J*. 2012; 18: 258–263. doi: 10.1177/1352458512438723.

Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*. 2009; 118: 723-36. doi: 10.1007/s00401-009-0591-3.

Kipp M, Baumgartner W. The cuprizone model and multiple sclerosis: disparities and similarities. (Dissertation), RWTH Aachen University. 2011. Retrieved from: <http://publications.rwth-aachen.de/record/64260/files/3773.pdf>

Kipp M. Oligodendrocyte Physiology and Pathology Function. *Cells*. 2020; 9: 2078. doi: 10.3390/cells9092078.

Kipp M, Amor S. FTY720 on the way from the base camp to the summit of the mountain: relevance for remyelination. *Mult Scler*. 2012; 18: 258-63. doi: 10.1177/1352458512438723.

Kipp M. Does Siponimod Exert Direct Effects in the Central Nervous System? *Cells*. 2020; 9: 1771. doi: 10.3390/cells9081771.

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

Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 2006; 26: 328–332. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2615-05.2006.

Kraus J, Ling AK, Hamm S, Voigt K, Oschmann P, Engelhardt B. Interferon-beta stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells in vitro. *Ann. Neurol*. 2004; 56: 192–205. doi: 10.1002/ana.20161.

Kupperman E. A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature*. 2000; 406: 192–195. doi: 10.1038/35018092.

Kutzelnigg A. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005; 128: 2705–2712. doi: 10.1093/brain/awh641.

Kutzelnigg A, Lassmann H: Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Handb Clin Neurol*. 2014; 122: 15–58. doi: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00002-9.

Lewis ND, Haxhinasto SA, Anderson SM, Stefanopoulos DE, Fogal SE, Adusumalli P, Desai SN, Patnaude LA, Lukas SM, Ryan KR, Slavin AJ, Brown ML, Modis LK. Circulating monocytes are reduced by sphingosine-1-phosphate receptor modulators independently of S1P3. *J Immunol*. 2013; 190: 3533-40. doi: 10.4049/jimmunol.1201810.

Lombardi M, Parolisi R, Scaroni F, Bonfanti E, Gualerzi A, Gabrielli M, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, Giussani P, Viani P, *et al*. Detrimental and protective action of microglial extracellular vesicles on myelin lesions: Astrocyte involvement in remyelination failure. *Acta Neuropathol*. 2019; 138: 987–1012. doi: 10.1007/s00401-019-02049-1.

Lubetzki C, Stankoff B. Demyelination in multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol*. 2014; 122: 89-99. doi: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00004-2.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996; 46: 907-11. doi: 10.1212/wnl.46.4.907. PMID: 8780061.

Lucchinetti CF. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 2188–2197. doi: 10.1056/NEJMoa1100648.

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000; 47: 707-17. doi: 10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q.

Ludwin S., Johnson E. Evidence for a "dying-back" gliopathy indemyelinating disease. *Ann Neurol*. 1981; 9: 301-5.

Magliozzi R., Howell O.W., Reeves C., Roncaroli F., Nicholas R., Serafini B., Aloisi F., Reynolds R. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann. Neurol*. 2010; 68: 477–493. doi: 10.1002/ana.22230.

Magliozzi R., Howell O., Vora A., Serafini B., Nicholas R., Puopolo M., Reynolds R., Aloisi F. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain J. Neurol*. 2007; 130: 1089–1104. doi: 10.1093/brain/awm038.

Maki T. Prevention and cure of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice by continuous administration of FTY720. *Transplantation*. 2005; 79: 1051–1055. doi: 10.1097/01.TP.0000161220.87548.EE.

Maña P, Fordham SA, Staykova MA, et al.: Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation. *J Neuroimmunol*. 2009; 210: 13–21. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.013

Mandala S., Hajdu R., Bergstrom J., Quackenbush E., Xie J., Milligan J., Thornton R., Shei G.J., Card D., Keohane C., et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*. 2002; 296: 346–349. doi: 10.1126/science.1070238.

Mannioui A, Vauzanges Q, Fini JB, Henriet E, Sekizar S, Azoyan L, Thomas JL, Pasquier DD, Giovannangeli C, Demeneix B, Lubetzki C, Zalc B. The *Xenopus* tadpole: An in vivo model to screen drugs favoring remyelination. *Mult Scler*. 2018; 24: 1421-1432. doi: 10.1177/1352458517721355.

Masaki K. Early disruption of glial communication via connexin gap junction in multiple sclerosis, Baló's disease and neuromyelitis optica. *Neuropathology*. 2015; 35: 469-80. doi: 10.1111/neup.12211.

Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J. Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *PLoS One*. 2013; 8: e72919. doi: 10.1371/journal.pone.0072919.

Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004; 427: 355-60. doi: 10.1038/nature02284.

Matsuura M. Effect of FTY720, a novel immunosuppressant, on adjuvant-induced arthritis in rats. *Inflamm. Res*. 2000; 49: 404–410. doi: 10.1007/s000110050608.

Means C.K. Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2007; 292: 2944–5291. doi: 10.1152/ajpheart.01331.2006.

Mei F, Fancy SPJ, Shen YA, Niu J, Zhao C, Presley B, Miao E, Lee S, Mayoral SR, Redmond SA, Etxeberria A, Xiao L, Franklin RJM, Green A, Hauser SL, Chan JR. Micropillar arrays as a high-throughput screening platform for therapeutics in multiple sclerosis. *Nat Med*. 2014; 20: 954-960. doi: 10.1038/nm.3618.

Mei F, Lehmann-Horn K, Shen YA, Rankin KA, Stebbins KJ, Lorrain DS, Pekarek K, A Sagan S, Xiao L, Teuscher C, von Büdingen HC, Wess J, Lawrence JJ, Green AJ, Fancy SP, Zamvil SS, Chan JR. Accelerated remyelination during inflammatory demyelination prevents axonal loss and improves functional recovery. *Elife*. 2016; 5: e18246. doi: 10.7554/eLife.18246.

Mendiola AS, Ryu JK, Bardehle S, Meyer-Franke A, Ang KK, Wilson C, Baeten KM, Hanspers K, Merlini M, Thomas S, *et al*. Transcriptional profiling and therapeutic targeting of oxidative stress in neuroinflammation. *Nat. Immunol*. 2020; 21: 513–524. doi: 10.1038/s41590-020-0654-0.

Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, et al. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature*. 2006; 439: 988– 92. doi: 10.1038/nature04474.

Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2003; 9: 540-549.

Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, Thill G, Levesque M, Zhang M, Hession C, Sah D, Trapp B, He Z, Jung V, McCoy JM, Pepinsky RB. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci*. 2005; 8: 745-51. doi: 10.1038/nn1460.

Mix E, Meyer-Rienecker H, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. *J Neurol.* 2008; 6: 7-14. doi: 10.1007/s00415-008-6003-0.

Molina-Gonzalez I, Miron VE. Astrocytes in myelination and remyelination. *Neurosci. Lett.* 2019; 713: 134532. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134532.

Montalban X., Hauser S.L., Kappos L., Arnold D.L., Bar-Or A., Comi G., de Seze J., Giovannoni G., Hartung H.P., Hemmer B., et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2017; 376: 209–220. doi: 10.1056/NEJMoa1606468.

Moore CS, Abdullah SL, Brown A, Arulpragasam A, Crocker SJ. How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *J Neurosci Res.* 2011; 89: 13-21. doi: 10.1002/jnr.22482. PMID: 20857501.

Moore CS, Cui QL, Warsi NM, Durafourt BA, Zorko N, Owen DR, Antel JP, Bar-Or A. Direct and indirect effects of immune and central nervous system-resident cells on human oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J Immunol.* 2015; 194: 761-72. doi: 10.4049/jimmunol.1401156.

Mullershausen F. Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat. Chem. Biol.* 2009; 5: 428–434. doi: 10.1038/nchembio.173.

Mutoh T, Rivera R, Chun J. Insights into the pharmacological relevance of lysophospholipid receptors. *Br J Pharmacol.* 2012; 165: 829-44. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01622.x.

National Multiple Sclerosis Society: Disease-modifying therapies for MS. NMSS Brochure.2019.

Norkute A, Hieble A, Braun A, Johann S, Clarner T, Baumgartner W, Beyer C, Kipp M. Cuprizone treatment induces demyelination and astrocytosis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res.* 2009; 87: 1343-55. doi: 10.1002/jnr.21946.

Novartis Europharm Ltd. Siponimod (Mayzent®): EU summary of product characteristics. 2020. <https://www.ema.europa.eu/>. Accessed 9 Jul 2020.

Novgorodov A.S. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *Faseb. J.* 2007; 21: 1503–1514. doi: 10.1096/fj.06-7420com.

Ohno N, Chiang H, Mahad DJ, Kidd GJ, Liu L, Ransohoff RM, Sheng ZH, Komuro H, Trapp BD. Mitochondrial immobilization mediated by syntaphilin facilitates survival of demyelinated axons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: 9953-8. doi: 10.1073/pnas.1401155111.

O'Neill JK, Baker D, Morris MM, Gschmeissner SE, Jenkins HG, Butt AM, Kirvell SL, Amor S. Optic neuritis in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Biozzi ABH mice: demyelination and fast axonal transport changes in disease. *J Neuroimmunol.* 1998; 82: 210-8. doi: 10.1016/s0165-5728(97)00203-8.

O'Sullivan C, Schubart A, Mir AK, Dev KK. The dual S1PR1/S1PR5 drug BAF312 (Siponimod) attenuates demyelination in organotypic slice cultures. *J Neuroinflammation.* 2016; 13:31. doi: 10.1186/s12974-016-0494-x.

Oo M.L. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 9082–9089. doi: 10.1074/jbc.M610318200.

Ortega SB, Kashi VP, Tyler AF, Cunnusamy K, Mendoza JP, Karandikar NJ. The disease-ameliorating function of autoregulatory CD8 T cells is mediated by targeting ofencephalitogenic CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2013; 191: 117–126. doi: 10.4049/jimmunol.1300452.

Pan S., Gray N.S., Gao W., Mi Y., Fan Y., Wang X., Tuntland T., Che J., Lefebvre S., Chen Y., et al. Discovery of BAF312 (Siponimod), a Potent and Selective S1P Receptor Modulator. *ACS Med. Chem. Lett.* 2013; 4: 333–337. doi: 10.1021/ml300396r.

Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF, Leffler CW. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006; 290: C1399-1410.

Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 2001; 50: 389–400. doi: 10.1002/ana.1123.

Pfeilschifter W., Czech-Zechmeister B., Sujak M., Mirceska A., Koch A., Rami A., Steinmetz H., Foerch C., Huwiler A., Pfeilschifter J. Activation of sphingosine kinase 2 is an endogenous protective mechanism in cerebral ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 413: 212–217. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.070.

Pirko I. Gray matter involvement in multiple sclerosis. *Neurology.* 2007; 68: 634–642. doi: 10.1212/01.wnl.0000250267.85698.7a.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al.: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011; 69: 292–302. doi: 10.1002/ana.22366.

Ponath G, Park C, Pitt D. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2018; 9: 217. doi:10.3389/fimmu.2018.00217.

Ponath G, Ramanan S, Mubarak M, Housley W, Lee S, Sahinkaya FR, et al. Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain.* 2017; 140: 399–413. doi: 10.1093/brain/aww298.

Pott F, Gingele S, Clarner T, Dang J, Baumgartner W, Beyer C, Kipp M. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Research.* 2009; 1305: 137–149. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.084.

Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014; 47:485-505. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.004.

Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol.* 1993; 33: 137-51. doi: 10.1002/ana.410330203.

Prineas JW, Connell F. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1979; 5: 22-31. doi: 10.1002/ana.410050105.

Prineas JW, Lee S. Multiple Sclerosis: Destruction and Regeneration of Astrocytes in Acute Lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2019; 78: 140-156. doi: 10.1093/jnen/nly121.

Prineas JW, Parratt JD. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol.* 2012; 72: 18–31. doi: 10.1002/ana.23634

Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2002; 16: 1274–1276. doi: 10.1096/fj.01-0814fje.

Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2012; 122: 1164– 71. doi: 10.1172/JCI58644.

Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2018; 378: 169-180. doi:10.1056/NEJMra1401483

Reich DS, Zackowski KM, Gordon-Lipkin EM, Smith SA, Chodkowski BA, Cutter GR, Calabresi PA. Corticospinal tract abnormalities are associated with weakness in multiple sclerosis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2008; 29: 333–339. doi: 10.3174/ajnr.A0788.

Rochfort KD, Collins LE, McLoughlin A, Cummins PM. Tumour necrosis factor-alpha-mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *J. Neurochemistry.* 2016; 136: 564-572.

Rodriguez, M., B. Scheithauer. Ultrastructure of Multiple Sclerosis. *Ultrastruct Pathol.* 1994; 18: 3-13. doi: 10.3109/01913129409016267.

Rüther BJ, Scheld M, Dreymueller D, Clarner T, Kress E, Brandenburg LO, Swartenbroekx T, Hoornaert C, Ponsaerts P, Fallier-Becker P, Beyer C, Rohr SO, Schmitz C, Chrzanowski U, Hochstrasser T, Nyamoya S, Kipp M. Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia.* 2017; 65: 1900-1913. doi: 10.1002/glia.23202.

Salou M, Nicol B, Garcia A, Laplaud DA. Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2015; 6:604. doi: 10.3389/fimmu.2015.00604.

Samjoo I.A., Worthington E., Haltner A., Cameron C., Nicholas R., Rouyrre N., Dahlke F., Adlard N. Matching-adjusted indirect treatment comparison of siponimod and other disease modifying treatments in secondary progressive multiple sclerosis. *Curr. Med. Res. Opin.* 2020: 1–10. doi: 10.1080/03007995.2020.1747999.

Scheld M, Rüther BJ, Große-Veldmann R, Ohl K, Tenbrock K, Dreymüller D, Fallier-Becker P, Zendedel A, Beyer C, Clarner T, Kipp M. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci.* 2016; 36: 1410-5. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016.

Scott LJ. Siponimod: A Review in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *CNS Drugs.* 2020; 34: 1191-1200. doi: 10.1007/s40263-020-00771-z.

Selmaj K, Li DK, Hartung HP, Hemmer B, Kappos L, Freedman MS, et al. Siponimod for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (BOLD): an adaptive, dose-ranging, randomised, phase 2 study. *Lancet Neurol.* 2013; 12: 756–767. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70102-9.

Shakeri-Nejad K, Aslanis V, Veldandi UK, Mooney L, Pezous N, Brendani B, et al. Effects of therapeutic and suprathreshold doses of siponimod (BAF312) on cardiac repolarization in healthy subjects. *Clin Ther.* 2015; 37: 2489–2505. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.09.006.

Slowik A, Schmidt T, Beyer C, Amor S, Clarner T, Kipp M. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 is neuroprotective after cuprizone-induced CNS demyelination. *Br J Pharmacol.* 2015; 172: 80–92. doi: 10.1111/bph.12938.

Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16: 249–63. doi: 10.1038/nrn3898.

Stys PK, Tsutsui S. Recent advances in understanding multiple sclerosis. *F1000Res.* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-2100. doi: 10.12688/f1000research.20906.1.

Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, et al.: Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13: 507–14. doi: 10.1038/nrn3275

Subei AM, Cohen JA. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis. *CNS Drugs.* 2015; 29: 565–575. doi: 10.1007/s40263-015-0261-z.

Suzuki S. A new immunosuppressant, FTY720, induces bcl-2-associated apoptotic cell death in human lymphocytes. *Immunology.* 1996; 89: 518–523. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-777.x.

Terai K. Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience.* 2003; 116: 1053–1062. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00791-1.

Terai K., Soga T., Takahashi M., Kamohara M., Ohno K., Yatsugi S., Okada M., Yamaguchi T. Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience.* 2003; 116: 1053–1062. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00791-1.

Thiel VE, Audus KL. Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid. Redox Signal.* 2001; 3: 273-278.

Torkildsen O, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2008; 188: 72-6. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x. PMID: 18439226.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 1998; 338: 278–285. doi: 10.1056/NEJM199801293380502.

Uschkureit T, Sporkel O, Stracke J, Bussow H, Stoffel W. Early onset of axonal degeneration in double (plp^{-/-}mag^{-/-}) and hypomyelinoses in triple (plp^{-/-}mbp^{-/-}mag^{-/-}) mutant mice. *J Neurosci.* 2000; 20: 5225-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-14-05225.2000.

van der Star BJ, Vogel DY, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S. In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012; 11: 570–588.

Van Doorn R. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 3 are upregulated in multiple sclerosis lesions. *Glia*. 2010; 58: 1465–1476. doi: 10.1002/glia.21021.

Van Doorn R., Van Horssen J., Verzijl D., Witte M., Ronken E., Van Het Hof B., Lakeman K., Dijkstra C.D., Van Der Valk P., Reijkerk A., et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 3 are upregulated in multiple sclerosis lesions. *Glia*. 2010; 58: 1465–1476. doi: 10.1002/glia.21021.

Vazana U, Veksler R, Pell GS, Prager O, Fassler M, Chassidim Y, Roth Y, Shahar H, Zangen A, Raccach R, Onesti E, Ceccanti M, Colonnese C, Santoro A, Salvati M, D'Elia A, Nucciarelli V, Inghilleri M, Friedman A. Glutamate-mediated blood-brain barrier opening: implications for neuroprotection and drug delivery. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 2016; 36: 7727-7739.

Voet S, Prinz M, van Loo G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol Med*. 2019; 25: 112-123. doi: 10.1016/j.molmed.2018.11.005.

Vora K.A., Nichols E., Porter G., Cui Y., Keohane C.A., Hajdu R., Hale J., Neway W., Zaller D., Mandala S. Sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720-phosphate causes marginal zone B cell displacement. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78: 471–480. doi: 10.1189/jlb.0904487.

Voskuhl RR, Itoh N, Tassoni A, *et al.* Gene expression in oligodendrocytes during remyelination reveals cholesterol homeostasis as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; 116: 10130-10139. doi:10.1073/pnas.1821306116.

Wang Z., Zheng Y., Wang F., Zhong J., Zhao T., Xie Q., Zhu T., Ma F., Tang Q., Zhou B., et al. Mfsd2a and Spns2 are essential for sphingosine-1-phosphate transport in the formation and maintenance of the blood-brain barrier. *Sci. Adv.* 2020; 6: eaay8627. doi: 10.1126/sciadv.aay8627.

Waxman FJ, Fritz RB, Hinrichs DJ. The presence of specific antigen-reactive cells during the induction, recovery, and resistance phases of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 1980; 49: 34-42. doi: 10.1016/0008-8749(80)90053-2.

Williams JL, Manivasagam S, Smith BC, Sim J, Vollmer LL, Daniels BP, Russell JH, Klein RS. Astrocyte-T cell crosstalk regulates region-specific neuroinflammation. *Glia*. 2020; 68: 1361–1374. doi: 10.1002/glia.23783.

Witte ME, Bø L, Rodenburg RJ, Belien JA, Musters R, Hazes T, Wintjes LT, Smeitink JA, Geurts JJ, De Vries HE, van der Valk P, van Horssen J. Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions. *J Pathol.* 2009; 219: 193-204. doi: 10.1002/path.2582.

Wong WT: Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 22. doi: 10.3389/fncel.2013.00022.

Wu GF, Shindler KS, Allenspach EJ, Stephen TL, Thomas HL, Mikesell RJ, Cross AH, Laufer TM. Limited sufficiency of antigen presentation by dendritic cells in models of central nervous system autoimmunity. *J Autoimmun.* 2011; 36(1):56-64. doi: 10.1016/j.jaut.2010.10.006.

Wu Q., Mills E.A., Wang Q., Dowling C.A., Fisher C., Kirch B., Lundy S.K., Fox D.A., Mao-Draayer Y. Siponimod enriches regulatory T and B lymphocytes in secondary progressive multiple sclerosis. *JCI Insight.* 2020; 5. doi: 10.1172/jci.insight.134251.

Yagi H. Immunosuppressant FTY720 inhibits thymocyte emigration. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 1435–1444. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(200005)30:5<1435::AID-IMMU1435>3.0.CO;2-O.

Yakimov V, Schweiger F, Zhan J, Behrangi N, Horn A, Schmitz C, Hochstrasser T, Kipp M. Continuous cuprizone intoxication allows active experimental autoimmune encephalomyelitis induction in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol.* 2019; 152: 119-131. doi: 10.1007/s00418-019-01786-4.

Yamout B, Sahraian M, Bohlega S, Al-Jumah M, Goueider R, Dahdaleh M, Inshasi J, Hashem S, Alsharoqi I, Khoury S, Alkhwajah M, Koussa S, Al Khaburi J, Almahdawi A, Alsaadi T, Slassi E, Daodi S, Zakaria M, Alroughani R. Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of multiple sclerosis: 2019 revisions to the MENACTRIMS guidelines. *Mult Scler Relat Disord.* 2020; 37: 101459. doi: 10.1016/j.msard.2019.101459.

Yanagawa Y. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. II. FTY720 prolongs skin allograft survival by decreasing T cell infiltration into grafts but not cytokine production in vivo. *J. Immunol.* 1998; 160: 5493–5499.

Yanagawa Y., Masubuchi Y., Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing. *Immunology.* 1998; 95: 591–594. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00639.x.

Yi W, Schlüter D, Wang X. Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity. *Brain Behav Immun.* 2019; 80: 10-24. doi: 10.1016/j.bbi.2019.05.029.

York NR, Mendoza JP, Ortega SB, Benagh A, Tyler AF, Firan M, Karandikar NJ. Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.* 2010; 35: 33-44. doi: 10.1016/j.jaut.2010.01.003.

Zemann B., Kinzel B., Müller M., Reuschel R., Mechtcheriakova D., Urtz N., Bornancin F., Baumruker T., Billich A. Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood.* 2006; 107: 1454–1458. doi: 10.1182/blood-2005-07-2628.

Zhan J, Mann T, Joost S, Behrangi N, Frank M, Kipp M. The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells.* 2020; 9: 843. doi:10.3390/cells9040843.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
APCs	Antigen Representing Cells
APP	Anti-Alzheimer precursor protein
ATP	Adenosintriphosphat
BAF312	Siponimod
bzw.	Beziehungsweise
BBB	Blut-Hirn-Schranke (engl. Blood-brain-barrier)
ca.	Zirka
CD3	Cluster of differentiation 3
CD4	Cluster of differentiation 4
Cup	Cuprizone
Cuprizone	bis-cyclohexanone oxaldihydrazone
Cup-EAE	Cuprizone und Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit/Liquor cerebrospinalis
DAB	3,3`Diaminobenzidin
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECs	Endothelzellen (Endothelial cells)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Engl.	Englisch
<i>et al.</i>	et alia
E1	Experiment 1
E2.1	Experiment 2 Teil 1
E2.2	Experiment 2 Teil 2
FGF	engl. Fibroblast growth factor
FTY720	Fingolimod
GFAP	Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein)
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
i.e.	Id est
IBA1	Anti-ionized calcium binding-adaptor molecule 1 antibody
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
LFB-PAS	Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff-Färbung
MRT	Magnetresonanztomographie
MBP	Myelin basic protein
MHC	Major histocompatibility complex
MOG35-55	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
µL	Mikroliter
n	Anzahl
OPC	Oligodendrozyten- Vorläuferzelle (Oligodendrocyte progenitor cell)
PBS	phosphate-buffered-saline
PDGF	engl. Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PVCs	perivaskulärer Zellakkumulation (eng. Perivascular cuff)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
ROI	Untersuchende Region (Region of interest)
PPMS	primäre-progrediente MS (Primary progressive MS)
RRMS	schubförmig-remittierende MS (Relapsing-remitting MS)
SPMS	sekundäre-progrediente MS (Secondary-progressive MS)
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1P1-5	S1P- Rezeptor-Subtypen 1-5
Sphk1/Sphk2	Sphingosin-Kinase Typ 1 oder 2
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle

W	Wochen
ZNS	Zentralnervensystem

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Klinische Beurteilung (Scoring) der MOG35-55-immunisierten Mäuse.....	23
Tab. 2 Herstellung der Perfusionslösung (für 1 Liter Fixierlösung)	23
Tab. 3. Paraffineinbettung.....	24
Tab. 4 Histologische und immunohistochemische Färbungen	26
Tab. 5 Das H&E Färbeprotokoll	27
Tab. 6 Das LFB/ PAS Färbeprotokoll.....	28
Tab. 7 Verwendete Primärantikörper	30
Tab. 8 Verwendete Sekundärantikörper	31
Tab. 9 Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbungen.	32
Tab. 10. Das Scoringssystem für die Beurteilung der Demyelinisierung in den LFB/PAS gefärbten Präparaten.....	34

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Der Versuchsaufbau.....	22
Abb.2 Untersuchte Hirnregion: Region 265.....	25
Abb.3 Immunantwort und die perivaskulären Infiltrate nach Immuninduktion mit MOG35-55 (R265) (E1).....	36
Abb.4 Astrogliose nach Immuninduktion mit MOG35-55 R265. Klinische Beurteilung der Mäuse (E1).....	37
Abb.5 Demyelinisierung und Mikrogliose ist in Vehikel-Mäusen erhöht (E1).....	38
Abb. 6 Demyelinisierung bei Vehikel-Mäusen vs. Siponimod-Mäusen. Mediales Corpus callosum, R265 (E2T1).....	39
Abb.7 Mikrogliose, Akute Axonalschaden und Astrogliose, mediales Corpus callosum, R265 (E2T1).....	40
Abb.8 CD3- und CD4-positive Zellen ohne MOG35-55 Immunisierung, Region 265 (E2T1).....	41
Abb.9 Immunantwort und perivaskuläre Infiltrate nach der MOG35-55 Immunisierung, R265 (E2T2).....	42
Abb.10 Akute Axonschäden, Astrogliose und Mikrogliose. Mediales Corpus callosum, R265 (E2T2).....	43
Abb.11Klinische Beurteilung der Mäuse nach MOG35-55Intoxikation (E2T2).....	44
Abb.12 Ergebnisse Demyelinisierung R265 (E2T2).....	44
Abb.13 Histopathologische Veränderungen in der Cuprizone-induzierten Pathologie.....	46
Abb.14 EAE- Klinische Beurteilung der C57BL/6-Mäusen, die mit MOG35-55-Peptid immunisiert wurden.....	47